



Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Ana Clara Rezeck de Moura

**EFEITOS DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA MORFOLOGIA DAS SUB-
REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA: ESTUDO POR
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

**EFFECTS OF PRESERVATION METHODS ON THE MORPHOLOGY OF
HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE SUB-REGIONS: A STUDY BY SCANNING
ELECTRON MICROSCOPY**

São José dos Campos, SP
2023

Ana Clara Rezeck de Moura

**EFEITOS DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA MORFOLOGIA DAS SUB-
REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA: ESTUDO POR
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Barros Sant'Anna

São José dos Campos, SP
2023

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Moura, Ana Clara Rezeck de
Efeitos dos métodos de preservação na morfologia das sub-regiões da membrana amniótica humana : estudo por microscopia eletrônica de varredura / Ana Clara Rezeck de Moura; orientadora, Luciana Barros Sant'Anna. - São José dos Campos, SP, 2023.

1 CD-ROM, 67 p.

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

Inclui referências

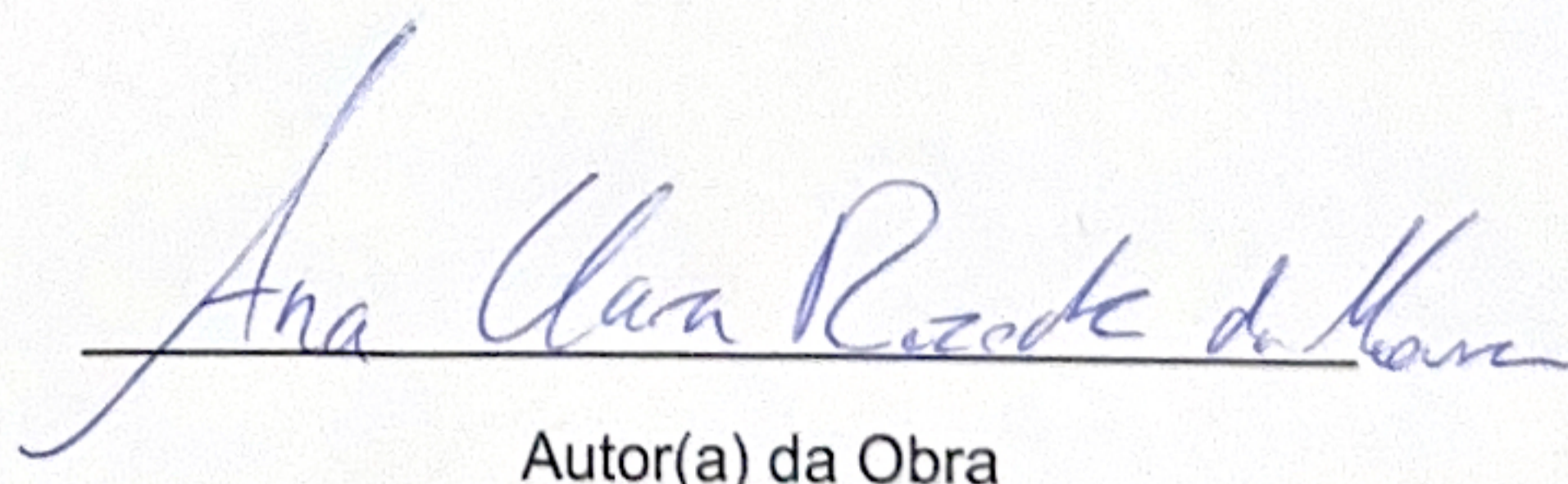
1. Engenharia Biomédica. 2. Membrana amniótica humana. 3. Preservação de tecido. 4. Âmnio placentário. 5. Âmnio refletido. I. Sant'Anna, Luciana Barros, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Ana Clara Rezeck de Moura, 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, 21 de Junho de 2023.

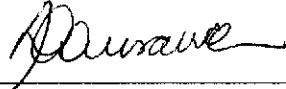

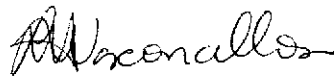

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 06 / 03 / 2023

ANA CLARA REZECK DE MOURA

**“EFEITOS DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA MORFOLOGIA DAS SUB-
REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA: ESTUDO POR MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA.”**

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 Luana Marotta Reis de Vasconcellos	

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 06 de março de 2023.

A Deus, aquele que sempre me deu forças e
sabedoria para continuar em meio as dificuldades.
A minha família, Renata, Ilda, Rogério e José,
pelo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, amigo de todas as horas.

À minha amada família, que nunca mediu esforços para me auxiliar em tudo que precisei. Que sempre contribuiu para que eu pudesse alcançar conquistas como esta.

À minha orientadora, pela dedicação, paciência, empenho e pelas inúmeras contribuições que geraram uma ótima condução nesta pesquisa.

Aos meus amigos, que estiveram do meu lado oferecendo apoio, trazendo alegria e leveza aos meus dias.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Gabriela, pelo companheirismo em tantos percalços vencidos.

Aos que pelas suas funções ajudaram a conclusão da pesquisa, como as enfermeiras do hospital que auxiliaram na coleta das placentas e a Priscila, coordenadora da central analítica, que realizou a metalização e micrografia de todas as amostras.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, que com seus conhecimentos ofertaram boas aulas, e me auxiliaram nesse processo.

Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Educação Superior (PROSUC) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que com o fomento da bolsa, permitiu-me realizar esta pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, que sempre se mostraram solícitos e contribuíram para um melhor ambiente de pesquisa e estudo.

À minha querida professora Ana Christina Claro, que sempre me incentivou a buscar mais conhecimento e também contribuiu ricamente para minha formação.

A todos que de alguma forma tiveram envolvimento neste processo me ajudando a alcançar o êxito.

Meus mais profundos agradecimentos!

RESUMO

A membrana amniótica (MA) ou âmnio tem atraído atenção como biomaterial para a medicina regenerativa, se consolidando como adjuvante em diversos tratamentos. Sua utilização baseia-se na capacidade de beneficiar o processo de epitelização, reduzir processos inflamatórios e antifibróticos promover a angiogênese, assim acelerando o processo cicatricial. Essas propriedades são atribuídas à morfologia e a fatores solúveis e insolúveis presentes na estrutura da MA, o que torna imprescindível sua correta preservação. Ademais, têm sido demonstrados algumas diferenças entre regiões anatômicas da MA, sugerindo que essas regiões apresentam diferentes potenciais na regeneração tecidual. Porém ainda não se conhecem os efeitos dos diferentes métodos de preservação sobre a integridade dessas regiões. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia da membrana amniótica nas suas diferentes regiões anatômicas, âmnio placentário (PA) e âmnio refletido (RA), e em seus lados epitelial e mesenquimal, após diferentes métodos de preservação, por meio da microscopia eletrônica de varredura. Sete placentas humanas, a termo, foram processadas, separando a MA do córion. Após lavagem com solução antibiótica e antifúngica foi dividida em 4 sub-regiões: central (R1), intermediária (R2), periférica (R3) e âmnio refletido (R4), de acordo com sua posição relacionada ao cordão umbilical. Em seguida, as membranas de cada sub-região foram fragmentadas e preservadas, seguindo o protocolo para cada grupo experimental. No grupo controle, os fragmentos de membrana, foram imersos imediatamente em fixador para MEV; no grupo fresca, os fragmentos foram imersos em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), (temperatura ambiente, 24°C, por 18h); e no grupo criopreservada, os fragmentos foram imersos em meio DMEM/glicerol 1:1 a -80°C por 30 dias. Após o tempo de preservação proposto para cada grupo experimental, os fragmentos de MA de cada uma das regiões foram processados para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A análise das micrografias eletrônicas, do lado epitelial do grupo controle, demonstrou que as células apresentaram formato hexagonal, pouco globosas em R1 e achatadas em R4, com padrão em mosaico, junção intercelular bem definidas, microvilos roliços, densos e aglomerados na região apical e bordas das células. As regiões R2 e R3 apresentaram células com formato mais circular e globoso, junções intercelulares aumentadas e microvilos achatados e colabados às células. Já no grupo fresca houve perda de definição dos microvilos, das junções intercelulares e as células apresentaram tamanhos variados. Entretanto, o grupo criopreservada apresentou aspectos morfológicos similares ao grupo controle. No grupo criopreservada, a morfologia de todas as sub-regiões apresentou superfície uniforme/homogênea, com células em forma poligonal e junções intercelulares definidas, dentro do padrão de normalidade. No lado mesenquimal da MA, as variações nos aspectos microscópicos foram menores, demonstrando pouca diferenciação entre as 4 sub-regiões. Tanto o método fresca, quanto o criopreservada mantiveram a trama colágena homogênea, densa e compacta, com variação apenas na conformação da superfície mesenquimal. Finalmente, a criopreservação foi considerada ótima para preservar a integridade epitelial e estromal/mesenquimal, nas quatro sub-regiões da MA.

Palavras-chave: membrana amniótica humana; microscopia eletrônica de varredura; preservação de tecido; âmnio placentário; âmnio refletido.

ABSTRACT

The amniotic membrane (AM) or amnion has attracted attention as a biomaterial for regenerative medicine, consolidating itself as an adjuvant in the treatment of ocular surface diseases, burns, prevention of tissue adhesion in surgeries of the head, abdomen, pelvis, vagina and larynx, among others. Its use is based on its capacity to benefit the epithelialization process, reduce inflammatory and antifibrotic processes, and promote angiogenesis, thus accelerating the healing process. These properties are attributed to the morphology and to soluble and insoluble factors present in the structure of AM, which makes its correct preservation essential. Moreover, some differences between anatomical regions of the AM have been demonstrated, suggesting that these regions have different potentials in tissue regeneration. However, the effects of different preservation methods on the integrity of these regions are still unknown. In this context, the aim of this study was to evaluate the morphology of the amniotic membrane in its different anatomical regions, placental amnion (PA) and reflected amnion (RA), and on its epithelial and mesenchymal sides, after different preservation methods, by scanning electron microscopy. Seven human placentas, at term, were obtained at Santa Casa Hospital in São José dos Campos and transported to the laboratory where, under sterile conditions, the MA was separated from the chorion, processed with antibiotic and antifungal solution and divided into 4 subregions: central (R1), intermediate (R2), peripheral (R3) and reflected amnion (R4), according to their position related to the umbilical cord. Then, the membranes from each subregion were fragmented and preserved, following the protocol for each experimental group. In the control group, the membrane fragments, after being processed, were immersed immediately in fixative for SEM; in the fresh group, the fragments were immersed in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) at room temperature (24°C) for 18h; and in the cryopreserved group, the fragments were immersed in DMEM/glycerol 1:1 medium at -80°C for 30 days. After the preservation time in each experimental group, the MA fragments from each of the regions were processed for Scanning Electron Microscopy (SEM). The electron micrograph analysis, on the epithelial side, control group, the cells showed a hexagonal shape, slightly globose for R1 and flattened for R4, mosaic pattern, well-defined intercellular junction, plump, dense and clumped microvilli in the apical region and edges of the cells. The R2 and R3 regions showed cells with a more circular and globular shape, increased intercellular junction, and flattened and collapsed microvilli to the cells. In the fresh group there was a loss of definition of the microvilli, intercellular junctions, and the cells presented varied sizes. However, the cryopreserved group presented morphological aspects similar to the control group. In the cryopreserved group the morphology of all sub-regions showed a uniform/homogeneous surface, with polygonal cell shape and defined intercellular junctions and spaces, within the normal pattern. On the mesenchymal side of the AM, variations in microscopic aspects were smaller, demonstrating little differentiation between the four sub-regions. Both the fresh and cryopreserved methods maintained a dense and compact collagen network, with variation only in the conformation of the mesenchymal surface. Finally, cryopreservation was considered optimal to preserve epithelial and stromal/mesenchymal integrity, in all four sub-regions of the AM.

Keywords: human amniotic membrane; scanning electron microscopy; tissue preservation; placental amnion; reflected amnion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Representação esquemática da estrutura de MA e composição da matriz extracelular para cada camada. (b): Aspecto geral das membranas fetais humanas (imagem à esquerda). A MA é uma fina camada translúcida anexada ao córion (imagem à direita).	18
Figura 2: Diferenciação topográfica e morfológica do âmnio placentário e âmnio refletido... 19	19
Figura 3: (A) Âmnio placentário (azul), âmnio refletido (rosa) e cordão umbilical cinza. (B) Imagem da placenta e membranas fetais antes do processamento da membrana amniótica. ... 21	21
Figura 4: Processamento da MA. (A) Fluxo laminar com os materiais utilizados; (B) Fluxo laminar com luz U.V. para a desinfecção dos materiais; (C) Início da separação manual da MA do córion materno.	30
Figura 5: Preparo da MA para sua fragmentação. (A) MA separada do córion, com aspecto transparente e com um espaço central (local do cordão umbilical removido), permitindo dividir as sub-regiões. (B) Forma que a MA foi organizada para corte de sub-regiões. (C) Padrão de corte 3x3cm ² , com marca para diferenciação dos lados (círculo).	31
Figura 6: Desenho da placenta e cordão umbilical mostrando as sub-regiões, incluindo R1(região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Os círculos marcados com o número 1, 2 e 3 representam os fragmentos 1x1cm ² do grupo controle, fresca e criopreservada, respectivamente, de cada sub-região.	32
Figura 7: Aspecto macroscópico das amostras de MA do grupo controle, em ambos os lados, epitelial (E) e mesenquimal (M) e nas diferentes sub-regiões (R1, R2, R3 e R4).	34
Figura 8: Aspecto macroscópico das amostras de MA do grupo fresca, em ambos os lados, epitelial (E) e mesenquimal (M) e nas diferentes sub-regiões (R1, R2, R3 e R4).	35
Figura 9: Aspecto macroscópico das amostras de MA do grupo criopreservada, em ambos os lados, epitelial (E) e mesenquimal (M) e nas diferentes sub-regiões (R1, R2, R3 e R4).	35
Figura 10 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA dos grupos controle, fresca e criopreservada, em cada sub-região incluindo R1(região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Barras de ampliação: 10µm (1000x).....	42
Figura 11 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA dos grupos controle, fresca e criopreservada, em cada sub-região incluindo R1(região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Legenda para símbolos: setas vermelhas = microvilos, retângulo amarelo = junção intercelular, círculo vermelho = aberturas em formato circular no espaço intercelular. Barras de ampliação: 2µm (3000x).	43

Figura 12 – Micrografias eletrônicas representativas do lado mesenquimal da MA dos grupos controle, fresca e criopreservada, em cada sub-região incluindo R1 (região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Barras de ampliação: 1µm (10.000x).....	44
Figura 13 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA na sub-região R1, dos grupos controle (A), fresca (B) e criopreservada (C), mostrando que, independente do grupo, as células desta região podem ser mais alongadas. Barras de ampliação: 10µm (10.000x).	46
Figura 14 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA na sub-região R3 do grupo controle (A) e R4 do grupo fresca (B) mostrando a morfologia de uma célula normalmente encontrada no meio das demais células epiteliais com forma poligonal, denominada de célula aranha (**), com finas projeções citoplasmáticas atravessando o espaço intercelular e formando um sistema de canais intercelulares, os quais são visualizados por meio das aberturas circulares entre as projeções Barras de ampliação: 2µm (3000x).	46
Figura 15 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA mostrando variações nos microvilos da região apical das células da sub-região R2 no grupo criopreservada (A e B), e da sub-região R3	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA apresentando aspecto celular normal da camada epitelial, padrão epitelial 1 (A e B) e padrão 2 (C e D). Barras de ampliação: 10 μ m (1000x) e 2 μ m (3000x).	36
Quadro 2 – Micrografias eletrônicas representativas do lado mesenquimal da MA com a descrição do aspecto normal da camada mesenquimal (padrão mesenquimal 1 (A) e 2 (B). Barras de ampliação: 1 μ m (10.000x).	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfato

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CREB - cAMP Response Element-Binding Protein

DMEM - Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

MA – Membrana Amniótica

MAH - Membrana Amniótica Humana

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

OCT-4 - Octamer-Binding Transcription Factor 4

PA – Âmnio placentário

PBS - Phosphate Buffered Saline

RA – Âmnio refletido

SOX2 - Sex Determining Region Y-Box 2

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Placenta	17
3.2 Membrana Amniótica	17
3.3 Membrana Amniótica: Divisão Anatômica e Sub-Regiões	18
3.4 Aplicações Terapêuticas e Propriedades da MA	21
3.5 Formas de Preservação da Membrana Amniótica Humana	25
4 METODOLOGIA	30
4.1 Colheita da placenta e processamento da membrana amniótica humana	30
4.2 Fragmentação da membrana amniótica e divisão em sub-regiões	31
4.3 Grupos experimentais	32
4.4 Microscopia eletrônica de varredura	32
4.5 Análises	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Aspectos macroscópicos	34
5.2 Padronização dos aspectos microscópicos	35
5.3 Análise das sub-regiões	37
5.3.1 Sub-região R1 (região central)	38
5.3.2 Sub-região R2 (região intermediária)	38
5.3.3 Sub-região R3 (região periférica)	39
5.3.4 Sub-região R4 (âmnio refletido)	39
5.4 Análise dos Métodos de Preservação	40
5.4.1 Grupo Controle	40
5.4.2 Grupo Fresca	40
5.4.3 Grupo Criopreservada	41
5.5 Achados Microscópicos Diferentes	45
5.5.1 Células Alongadas	45
5.5.2 Células “Aranha”	45
5.5.3 Variação dos Microvilos	45

6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	60
ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	66
ANEXO C: RESUMO APRESENTADO NO SIMPÓSIO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA DO VALE DO PARAÍBA.....	68

1 INTRODUÇÃO

A placenta é geralmente reconhecida por funções importantes como nutrição, respiração e excreção, bem como manutenção da tolerância materno fetal. As células da placenta, membranas placentárias, cordão umbilical e líquido amniótico, são fontes com potencial para regeneração, apresentando grande capacidade imunomoduladora em aplicações terapêuticas (AYALAPURAM; YADAV; ANNAM, 2017). O progresso no entendimento da biologia e das propriedades das células tronco da placenta e das membranas fetais, incluindo a membrana amniótica (MA), incentivaram os pesquisadores a explorar seus efeitos potenciais em modelos de doenças em animais, na esperança de aumentar seu uso em diferentes aplicações clínicas (PAROLINI; CARUSO, 2011).

A membrana amniótica (MA) é a camada mais interna das membranas fetais, que envolve e protege o feto e que, juntamente com a placenta, é descartada após o parto. É composta por uma monocamada de células epiteliais amnióticas humanas, aderidas em uma membrana basal, e o estroma subjacente que envolve as células estromais da membrana amniótica humana (PAROLINI *et al.*, 2008). Adicionalmente, é um material existente em alta quantidade, com baixos custos de processamento, e seu uso não apresenta conflitos éticos e/ou religiosos (ARRIZABALAGA; NOLERT, 2018).

Devido a sua estrutura única, em adição às suas propriedades mecânicas (estabilidade, resistência, flexibilidade, e permeabilidade) e biológicas (anti-inflamatória, antifibrótica, antimicrobiana, pró e anti-angiogênica, antitumorgênica e promotora de epitelização e cicatrização), a MA é um biomaterial natural, biocompatível e degradável utilizado como *scaffold* em várias aplicações na engenharia tecidual e medicina regenerativa, incluindo reparo de córnea, tratamento de feridas crônicas, reparo de tendão, de nervo, reconstrução genital, microvascular e intraoral (TEHRANI *et al.*, 2021; FÉNELON *et al.*, 2021). Como *scaffold*, a membrana pode ser usada de 3 diferentes maneiras: 1) com o epitélio amniótico; 2) sem o epitélio amniótico (MA desnuda) (NICKNEJAD *et al.*, 2008); e 3) com o estroma amniótico (JERMAN; VERANIČ; KREFT, 2014; ARRIZABALAGA; NOLERT, 2018).

As propriedades funcionais da MA são atribuídas às suas características morfológicas e aos fatores biológicos solúveis e insolúveis produzidos pelas células e presentes no estroma da membrana, o que torna imprescindível a preservação da sua integridade, tanto do lado epitelial, quanto do lado mesenquimal ou estromal, para que a membrana exerça seus efeitos terapêuticos. A MA na forma fresca é um biomaterial pronto para o uso, que não precisa de processamento e pode ser preparado pelos próprios hospitais para suas necessidades. No entanto, apesar dos

testes sorológicos das doadoras, do processamento em condições estéreis e do armazenamento em solução tampão contendo antibióticos, o risco de infecção, devido ao período de “janela” entre infecção e soroconversão, torna necessário preservar a MA antes que ela possa ser empregada para uso clínico ou experimental (NIKNEJAD *et al.*, 2011; RIAU *et al.*, 2011).

Considerando a grande área da membrana amniótica obtida de placentas humanas a termo ($\pm 1,876 \pm 307 \text{ cm}^2$) (MILLAR *et al.*, 2000), ela é anatomicamente dividida nas seguintes regiões: membrana amniótica placentária, refletida e umbilical. Estudos recentes mostram que as regiões amnióticas diferem consideravelmente em suas propriedades, como estrutura histológica, ultraestrutura, capacidade proliferativa e de diferenciação celular, quantidade e secreção de fatores bioativos, transparência e resistência, e assim podem influenciar o potencial da membrana na regeneração tecidual em diferentes aplicações clínicas (WEIDINGER *et al.*, 2021).

Diferentes métodos foram propostos para a preservação da membrana amniótica, incluindo, liofilização, desidratação, vitrificação e criopreservação (-80°C) (RIAU *et al.*, 2010; LEAL-MARIN *et al.*, 2020), sendo que cada um destes métodos tem suas próprias vantagens e desvantagens, e devem ser cuidadosamente explorados para garantir a qualidade da membrana como biomaterial nas diferentes aplicações clínicas. Para tanto, é de grande importância a temperatura, a duração do armazenamento, e se o método for o de criopreservação, deve ser considerado o uso ou não de agentes crioprotetores (glicerol e DMSO). Ademais, devido à complexidade dos diferentes tecidos cada método afeta as propriedades da MA diferentemente (LEAL-MARIN *et al.*, 2020).

A falta de padronização entre os laboratórios relacionada às regiões anatômicas de onde são removidos os fragmentos de MA (PAROLINI; CARUSO, 2011), as variações na MA de diferentes doadoras e na membrana de uma mesma doadora (DUA *et al.*, 2010), e os diversos protocolos para a preservação da MA foram motivadores para a análise do impacto dos diferentes métodos de armazenamento e preservação sobre a morfologia superficial nas diferentes sub-regiões da membrana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a morfologia da MA nas diferentes regiões anatômicas, âmnio placentário e âmnio refletido, e nos lados epitelial e mesenquimal, com diferentes métodos de preservação, por meio da microscopia eletrônica de varredura.

2.2 Objetivos Específicos

1. Otimizar o método de MEV para o estudo da MA por meio da investigação dos aspectos macroscópicos da MA antes de ser submetida ao microscópio eletrônico de varredura;
2. Avaliar a morfologia superficial por MEV da MA obtida da região PA nas suas diferentes porções (central, intermediária e periférica), e da região RA:
 - Imediatamente após seu processamento, e sem nenhum método de preservação;
 - Após preservação em meio DMEM e armazenamento à temperatura ambiente por 18h;
 - Após preservação em meio DMEM/glicerol 1:1 (v/v) e armazenamento à -80°C por um período de 30 dias.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Placenta

Conforme o Ministério da Saúde (BRASIL, 2015), em publicação na Universidade Aberta do SUS (UNA-SUS), a placenta realiza a comunicação entre o corpo da mãe e o feto, facilitando a troca de nutrientes para proteger e sustentar a gravidez. Além de filtrar o sangue da gestante, eliminando tudo o que é nocivo, ela transporta oxigênio, glicose, cálcio e água, entre outras substâncias, para o bebê. Também estimula hormônios da gestação, como o estrogênio, a progesterona e o lactogênio, fundamental para a produção de leite.

A placenta é um órgão feto-materno, de formato redondo, que tem diâmetros variáveis, 15 a 20cm e espessuras entre 2 e 3 cm. A parte fetal da placenta é composta pelo disco placentário, membranas amnióticas e coriônicas, frequentemente chamadas de membranas fetais, e o cordão umbilical. O lado materno é composto pela decídua basal, que é derivada do endométrio (TEOFILI *et al.*, 2018)

Nos últimos anos, além do uso de fragmentos de toda a membrana amniótica (MA) como material cirúrgico, muita atenção foi dada aos diferentes tipos de células que podem ser isoladas da placenta. O progresso no entendimento da biologia e das propriedades dessas células incentivou os pesquisadores a explorar seus efeitos potenciais em modelos animais de diferentes doenças, na esperança de futuras aplicações clínicas (PAROLINI; CARUSO, 2011).

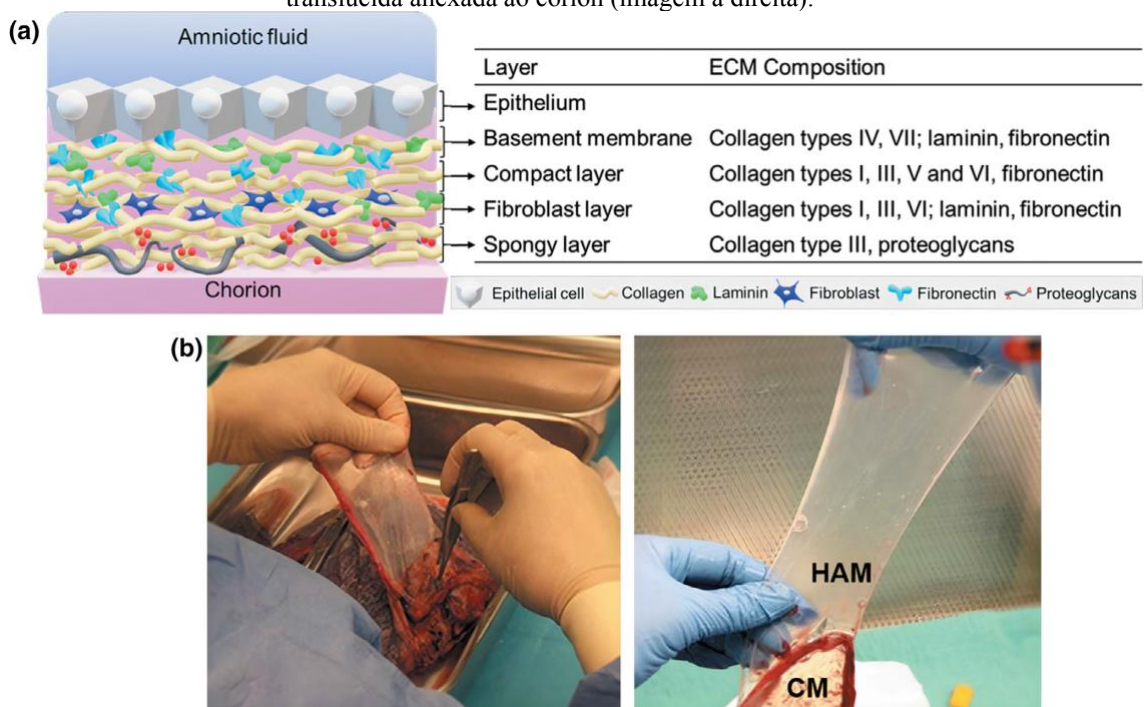
3.2 Membrana Amniótica

As membranas amniótica e coriônica, também chamadas de âmnio e córion, respectivamente, fazem parte da porção fetal da placenta. O âmnio está em contato com o feto, enquanto o córion está adjacente ao endométrio, tecido materno (LEAL-MARIN *et al.*, 2020). A membrana amniótica humana (MA), também conhecida como o âmnio, é camada mais interna das membranas fetais, frouxamente anexada à membrana coriônica ou córion. Juntas, essas membranas fetais formam o saco amniótico, que contém o embrião e o líquido amniótico durante a gravidez. Ambas as membranas são frouxamente conectadas por meio de uma camada esponjosa de colágeno, o que facilita sua separação (ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2018).

A membrana amniótica é uma membrana fina, translúcida, avascular, e sem a presença de nervos ou músculo, com espessura entre 20 e 50 μ m e constituída de cinco camadas diferentes, incluindo uma camada de epitélio, uma membrana basal, uma camada compacta,

uma de fibroblastos, e uma camada esponjosa (Figura 1a) (LEAL-MARIN *et al.*, 2020). A membrana basal contém colágeno Tipo IV e VII, fibronectina, laminina, bem como ácido hialurônico secretado pela camada epitelial. A camada compacta é composta de colágeno I e III sintetizado por células-tronco mesenquimais, enquanto a camada de fibroblasto contém macrófagos (LEAL-MARIN *et al.*, 2020). Ademais, na camada esponjosa predominam proteoglicanos e glicoproteínas que lhe conferem um aspecto esponjoso em preparações histológicas, e fibras colágenas do Tipo III, organizadas frouxamente, região onde ocorre a separação manual da MA do córion (NIKNEJAD *et al.*, 2008; PAROLINI *et al.*, 2008). Por último, a camada esponjosa permite que a MA deslize sobre o córion. A separação entre MA e o córion pode ser observada na Figura 1b (LEAL-MARIN *et al.*, 2020).

Figura 1: (a) Representação esquemática da estrutura de MA e composição da matriz extracelular para cada camada. (b): Aspecto geral das membranas fetais humanas (imagem à esquerda). A MA é uma fina camada translúcida anexada ao córion (imagem à direita).



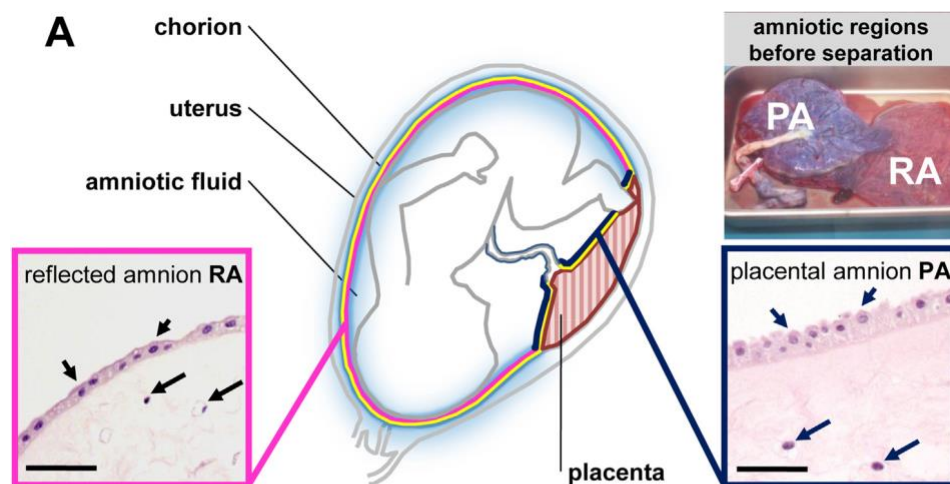
Fonte: Leal-Marín *et al.*, (2020)

3.3 Membrana Amniótica: Divisão Anatômica e Sub-Regiões

A MA embora constituída por 5 camadas histológicas em toda a sua extensão, é referida como uma estrutura única e contínua. Entretanto, anatomicamente dividida é nas seguintes regiões: âmnio placentário, âmnio refletido, e âmnio que cobre a superfície do cordão umbilical (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006).

Han e seus colaboradores, em 2008, fizeram observações empíricas das diferenças histológicas regionais, especialmente entre o âmnio placentário e o refletido, levantando a hipótese que o âmnio humano é biologicamente heterogêneo. Para testar essa hipótese, eles analisaram, por microarrays, o impacto da região na expressão global de 17 genes, mostrando uma expressão diferencial entre o âmnio placentário e o âmnio refletido, sugerindo que o âmnio aparentemente homogêneo, é biologicamente heterogêneo. De acordo com Banerjee *et al.* (2015) a região do âmnio placentário demonstra atividade mitocondrial significativamente maior. Portanto, especularam que o âmnio placentário (PA) pode ter maior capacidade antioxidante. Juntos, esses fatores podem impactar criticamente sua funcionalidade, propriedades secretoras, potencial de diferenciação e enxerto celular e destino das células da MA, que devem ser considerados para fins de regeneração de tecidos.

Figura 2: Diferenciação topográfica e morfológica do âmnio placentário e âmnio refletido.



Fonte: Banerjee et al., 2015

Deihim, Yazdanpanah e Niknejad (2016), observaram diferenças na transparência entre regiões. Os âmnios foram extraídos de regiões placentárias e refletidas de placentas obtidas por cesarianas eletivas, com o objetivo de avaliar os efeitos da remoção da camada epitelial (descelularização) e da camada esponjosa sobre a transparência e espessura das membranas fresca e liofilizada. A superfície epitelial da MA foi avaliada por análise histológica e microscopia eletrônica de varredura. A região refletida era mais fina e mais transparente do que a região do âmnio placentário. A partir da análise histológica observou-se que a principal fonte de diferença entre as regiões placentárias e refletidas do âmnio está relacionada às células da camada epitelial. O processo de descelularização melhorou a transmissão de luz da MA, tanto na região do âmnio placentário, quanto na região refletida.

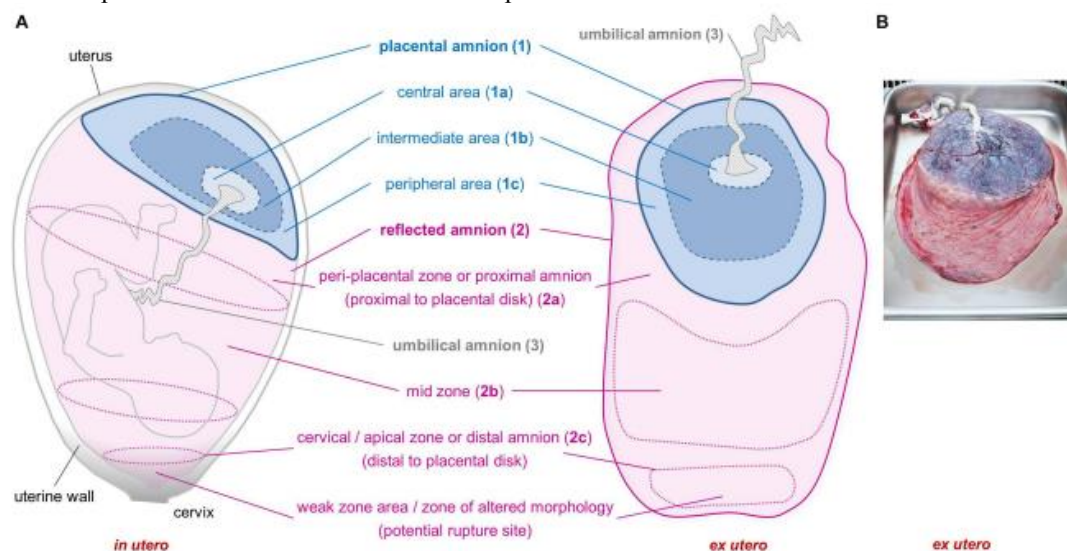
Em seu estudo, Litwiniuk et al. (2018) sugeriram que MA de parto natural (fisiológico), são caracterizadas por altas concentrações de fatores de crescimento e reguladores do turnover da matriz extracelular, que estimulam o processo de regeneração de tecidos. Portanto, pode ser mais adequado ser aplicado no tratamento de feridas que não cicatrizam. Por outro lado, as membranas amnióticas obtidas de cesariana eletivas, especialmente em suas porções cervicais, são relativamente pobres em fatores pró-angiogênicos. Essas características poderiam ser potencialmente benéficas, por exemplo, para aplicações oftalmológicas, como fechamento de lesões da córnea e reconstrução da superfície ocular, onde a estimulação da proliferação de fibroblastos ou a angiogênese não é desejada.

Benerjee *et al.* (2018), avaliaram as propriedades específicas das mitocôndrias das células da membrana amniótica humana e caracterizaram parâmetros bioenergéticos de 2 sub-regiões da membrana, os âmnios placentário e refletido. Encontraram concentrações mais altas de ATP no âmnio placentário em comparação com o âmnio refletido. Ademais foram detectados níveis significativamente diferentes de adenosina trifosfato (ATP) e espécies reativas de oxigênio extracelulares, concentrações de succinato desidrogenase e lactato após a inibição da ATP sintase, tanto no âmnio refletido quanto no placentário. O âmnio placentário difere em morfologia e atividade funcional, pois esta região possui atividade mitocondrial significativamente maior, e menos Espécies Reativas de Oxigênio. Com base nas diferenças significativas dos parâmetros-chave do metabolismo energético nas 2 sub-regiões do âmnio, o estudo sugeriu que essas diferenças sejam consideradas, quando da escolha entre âmnio placentário e âmnio refletido, uma vez que elas podem ter um impacto crítico nas aplicações terapêuticas. A inclusão de propriedades metabólicas específicas da região poderia otimizar e ajustar a aplicação clínica da membrana amniótica humana e melhorar o resultado significativamente.

A MA foi mapeada em 4 regiões diferentes de acordo com sua posição em relação ao cordão umbilical: área central, intermediária, periférica e refletida. Os resultados encontrados por Centurione et al. (2018) demonstraram a presença de epitélio de múltiplas camadas em diferentes áreas da MA, exceto na área intermediária, com uma série de células que brotam ou se destacam, bem como células apoptóticas, especialmente na área central. Notavelmente, a área central, localizada próximo ao cordão umbilical, mostrou muitas diferenças morfológicas em comparação com outras áreas da MA. Observaram que as áreas periféricas e refletidas têm a maior expressão de OCT-4 e SOX-2 *in situ*, indicadores bem conhecidos de pluripotência. Além disso, a área periférica também expressou os maiores níveis de CREB e sua forma ativa

p-CREB, bem conhecida por seu papel fundamental em inúmeros processos, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose celular.

Figura 3: (A) Âmnio placentário (azul), âmnio refletido (rosa) e cordão umbilical cinza. (B) Imagem da placenta e membranas fetais antes do processamento da membrana amniótica.



Fonte: Weidinger *et al.*, 2021

3.4 Aplicações Terapêuticas e Propriedades da MA

A MA foi usada pela primeira vez para a reconstrução de pele pelo Dr. Davis em 1910. Posteriormente, a MA foi empregada em uma ampla gama de aplicações: curativos cirúrgicos, tratamento de queimaduras e úlceras, reconstrução da cavidade oral, bexiga e vagina. Na década de 1940, as primeiras aplicações oftálmicas da MA para o tratamento de defeitos em conjuntivas e queimaduras químicas foram relatadas. Houve inicial interesse por este biomaterial que, em seguida, desapareceu provavelmente devido a regulamentos mais rigorosos sobre transplantes de tecidos, e a MA quase desapareceu da literatura por cerca de 50 anos (VERSEN-HOYNCK *et al.*, 2004, DUA *et al.*, 2010). O ressurgimento da MA aconteceu na década de 1990, quando foi relatado por Kim e Tseng (1995) como um *scaffold* ou suporte eficaz para reconstrução de superfície ocular. Novos protocolos de preparação, preservação e técnicas de armazenamento também foram desenvolvidos neste mesmo período, auxiliando a MA a ganhar significância para oftalmologia e aplicações dermatológicas sem a preocupação da transmissão de doenças pelo tecido fresco não processado. (ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2018)

Nejad *et al.* (2021) demonstraram que a MA tem sido amplamente adotada para curativos de queimaduras e reconstrução da superfície ocular. Novas aplicações clínicas também são atualmente exploradas, como envolvimento de nervo, reconstrução da cavidade

oral, reparo do tendão flexor, e o tratamento de deficiência de células-tronco límbicas. Nos últimos 5 anos as áreas que mais realizaram estudos clínicos com a MA foram: dermatologia, ortopedia, oftalmologia, odontologia e urologia, sendo que mais de 50% dos estudos foram realizados nos Estados Unidos da América, sendo seguido pela China, Egito, Irã e Alemanha.

Na urologia, a MA tem sido empregada para agenesia vaginal. As vantagens do âmnio para a vaginoplastia são sua disponibilidade, baixo custo, por ser mais fisiológico e não requerer cicatriz adicional como na vaginoplastia com enxerto de pele (VATSA *et al.*, 2017). Na ortopedia a MA tem sido usada, por exemplo, para envolver o local de reparo do tendão flexor com o objetivo de diminuir o processo fibrótico e a adesão do tendão aos outros tecidos moles adjacentes, e consequentemente acelerar o processo de reparação (PRAKASH; KALRA; DHAL, 2020).

As propriedades da MA, como imunomodulação, efeito antimicrobiano, e capacidade pró-regenerativa devidas, por exemplo à presença de diferentes fatores de crescimento, indicaram na revisão realizada por Nejad *et al.* (2021) que a MA pode ser usada como uma cobertura para a parte exposta da raiz de dentes acometidos com recessão gengival. Além disso, a reconstrução da cavidade oral (língua, mucosa bucal, vestibulo, mucosa palatina, e assoalho da boca) pode ser alcançada pela aplicação de MA desidratada, entre outros métodos de preservação.

A MA também é usada como andaime, *scaffold*, na engenharia dos tecidos, por apresentar propriedades mecânicas favoráveis. De acordo com as pesquisas realizadas por Elahi *et al.* (2019), a periodontite é uma condição inflamatória crônica do periodonto. À medida que avança, resultará na perda das estruturas de suporte do dente, tal como osso alveolar, cemento e ligamentos periodontais, e, eventualmente, leva à perda do dente. Para a regeneração de tecidos, vários métodos podem ser empregados, mas são técnicas lentas e dependem da gravidade do dano e da capacidade regenerativa do hospedeiro. Por outro lado, a engenharia de tecidos pode superar esses problemas usando, por exemplo a MA como um *scaffold* natural onde são cultivadas células com capacidade regenerativa para restaurar as estruturas do periodonto.

A capacidade de reparo da cartilagem articular é muito limitada devido à sua natureza avascular. Atualmente, não existem tratamentos farmacêuticos eficazes para osteoartrite, também não há abordagens cirúrgicas para seu tratamento. Segundo Díaz-Prado *et al.* (2010) a MA possui abundantes componentes naturais da cartilagem, que são importantes na regulação e manutenção do metabolismo normal dos condrócitos, o que sugere que a MA é um excelente candidato para uso como *scaffold* natural para engenharia de tecido de cartilagem. A MA com

condrócitos cultivados mostrou boa integração com a cartilagem nativa e o novo tecido sintetizado era constituído por camadas de células com morfologia arredondada e características semelhantes aos condrócitos. Os condrócitos migraram da MA para penetrar nas profundidades das cavidades e fissuras na cartilagem (osteoartrite). A morfologia do tecido de reparo exibiu uma aparência fibrosa e alta celularidade.

Os enxertos atuais usados em cirurgia corretiva de defeitos cardíacos não têm alcançado o resultado esperado quanto à duração e ao crescimento. Os pacientes receptores geralmente requerem várias reoperações. A engenharia de tecidos objetiva desenvolver um andaime baseado em âmnio, adequado para aplicações de tecidos cardiovasculares e uso *in vivo*. Assim, foi criado um *scaffold* com âmnio humano por um processo de descelularização enzimática seguido de liofilização, como uma estrutura única ou de várias camadas. Essas estruturas foram comparadas ao âmnio nativo para a viabilidade das células semeadas e propriedades biomecânicas, e a seguir avaliar a biocompatibilidade *in vivo*. Foi demonstrado que, enquanto o tecido de âmnio nativo suportou pouco crescimento celular, o âmnio descelularizado permitiu o enxerto e a sobrevivência celular. Além disso, a preservação do suporte por liofilização como uma única camada permitiu o enxerto e o crescimento das células (SWIM *et al.*, 2018).

O sucesso dessas aplicações terapêuticas é devido às propriedades da membrana amniótica, que são atribuídas à presença de fatores biológicos solúveis e insolúveis presentes em sua estrutura (SILINI *et al.*, 2013; KOPACZKA *et al.*, 2016). Quando utilizada no corpo humano, ela adere sem esforço à superfície da ferida, reduz cicatrizes, diminui a dor, promove cicatrização e tem baixo risco de imunogenicidade (ARRIZABALAGA; NOLLERT, 2018). A MA tem características vantajosas, incluindo: (a) efeitos anti-inflamatórios devido à produção de fatores anti-inflamatórios como ácido hialurônico; (b) supressão de citocinas; (c) propriedades antibacterianas, devido a moléculas de defesa como β -defensinas e elafina; (d) propriedades antifibróticas, devido à regulação negativa de TGF- β e expressão de seu receptor; (e) baixa antigenicidade; bem como (f) propriedades imunomodulatórias, como resultado do fator secretado pelas células epiteliais, que inibe a migração de macrófagos e células natural killer (glóbulos brancos) para proteção ao ataque imunológico materno (LEAL-MARIN *et al.*, 2020).

A forma de uso da membrana implica diretamente sobre sua resposta. Niknejad e seus colaboradores, em 2013, avaliaram por meio de um modelo experimental em ratos, se a propriedade angiogênica apresentada pela MA era lado dependente. Então, retiraram uma camada de pele da região dorsal dos ratos e aplicaram a MA em seu lugar. Em um dos grupos experimentais o lado epitelial da MA estava voltado para cima, enquanto no outro grupo o lado

voltado para cima era o mesenquimal. Depois de uma semana da colocação da MA, foi realizada microscopia intravital que mensurou o número de novos vasos e sua extensão. No grupo em que a camada epitelial estava voltada para cima, a quantidade de vasos em crescimento aumentou de forma significativa, já o grupo em que a camada mesenquimal estava voltada para cima apresentou um efeito inibidor na angiogênese, tendo redução do número de novos vasos. Este estudo demonstrou que a MA possui efeitos pró e antiangiogênicos, dependendo do lado em contato com o tecido, ou seja, tem propriedades diferentes em cada região.

Estudos pré-clínicos prévios provaram que o transplante de fragmentos de MA em modelo experimental de fibrose hepática biliar, sobre a superfície do fígado de ratos, reduziu em 50% a área ocupada pela deposição de colágeno no tecido hepático, inibindo a progressão da fibrose para o estágio avançado, a cirrose, comprovando a atividade antifibrótica da membrana (SANT'ANNA *et al.*, 2016; MAMEDE; SANT'ANNA, 2019). Assim como Amorim *et al.* (2021), também em estudo pré-clínico, avaliaram o processo de reparo tecidual de queimaduras tratadas com fragmentos de membrana amniótica humana (MAH) em ratos. A aplicação do fragmento de MA diminui o risco de infecção por cobrir a área lesada, pois atuou como barreira física e biológica contra invasão de microrganismos. Uma vez que o âmnio é capaz de promover a umidade da lesão, evita irritação e ressecamento da ferida, tendo em vista o fato de que manter a superfície da ferida umedecida e oxigenada acelera o processo de migração celular, observou-se nesse estudo a formação precoce da crosta nas lesões tratadas decorrentes dessas propriedades.

Além das propriedades biológicas, a MA apresenta propriedades mecânicas como estabilidade, resistência, flexibilidade e permeabilidade, permitindo que ela seja um potencial *scaffold* ou substrato para o crescimento, adesão e migração celular, características necessárias para a engenharia tecidual. (NIKNEJAD *et al.*, 2008). Segundo Leal-Marin *et al.* (2020) as propriedades de elasticidade, rigidez e tração à força estão relacionadas à composição da placenta. A orientação das fibrilas de colágeno na matriz extracelular é responsável pela resistência à tração, enquanto a deformação elástica está relacionada à presença de fibras de elastina, laminina, ácido hialurônico e glicosaminoglicanas (LEAL-MARIN *et al.*, 2020). Interessante que o tipo de parto e a região de onde são obtidos os fragmentos de MA são fatores que afetam as propriedades mecânicas. Grémare *et al.* (2019) estudaram a variação nas propriedades mecânicas considerando 2 regiões anatômicas da MA, demonstrando que o âmnio placentário é muito mais forte e extensível (82%) do que o âmnio periférico (19%). Assim, esta região da membrana pode ser o biomaterial de escolha no caso do desenvolvimento de *scaffolds*

na engenharia de tecidos, onde as propriedades mecânicas desempenham um papel fundamental.

3.5 Formas de Preservação da Membrana Amniótica Humana

Nas aplicações clínicas ou nos estudos experimentais a MA tem sido usada na forma fresca ou na forma preservada. Diferentes métodos foram propostos para a preservação da MA, incluindo hipotermia (4°C), liofilização, desidratação, vitrificação e criopreservação à -80°C (HENNERBICHLER *et al.*, 2007; RIAU *et al.*, 2011).

Adds, Hunt e Dart (2001) avaliaram a viabilidade das células da camada epitelial da MA quando preservada na forma fresca (armazenamento a 4°C) e na forma criopreservada (armazenamento a -80°C em DMEM mais glicerol), assim como o efeito da aplicação da MA no olho de pacientes com pênfigo cicatricial. Relataram diminuição na viabilidade das células nas duas formas de preservação, porém uma melhora similar na acuidade visual. Entretanto, a MA na forma fresca, não foi tão eficaz em promover a reepitelização da córnea, quanto a forma criopreservada. Exceto o risco de transmissão de doença, pela impossibilidade de refazer os testes sorológicos, o uso na forma fresca, possui mais duas dificuldades. Primeiro, uma questão logística, ou seja, a necessidade de encontrar uma doadora antes do procedimento cirúrgico, para poder realizar testes e processamento, juntamente com a coordenação para que o recipiente esteja no hospital no mesmo momento. Segundo, a MA fresca deve ser preparada para apenas um paciente, o resto dos fragmentos deve ser descartado. Assim, considerando o resultado clínico do estudo e estas questões, os autores sugerem a adoção na forma criopreservada.

Assim, quando a MA é usada para aplicação clínica, a criopreservação é frequentemente empregada em vez da MA na forma fresca, pois permite o armazenamento por longos períodos antes de seu uso, possibilitando a repetição dos testes sorológicos realizados no período pré-natal, a fim de eliminar qualquer risco biológico. Também permite o armazenamento de vários fragmentos da MA (mais de 30 por placenta) em um banco de tecidos, e o uso em várias aplicações clínicas (ADDS; HUNT; DART, 2001, PEREPELKIN *et al.*, 2016; CHÁVEZ-GARCÍA *et al.*, 2016).

Segundo Thomasen *et al.* (2009) a criopreservação é o método de preservação mais comum para a MA, e tem a vantagem de existirem vários estudos experimentais e clínicos publicados, confirmando a segurança e eficácia do método.

Segundo Niknejad *et al.* (2011), tanto o método de liofilização, quanto o de criopreservação, podem alterar as propriedades mecânicas e histológicas da MA. O estudo

demonstrou que os componentes da matriz extracelular da membrana basal foram bem preservados tanto quando frescos quanto criopreservados. Entretanto, na criopreservada a MEV demonstrou danos nas junções intercelulares da camada epitelial, enquanto a liofilizada preservou estes componentes, sendo assim superior para uso como *scaffold* para o crescimento de células endoteliais. Já Thomasen *et al.* (2011), demonstraram que a MA criopreservada em DMEM e glicerol (1:1 v/v) e armazenada por mais de 24 meses preservou os componentes da membrana basal, assim como a camada epitelial. A MA criopreservada com glicerol e DMEM foi usada com sucesso como *scaffold* para a regeneração do epitélio da bexiga urinária, sendo que a proliferação e diferenciação destas células epiteliais foram maiores quando cultivadas sobre o lado mesenquimal ou estromal da membrana íntegra. Ao contrário, Ramuta *et al.* (2020) cultivaram células cancerígenas do epitélio da bexiga em ambos os lados da MA criopreservada, verificando redução maior na proliferação destas células quando o lado epitelial foi usado como *scaffold*.

Nos estudos experimentais com uso de modelo animal, Ricci *et al.* (2013) e Yazdanpanah *et al.* (2015), compararam membranas preservadas tanto na forma fresca quanto na criopreservada, porém com objetivos diversos. Foi demonstrado que as duas formas de preservação da MA produziram efeitos antifibróticos semelhantes quando aplicadas no fígado de ratos com fibrose hepática, ou efeitos angiogênicos, também similares, quando aplicadas na pele dorsal em ratos, respectivamente. Adicionalmente, observaram que mesmo a criopreservação reduzindo a viabilidade celular (entre 16 a 50, a estrutura básica da MA se manteve).

Ferenczy e Souza (2020) publicaram revisão de literatura sobre os vários métodos de preparo e preservação da MA para uso no tratamento de doenças da superfície ocular, relatando que, atualmente dois protocolos são os mais populares para a criopreservação. O primeiro método, introduzido por Lee e Tseng em (1997), consiste no armazenamento da MA em uma solução de 50% glicerol e 50% DMEM a -80°C por até 2 anos, e obtendo, sucesso na transplantação da MA na clínica. O efeito deste método sobre a integridade estrutural e funcional da membrana ainda não foi extensivamente estudado, entretanto, baseado nos dados já disponíveis, é possível assumir que a criopreservação em DMSO tem qualidade similar ao método contendo glicerol.

O glicerol tem a vantagem de ser antiviral, mas parece comprometer a viabilidade celular, por ser particularmente tóxico às células da camada epitelial da MA. Adicionalmente, foi relatado que a criopreservação induz a perda de viabilidade celular devido alterações nas estruturas moleculares causadas pela baixa temperatura, e isso pode interferir no seu uso clínico

(HENNERBICHLER *et al.*, 2007; RIAU *et al.*, 2010). Hennerbichler e seus colaboradores, em 2007, estudaram a influência de várias condições de armazenamento da MA sobre a viabilidade celular, demonstrando que o método de criopreservação por 3 semanas resultou em redução de 13-18% na viabilidade das células epiteliais, enquanto a preservação da MA em temperaturas acima de 0° demonstrou viabilidade celular maior, sendo o meio DMEM, o mais benéfico às células, quando comparado ao meio RPMI, L15 e glicerol.

Quando se considera a estrutura histológica da MA, os estudos mostraram que os métodos de preservação alteram a integridade estrutural da membrana em diferentes graus. Thomasen *et al.* (2009) compararam dois métodos de preservação da MA, a criopreservada em DMEM e glicerol (1:1 v/v) por 1 mês e a desidratada, com objetivo de avaliar a influência destes métodos sobre as proteínas solúveis da MA que estimulam regeneração, os componentes da membrana basal e a habilidade da MA em servir de substrato para cultivo de células epiteliais do limbo. As membranas criopreservadas mantiveram liberação constante das proteínas analisadas (TGF- β 1, CTGF), as células epiteliais do limbo cresceram sobre a MA, e os colágenos tipos IV e VII, laminina e fibronectina, todos componentes da membrana basal da MA, tiveram sua integridade também preservada, em contra ponto da MA desidratada, revelou 30% de crescimento celular, e apenas o colágeno IV e a fibronectina da membrana basal foram mantidos. Adicionalmente, Thomasen *et al.* (2011), utilizando o mesmo método de criopreservação por um período de até 24, meses com análise por imuno-histoquímica, demonstraram que o método manteve também o epitélio da MA integro, além dos componentes da membrana basal preservados.

A membrana amniótica tem sido usada como substrato para o cultivo ou expansão de diferentes tipos celulares e como fonte de células na medicina regenerativa. Niknejad *et al.* (2011) investigaram a viabilidade do uso da MA após diferentes métodos de preservação, em servir de substrato para a expansão *ex vivo* das células endoteliais. Para isto, compararam membranas criopreservadas por 6 meses, liofilizadas e frescas (não preservadas), por meio da análise histológica, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura. Tanto a membrana criopreservada quanto a liofilizada, tiveram os componentes da membrana basal preservados (i.e. colágenos, III, IV, fibronectina, laminina e perlecan). Entretanto, a imuno-histoquímica revelou que a camada compacta da MA criopreservada era mais fina e apresentava menos colágeno Tipo I, quando comparada com a membrana fresca. Neste estudo a MEV foi útil em revelar a morfologia superficial normal do epitélio na membrana fresca; na criopreservada a MEV demonstrou danos nas junções intercelulares deste epitélio; e na liofilizada, não havia sinais de células epiteliais intactas. Embora a MA liofilizada apresentasse

epitélio com maior perda de células e parte da membrana basal exposta, isto permitiu maior adesão das células endoteliais, e conseqüentemente se mostrou superior, quando comparada à fresca e à criopreservada, servindo de substrato para o cultivo de células endoteliais.

Tehrani, Ahmadiani e Niknejad (2013), também compararam membranas criopreservadas por 6 meses, liofilizadas e frescas (não preservadas), com a finalidade de avaliar os efeitos destes métodos na manutenção da propriedade antimicrobiana da MA, por meio do método de difusão por disco, e técnica ELISA para quantificar o principal peptídeo antimicrobiano, a elafina. Assim, diferentes espécies de bactérias foram cultivadas em ágar Muller Hinton e um pedaço de membrana foi colocado sobre a superfície deste ágar. Após 24h de incubação observou-se que a MA, independentemente do método de preservação, inibia o crescimento de certas espécies de bactérias. Entretanto, a quantidade do peptídeo elafina foi significativamente maior na MA fresca, quando comparado à criopreservada e à liofilizada. Importante observar neste estudo, que mesmo com menos elafina, menor viabilidade celular e com áreas de epitélio rompidas, estes dois métodos não interferiram na propriedade antimicrobiana da MA, sugerindo que outros componentes da matriz extracelular ou estroma da membrana exercem efeitos antibacterianos, o que demonstra a importância da manutenção desta camada estrutural da MA.

No estudo de Modaresifar *et al.* (2017), o efeito da criopreservação sobre a atividade anticancerígena e antiangiogênica da MA foi avaliado. As células cancerosas foram tratadas em condição de MA fresca ou criopreservada durante 24 horas, e a viabilidade das células cancerosas foi determinado, pelo ensaio MTT. Para avaliar a angiogênese, o ensaio do anel da aorta de rato foi realizado para MA fresca e criopreservada dentro de 7 dias. Além disso, quatro fatores antiangiogênicos, inibidor de tecido da metaloproteinase-1 e 2 da matriz (TIMP-1 e TIMP-2), trombospondina, e a endostatina foram medidas por ensaio ELISA antes e depois da criopreservação. Os resultados mostraram que a viabilidade de células cancerosas cultivadas diminuiu de forma dependente da dose após o tratamento com o meio de condição da MA fresca e criopreservada e nenhuma diferença significativa foi observada entre MA fresca e criopreservada.

Fénelon *et al.* (2018) exploraram o uso da MA na engenharia de tecidos e medicina regenerativa verificando o potencial da MA na regeneração óssea guiada. Foi avaliada *in vitro* a viabilidade celular da MA fresca e da criopreservada. *In vivo*, avaliou-se o impacto da MA fresca *versus* criopreservada, utilizando os lados epitelial e mesenquimal frente ao defeito, no reparo de defeito ósseo crítico na calvária de ratos. Depois, a eficácia da MA criopreservada associada a um substituto ósseo (neste caso a hidroxiapatita) foi comparada a uma membrana

de colágeno usada atualmente para regeneração óssea guiada. *In vitro*, não houve diferença estatística entre as condições de viabilidade celular. A MA criopreservada, sem estar conjugada a um substituto ósseo, induziu maior formação óssea quando o lado mesenquimal cobriu o defeito em comparação ao controle onde o defeito foi deixado vazio. Quando associada a um substituto ósseo, não houve melhora. Os autores sugerem que a MA criopreservada, em especial o lado mesenquimal, apresenta potencial, porém ainda limitado na regeneração óssea guiada.

Wagner *et al.* (2018) analisaram os efeitos do armazenamento da MA com DMEM e glicerol e da MA armazenada, sem glicerol, e diretamente congelada a -80°C , por 1, 3 e 6 meses. Histologicamente, a estrutura da camada epitelial e mesenquimal (estroma) da membrana não foi afetada por nenhum destes métodos, exceto pelo fato da camada mesenquimal apresentar número reduzido de células, quando comparada à MA fresca. Com relação às propriedades mecânicas, o estudo demonstrou que nenhum dos métodos, com ou sem glicerol, afetou a resistência à tração e o módulo de elasticidade da membrana, mas um longo período de armazenamento (6 meses) aumentou a resistência à tração da MA. Já a viabilidade das células mostrou diminuição significativa nas amostras de MA com e sem glicerol em comparação à MA fresca. A MA criopreservada com glicerol mostrou maior viabilidade celular do que o método de congelamento direto e sem glicerol. Ademais, Ashraf *et al.* (2015) mostraram que o tempo de armazenamento depende da temperatura, pois a MA criopreservada em 20°C e 80°C pode ser armazenada por 4 semanas e/ou 6 meses. É possível armazenar MA em 85% de glicerol a 80°C por um longo tempo.

Fenelon *et al.* (2019), afirmaram que a criopreservação e a liofilização são as mais comumente usadas nos procedimentos de preservação da MA. Utilizaram MA descelularizada, para liofilização e esterilização gama antes de seu uso para permitir armazenamento de longo prazo. A liofilização permite o armazenamento seguro de amostras por vários anos em temperatura ambiente, enquanto a criopreservação requer equipamentos caros que podem estar indisponíveis em algumas instituições, e o tempo de armazenamento não pode exceder 12 a 24 meses. Além disso, a cadeia de frio envolve procedimentos de transporte complexos e as amostras precisam ser descongeladas antes de usar. MA liofilizada parece mais fácil de armazenar, e geralmente é seguida pela esterilização do tecido amniótico por radiação gama. A radiação gama é usada em todo o mundo para produtos médicos, e é considerado mais confiável e eficaz método efetivo para esterilizar aloenxertos de tecido.

4 METODOLOGIA

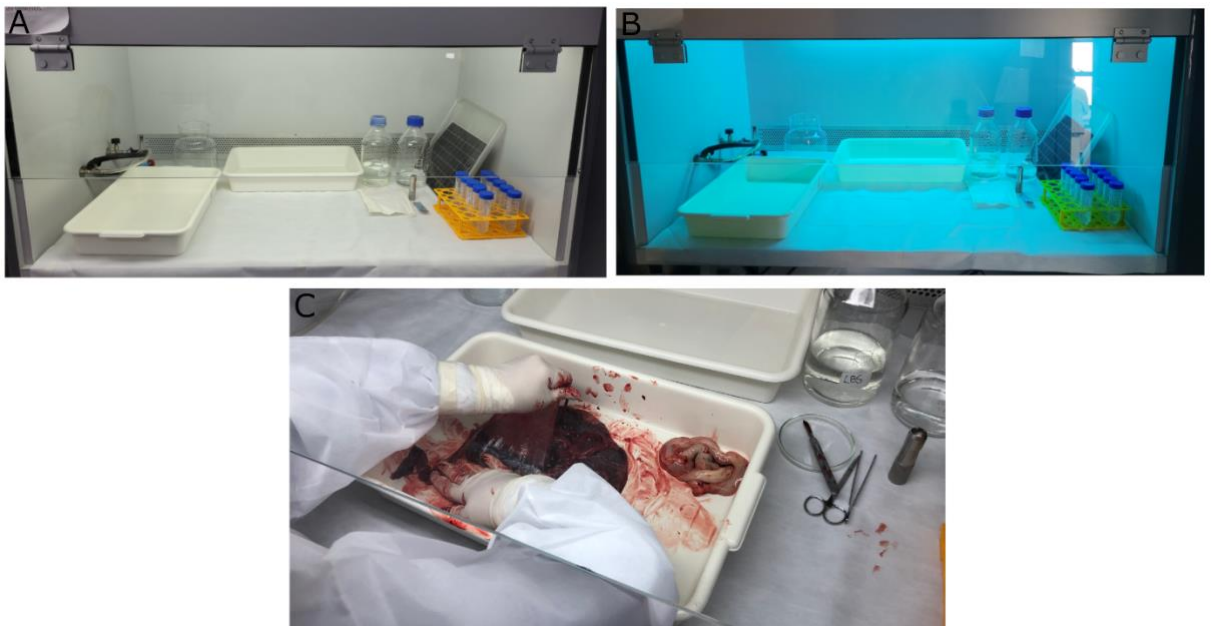
O estudo foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e obteve aprovação com protocolo número 5.172.755.

4.1 Colheita da placenta e processamento da membrana amniótica humana

Foram utilizadas sete placentas humanas a termo, com idade gestacional igual ou superior a 39 semanas, obtidas a partir de cesárias eletivas de pacientes com gestação normal, na maternidade do Hospital Santa Casa de São José dos Campos. A colheita da placenta e suas membranas fetais, incluindo a membrana amniótica, foi realizada somente após o consentimento prévio da parturiente e após certificação de resultados negativos para HIV-1 e 2, hepatite B e C e sífilis.

A MA foi transportada para o laboratório sob refrigeração em torno de 10 a 15°C. No laboratório, em condições estéreis, a MA foi manualmente destacada do córion e lavada extensivamente com solução fisiológica contendo 100U/ml de penicilina, 100Ug/ml de estreptomicina e anfotericina B (figura 4).

Figura 4: Processamento da MA. (A) Fluxo laminar com os materiais utilizados; (B) Fluxo laminar com luz U.V. para a desinfecção dos materiais; (C) Início da separação manual da MA do córion materno.



Fonte: Autor

4.2 Fragmentação da membrana amniótica e divisão em sub-regiões

Imediatamente após o processamento da MA, e passado tempo de preservação em cada grupo experimental, a membrana foi dividida em 4 diferentes sub-regiões de acordo com sua posição em relação ao cordão umbilical (CENTURIONE *et al.*, 2018): R1) Região central – próxima ao cordão umbilical; R2) Região intermediária – no meio (entre as regiões central e periférica); R3) Região periférica – próxima à periferia do disco placentário; R4) Região âmnio refletido. As regiões R1, R2, e R3 fazem parte do âmnio placentário (Figura 6). Em seguida, foi seccionada em fragmentos de $3 \times 3 \text{cm}^2$, os quais foram marcados com um corte em “L” no canto direto superior, de forma a possibilitar a identificação dos lados (epitelial e mesenquimal), e preservados seguindo o protocolo para cada grupo experimental (Figura 5 e 6).

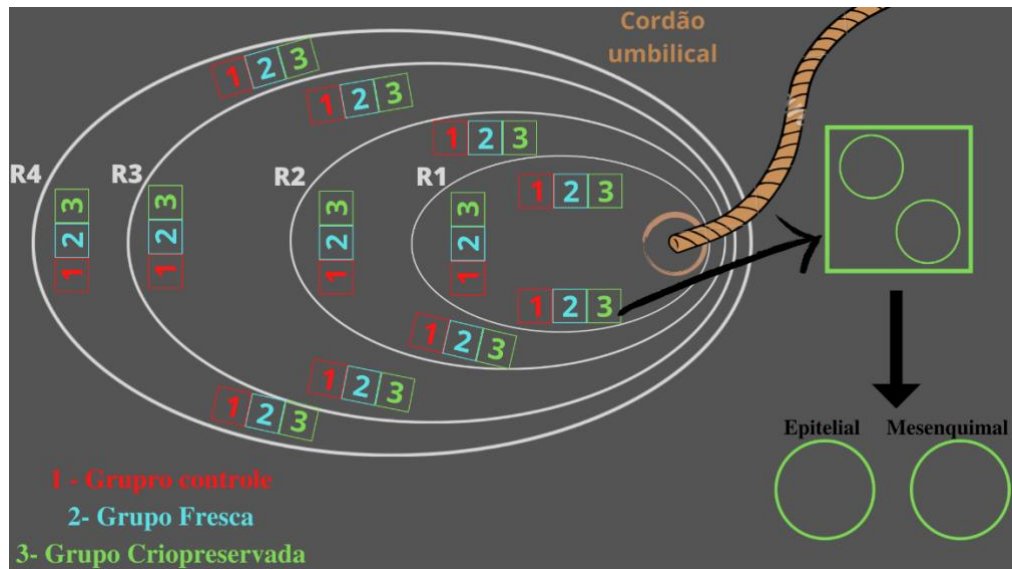
De cada uma das sub-regiões acima descritas foram obtidos 9 fragmentos iniciais de MA, sendo 3 fragmentos do grupo controle, 3 do grupo fresca e 3 do grupo preservada, cada um desses fragmento possuíam a medida de $3 \times 3 \text{cm}^2$, que posteriormente à fixação, cada fragmento foi seccionado em formato circular, com fragmentos de $1 \times 1 \text{cm}^2$, obtendo assim 2 amostras por fragmento inicial. Então, de cada grupo de preservação foram 6 amostras por região, sendo 3 amostras para a análise do lado epitelial da membrana e outras 3 para a análise do lado mesenquimal. Assim, de cada placenta foram obtidos 24 fragmentos, preservados na forma controle, e mais 24 preservados na forma fresca, e mais 24 fragmentos para o grupo criopreservado. No total foram utilizados 72 fragmentos por placenta.

Figura 5: Preparo da MA para sua fragmentação. (A) MA separada do córion, com aspecto transparente e com um espaço central (local do cordão umbilical removido), permitindo dividir as sub-regiões. (B) Forma que a MA foi organizada para corte de sub-regiões. (C) Padrão de corte $3 \times 3 \text{cm}^2$, com marca para diferenciação dos lados (círculo).



Fonte: Autor

Figura 6: Desenho da placenta e cordão umbilical mostrando as sub-regiões, incluindo R1 (região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Os círculos marcados com o número 1, 2 e 3 representam os fragmentos 1x1cm² do grupo controle, fresca e criopreservada, respectivamente, de cada sub-região.



Fonte: Autor.

4.3 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o método de preservação utilizado para a MA. No grupo controle, os fragmentos de membrana processados, foram imersos imediatamente em fixador para a MEV. Já no grupo MA fresca os fragmentos de membrana, foram imersos em meio DMEM a temperatura ambiente (24°C) por 18h. E, no grupo MA criopreservada os fragmentos de membrana, foram imersos em meio DMEM/glicerol 1:1 (v/v) a -80°C por 30 dias.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Antes de iniciar a primeira etapa da MEV, ou seja, para fixação das amostras, as membranas dos grupos MA fresca foram lavadas 3 vezes em PBS 1x (Tampão Fosfato Salino), pH7.2, durante 3 minutos cada, para então realizar a microscopia eletrônica de varredura. No caso do grupo MA criopreservada, as membranas foram inicialmente descongeladas a temperatura ambiente e submetidas ao mesmo procedimento de lavagem descrito acima.

Para o método da MEV, as amostras de todos os grupos experimentais foram fixadas em paraformaldeído 2,5 % e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0.05M, pH7.2, por 2h

em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão PBS 1x, pH7.2, por 3 minutos a cada troca. Após este procedimento, as amostras foram desidratadas, em séries crescentes de etanol (30%, 50%, 70% e 100%), por 5 minutos em cada concentração. A seguir, a solução de etanol 100% foi retirada e adicionada uma solução de 1:1 de etanol 100% e Hexametildissilazano (HMDS) (Sigma Aldrich) por 5 minutos, com objetivo de permitir maior controle do tempo de secagem (AL SHEHADAT *et al.*, 2018). As amostras foram então colocadas em placa de 24 poços em temperatura ambiente, por 24h, até a secagem total da amostra. Na sequência, as amostras foram revestidas com ouro (10 nm) (“sputtering”) pela metalizadora Emitech k550x, montadas no suporte porta-amostra do MEV (“stub”) com auxílio de fita de carbono, e analisadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS – EVO MA 10, instalado na Central Analítica do IPD/UNIVAP. Assim, por meio do MEV a morfologia superficial das amostras de MA, nas diferentes sub-regiões, e em seus lados epitelial e mesenquimal, foi analisada descritivamente comparando os 3 diferentes grupos experimentais. Os critérios para a análise do lado epitelial da MA foram os seguintes aspectos morfológicos: a) formato das células da superfície epitelial; b) espaço intercelular/junção intercelular; c) microvilos na superfície apical e bordas laterais das células epiteliais; d) fendas ou gaps na superfície epitelial. Já para a análise do lado mesenquimal foram usados os seguintes aspectos morfológicos: a) densidade da trama fibrosa de colágeno; b) Homogeneidade da trama fibrosa de colágeno; c) Conformação da superfície mesenquimal.

4.5 Análises

Em todas as micrografias obtidas, foram realizadas as análises comparativa e descritiva. Sendo a primeira mais usada entre mesmas sub-regiões. E a segunda, mais utilizada quando o foco foram os meios de preservação.

5 RESULTADOS

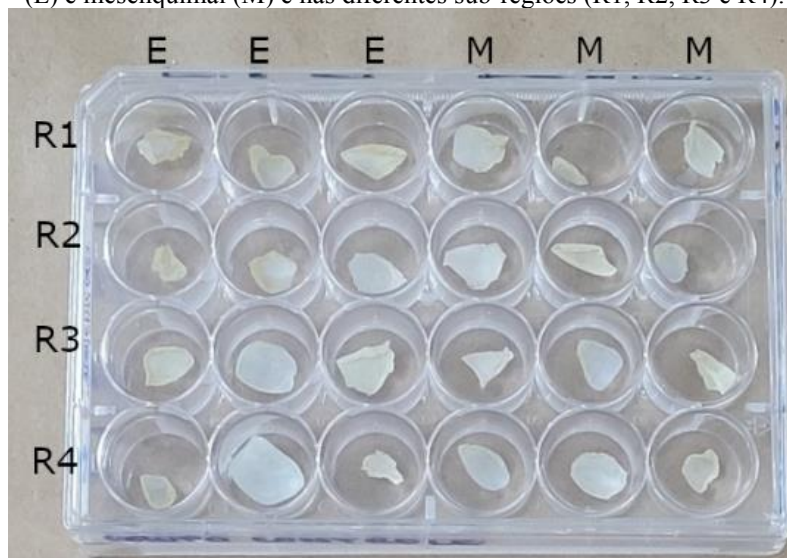
Esta seção descreve os aspectos macroscópicos, e os microscópicos da MA observados ao microscópio eletrônico de varredura.

5.1 Aspectos macroscópicos

As figuras 7 a 9 mostram o aspecto macroscópico da MA após a etapa de secagem, e antes da etapa de metalização do método MEV. Estes aspectos macroscópicos evidenciaram que a etapa da secagem das amostras, logo após a lavagem com PBS 1x, em temperatura ambiente por 12h foi mais eficiente no grupo controle e variou nos grupos fresca e criopreservada.

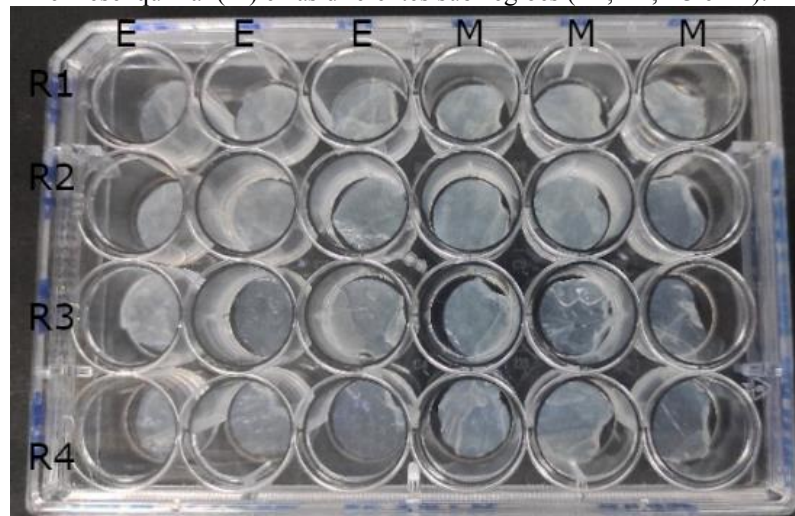
No grupo controle os fragmentos de MA mostraram aspecto opaco, e foram removidos da placa sem dificuldade (Figura 7). No grupo fresca, no momento da fragmentação das amostras foi observado empiricamente que estavam mais edemaciadas, túrgidas e brilhantes, e após a secagem estavam mais transparentes e foram removidas da placa com dificuldade, por estarem mais aderidas à mesma (Figura 8). Já no grupo criopreservada, as amostras ficaram com aspecto intermediário, se mostrando mais opacas do que transparentes, e, portanto, se assemelhando ao grupo controle (Figura 9).

Figura 7: Aspecto macroscópico das amostras de MA do grupo controle, em ambos os lados, epitelial (E) e mesenquimal (M) e nas diferentes sub-regiões (R1, R2, R3 e R4).



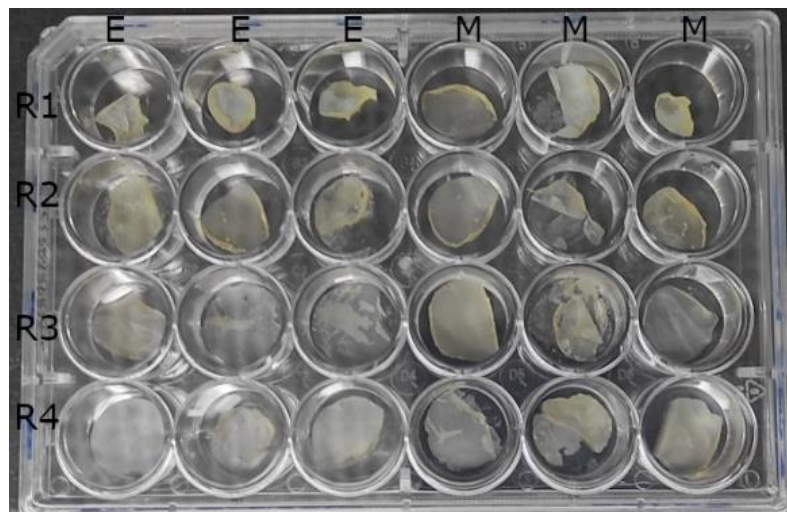
Fonte: Autor

Figura 8: Aspecto macroscópico das amostras de MA do grupo fresca, em ambos os lados, epitelial (E) e mesenquimal (M) e nas diferentes sub-regiões (R1, R2, R3 e R4).



Fonte: Autor

Figura 9: Aspecto macroscópico das amostras de MA do grupo criopreservada, em ambos os lados, epitelial (E) e mesenquimal (M) e nas diferentes sub-regiões (R1, R2, R3 e R4).


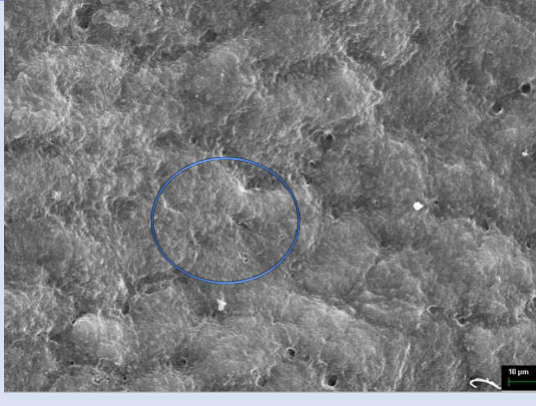
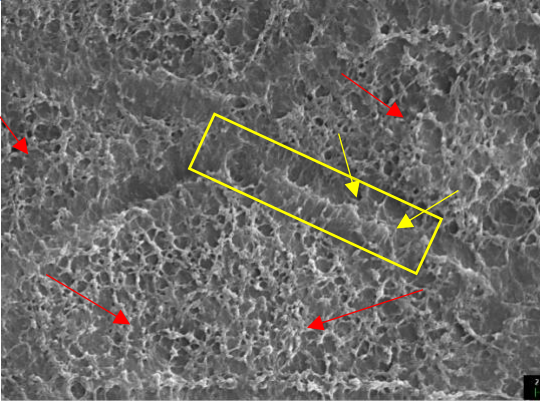
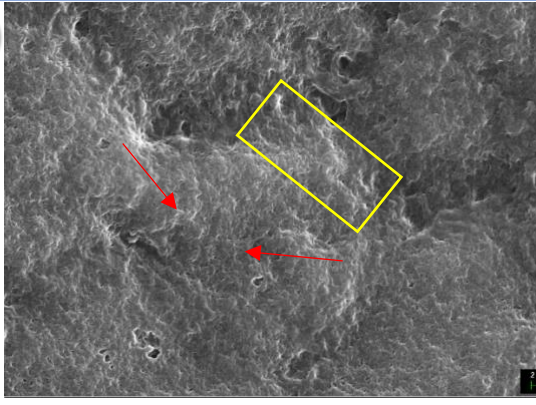


Fonte: Autor

5.2 Padronização dos aspectos microscópicos

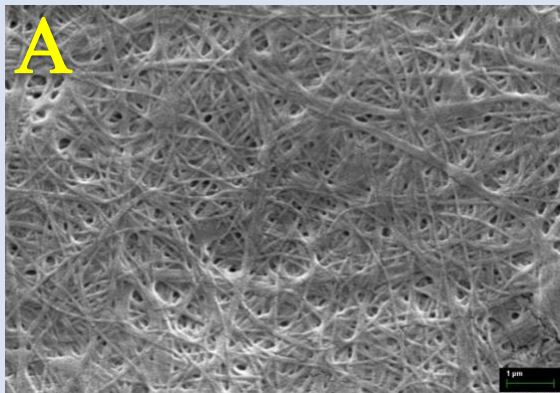
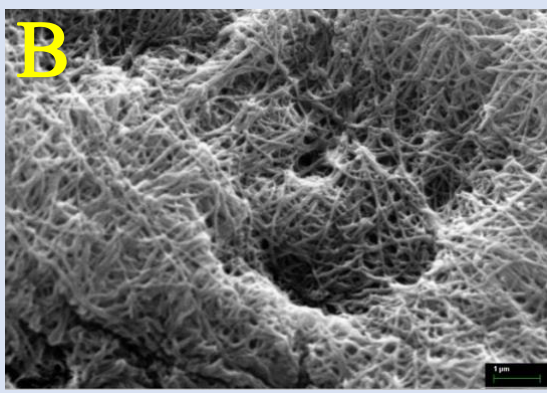
No total, 861 eletromicrografias, provenientes de 7 placentas, foram analisadas por meio da MEV. Primeiramente foram analisadas todas as sub-regiões da MA do grupo controle, sendo possível observar um padrão morfológico de organização celular do lado epitelial, e da trama colágena do lado mesenquimal da MA, o que serviu de referência para a análise das sub-regiões da MA em todos os grupos experimentais (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA apresentando aspecto celular normal da camada epitelial, padrão epitelial 1 (A e B) e padrão 2 (C e D). Barras de ampliação: 10 μ m (1000x) e 2 μ m (3000x).

Padrão Epitelial 1	Padrão Epitelial 2
<p>A</p> 	<p>C</p> 
<p>B</p> 	<p>D</p> 
<p>Superfície epitelial uniforme com células em formato hexagonal (círculo azul), achatadas, em padrão mosaico, com microvilos roliços, densos e aglomerados na região apical das células (setas vermelhas). Junção intercelular bem definida (retângulo amarelo), com microvilos nas bordas laterais das células realizando ligações celulares ou pontes citoplasmáticas (setas amarelas).</p>	<p>Superfície epitelial menos uniforme com células em formato hexagonal (círculo azul), globosas, em padrão mosaico, mas com pouca definição. Microvilos achatados e colabados na região apical das células, sendo difícil a diferenciação (setas vermelhas). Junção intercelular definida apenas no menor aumento (retângulo amarelo).</p>

Fonte: Autor

Quadro 2 – Micrografias eletrônicas representativas do lado mesenquimal da MA com a descrição do aspecto normal da camada mesenquimal (padrão mesenquimal 1 (A) e 2 (B)). Barras de ampliação: 1µm (10.000x).

Padrão mesenquimal 1	Padrão Mesenquimal 2
	
<p>Trama de fibras colágenas densas, definida, organizada, homogênea, e em superfície lisa.</p>	<p>Trama de fibras colágenas densas, definida, não organizada, menos homogênea, e em superfície ondulada, apresentando algumas depressões.</p>

Fonte: Autor

Com os padrões definidos (referências), foi realizada análise descritiva classificatória, comparando os grupos experimentais, em cada sub-região, e em ambos os lados da MA observando o que estava dentro dos padrões de normalidade e o que se repetiu mais vezes em relação as regiões e aos métodos de preservação. As micrografias eletrônicas do lado epitelial da MA estão representadas nas figuras 10 e 11, enquanto as do lado mesenquimal estão representadas na figura 12. As figuras 13, 14 e 15 apresentam achados microscópicos diferentes dos padrões, que foram observados no lado epitelial de algumas membranas, incluindo o formato celular, o espaço intercelular, com microvilos laterais formando as pontes citoplasmáticas e variações nos microvilos da região apical das células.

5.3 Análise das sub-regiões

Descrição das sub-regiões da membrana amniótica humana, sendo do âmnio placentário as sub-regiões R1 (central), R2 (intermediária) e R3 (periférica), e do âmnio refletido, a sub-região R4.

5.3.1 Sub-região R1 (região central)

Em R1, lado epitelial, nos grupos controle e fresca, a morfologia celular se apresentou de forma padrão 1, com superfície uniforme, células hexagonais/pentagonais, junção intercelular bem marcada (retângulo amarelo), e microvilos densos na região apical e nas bordas laterais (setas vermelhas) (Figuras 10 e 11). No grupo criopreservada houve uma pequena mudança, pois observou-se algumas aberturas em forma circular no espaço intercelular (círculo azul), melhor visualizados na figura 10. Importante ressaltar, que por ser a região R1 a mais próxima do cordão umbilical, algumas micrografias, em todos os grupos, apresentaram células mais alongadas, como se fossem iniciar uma mudança de padrão celular (Figura 13).

Para o lado mesenquimal de R1, os grupos controle e fresca apresentaram o padrão 1, com trama colágena bem homogênea, ou seja, sem muita diferença de fibras finas ou espessas, bem densa e compacta e com superfície lisa. Já na criopreservada se repetiu a trama homogênea, densa e compacta, porém, em superfície ondulada, mostrando algumas depressões, próximo do padrão 2 (Figura 12).

5.3.2 Sub-região R2 (região intermediária)

Em R2, lado epitelial, no grupo controle, a morfologia das células inicia uma sutil mudança, para o padrão 2, com superfície menos uniforme, onde as células ficaram ligeiramente mais circulares e globosas do que hexagonais. As junções celulares perderam um pouco a definição (retângulo amarelo). Já os microvilos ficaram mais achatados dificultando sua diferenciação nas células (setas vermelhas). No grupo fresca, tanto a junção intercelular, quanto os microvilos se mostraram com o mesmo aspecto descrito acima, com reduzida definição, lembrando o padrão 2. No grupo criopreservada, a junção celular exibiu formato padrão 1, com junção intercelular mais definida, porém novamente com algumas aberturas em forma circular no espaço intercelular (círculo azul), similar à sub-região R1 do mesmo grupo (Figuras 10 e 11).

Do lado mesenquimal, o grupo controle exibiu um padrão de trama colágena homogênea, em superfície ligeiramente ondulada apresentando regiões de feixes colágenos com depressões e elevações. No grupo fresca, a trama se apresenta bem homogênea, densa com superfície lisa, e discreta perda de definição, padrão 1. No grupo criopreservada, a trama se apresenta semelhante à descrita para o grupo fresca, porém com depressões rasas entre as fibras da trama colágena (Figura 12).

5.3.3 Sub-região R3 (região periférica)

Em R3, lado epitelial, no grupo controle, a morfologia celular ficou fora dos padrões 1 e 2, pois todas as células apresentaram um formato circular. Os microvilos se achataram totalmente colabando com as células (setas vermelhas) e a junção intercelular se manteve com pouca definição (retângulo amarelo). No grupo fresca, as células apresentaram formato totalmente circular, com centro mais elevado, aparentando diferentes tamanhos, os microvilos estavam colabados com as células e espaço intercelular aumentou. No grupo criopreservada, é possível observar que as células mantiveram formato circular e junção intercelular mais definida, porém com aumento das aberturas em formato circular no espaço intercelular (círculo azul), e os microvilos ainda achatados e condensados nas regiões apical e laterais das células (Figuras 10 e 11).

Para o lado mesenquimal, o grupo controle exibiu trama colágena muito densa, compacta e com as fibras colágenas mais heterogêneas, com feixes espessos e finos. Os grupos fresca e criopreservada demonstraram o padrão mesenquimal mais conhecido, padrão 1, consistindo em trama colágena homogênea, densa e com superfície lisa (Figura 12).

5.3.4 Sub-região R4 (âmnio refletido)

Em R4, lado epitelial, nos grupos controle e fresca, a morfologia celular se apresentou de forma padrão 1, com superfície uniforme, células hexagonais/pentagonais, junção intercelular bem marcada (retângulo amarelo), microvilos densos, roliços e dispersos na região apical e nas bordas laterais das células (setas vermelhas). É importante destacar que nesta sub-região, as células se apresentaram mais achatadas. O grupo criopreservada apresentou quantidade maior das aberturas em formato circular no espaço intercelular (círculo azul) (Figuras 10 e 11).

Para o lado mesenquimal, o grupo controle apresentou um padrão de trama colágena, homogênea, densa, mas em superfície ondulada, apresentando algumas fendas, características morfológicas do padrão 2, e o grupo fresca apresentou o padrão mesenquimal 2, consistindo de uma trama colágena homogênea, densa e com superfície pouco ondulada. O grupo criopreservada apresentou trama colágena bem homogênea e densa, em superfície ondulada e com pouca definição. Entretanto o alinhamento dos feixes de fibras colágenas, aparentavam estar perpendicular à superfície. (Figura 12).

5.4 Análise dos Métodos de Preservação

Descrição das análises com foco no meio de preservação.

5.4.1 Grupo Controle

Dessa forma, no grupo controle, região central (R1) e âmnio refletido (R4), obtivemos uma imagem muito parecida entre todas as eletromicrografias. No lado epitelial da MA a superfície epitelial estava uniforme, com células em formato hexagonal, pouco globosas para R1 e achatadas para R4, padrão em mosaico, a junção intercelular estava bem definida, os microvilos eram roliços, densos e aglomerados na região apical das células, e também nas bordas laterais das células realizando ligações celulares. A região intermediária (R2) e periférica (R3), obteve diferenças, como o formato celular mais circular e globoso, a junção epitelial com maior espaço, os microvilos condensados e aglomerados apenas na superfície apical das células, também é possível visualizar algumas pontes citoplasmáticas fazendo ligações entre células.

No lado mesenquimal, o grupo controle apresentou a R1 como uma trama colágena densa, com fibras homogêneas e organizadas em superfície lisa. Já R2 e R4, exibem imagens semelhantes, porém com trama colágena em superfície ondulada com algumas depressões. E, em R3 foi observado, trama colágena bem densa, compacta e mais heterogênea mostrando feixes de fibras colágenas espessas e finas, e superfície lisa.

5.4.2 Grupo Fresca

O grupo fresca, lado epitelial, apresentou semelhanças com relação ao controle, incluindo o formato de células circulares e globosas nas regiões R2 e R3, e o padrão clássico de formato hexagonal, com células menos globosas em R1, e achatadas em R4. Estas duas últimas regiões também apresentaram junções intercelulares bem marcadas. As variações em relação ao controle foram observadas nos microvilos, que ficaram achatados e colabados, e nas junções intercelulares as quais foram perdendo definição, sendo que em R3 esta perda de definição foi grande, visto que o espaço intercelular aumentou bastante. Também nesta região, as células apresentaram um formato muito circular parecendo ter um centro bem elevado e em vários tamanhos, sendo que algumas pareciam estar “encolhendo”.

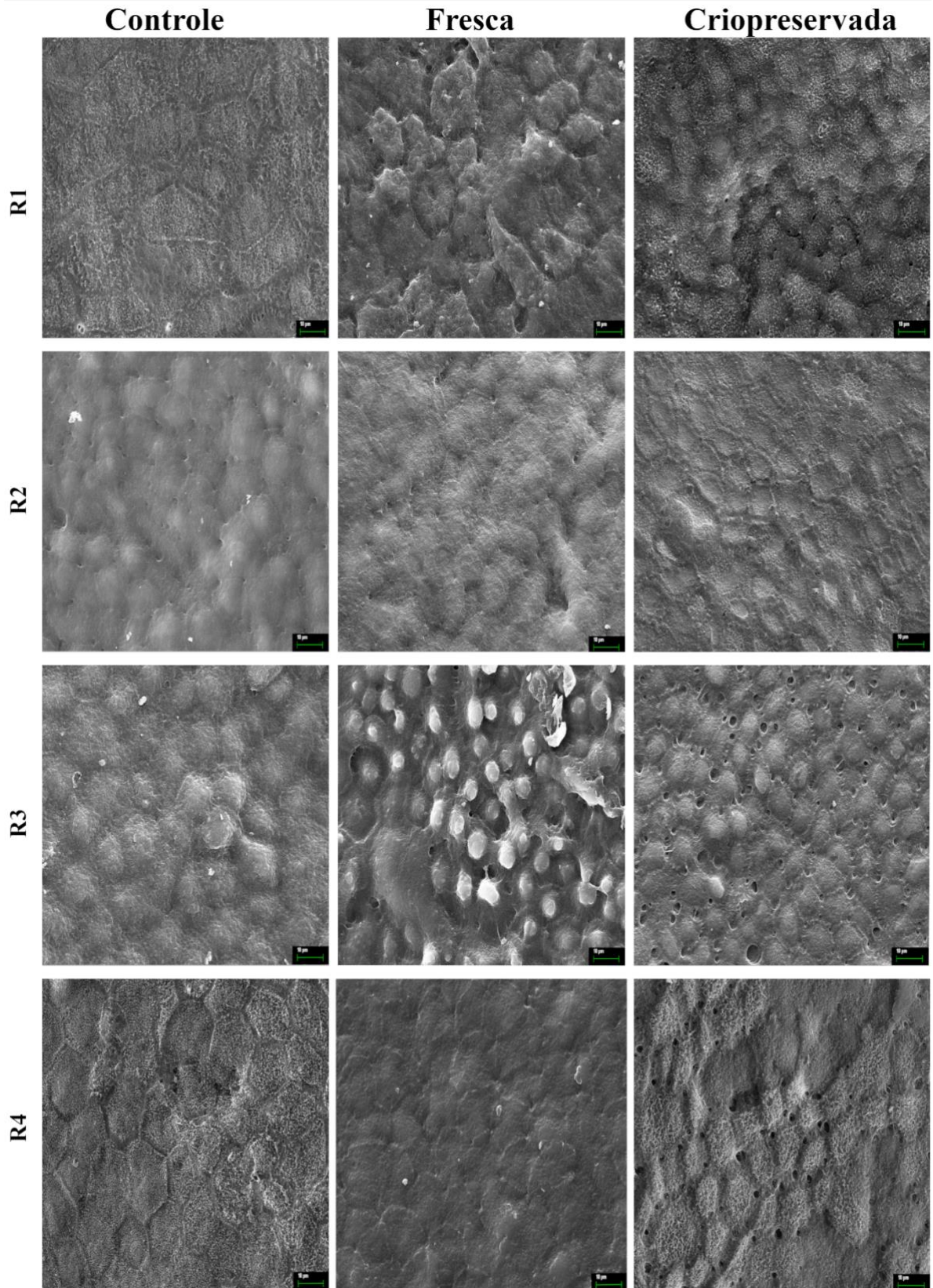
Já o lado mesenquimal, obteve resultados muito próximos para todas as sub-regiões, sendo a trama colágena densa, homogênea, organizada em superfície lisa, com exceção de R4 que exibiu fibras colágenas ligeiramente heterogêneas, sendo estes aspectos considerados normais da estrutura da membrana.

5.4.3 Grupo Criopreservada

Analisando o grupo criopreservada, observamos imagens mais próximas do grupo controle, com relação à integridade da superfície epitelial, incluindo R1 e R4 com células em formato hexagonal, menos globosas em R1, e mais achatadas em R4; R2 e R3 com células mais circulares e globosas; microvilos bem roliços e densos e; junção intercelular bem definida.

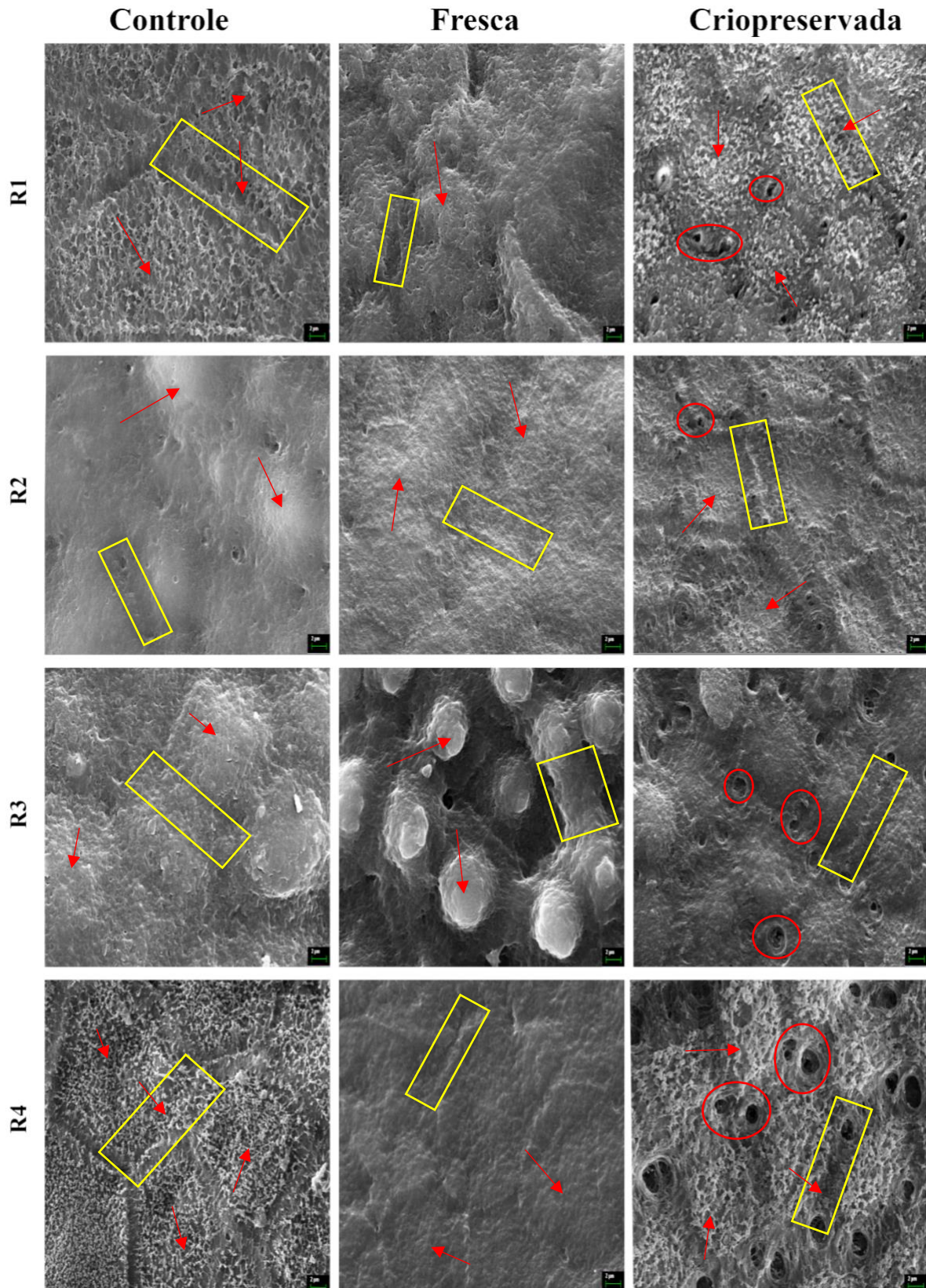
No lado mesenquimal, foi observado em R1 e R4 o mesmo padrão, com fibras colágenas homogêneas, trama colágena densa, em superfície ondulada Já em R2 e R3, o único aspecto diferente é a trama em superfície lisa, sendo R2 com fibras homogêneas, e R3 com fibras levemente heterogêneas, sendo esta trama fibrosa de aspecto morfológico semelhante ao grupo controle

Figura 10 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA dos grupos controle, fresca e criopreservada, em cada sub-região incluindo R1 (região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Barras de ampliação: 10µm (1000x).



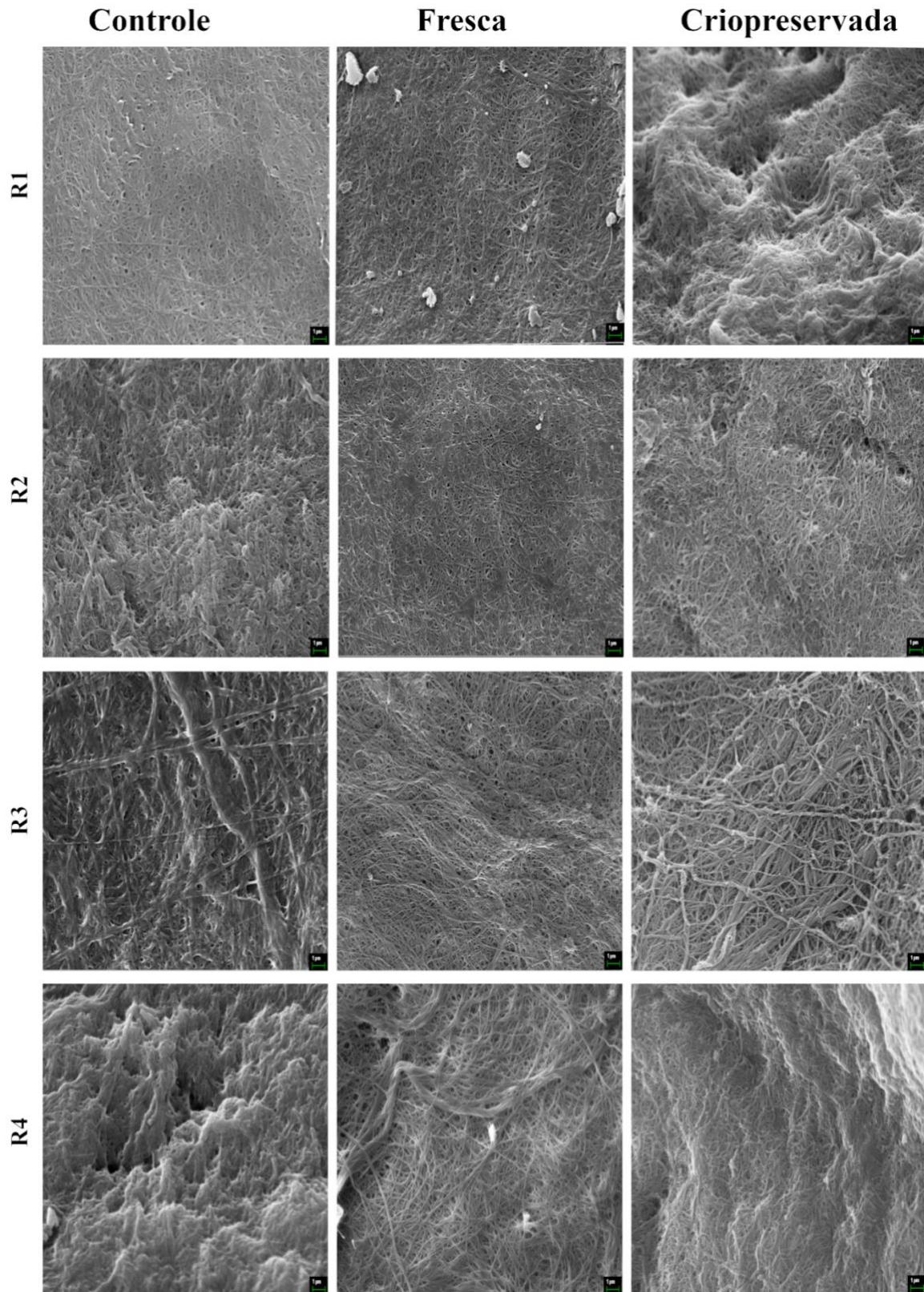
Fonte: Autor

Figura 11 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA dos grupos controle, fresca e criopreservada, em cada sub-região incluindo R1 (região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Legenda para símbolos: setas vermelhas = microvilos, retângulo amarelo = junção intercelular, círculo vermelho = aberturas em formato circular no espaço intercelular. Barras de ampliação: 2µm (3000x).



Fonte: Autor

Figura 12 – Micrografias eletrônicas representativas do lado mesenquimal da MA dos grupos controle, fresca e criopreservada, em cada sub-região incluindo R1 (região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Barras de ampliação: 1µm (10.000x).



Fonte: Autor

5.5 Achados Microscópicos Diferentes

As figuras 13, 14 e 15, demonstram achados microscópicos encontrados apenas no lado epitelial de algumas membranas, incluindo a presença de células com formato alongado, células com formato “aranha” e microvilos com vários formatos.

5.5.1 Células Alongadas

Em relação aos achados microscópicos diferentes encontrados em algumas membranas, podemos inicialmente citar a variação no formato celular, incluindo células epiteliais alongadas encontradas na região central da MA, independente do grupo de preservação.

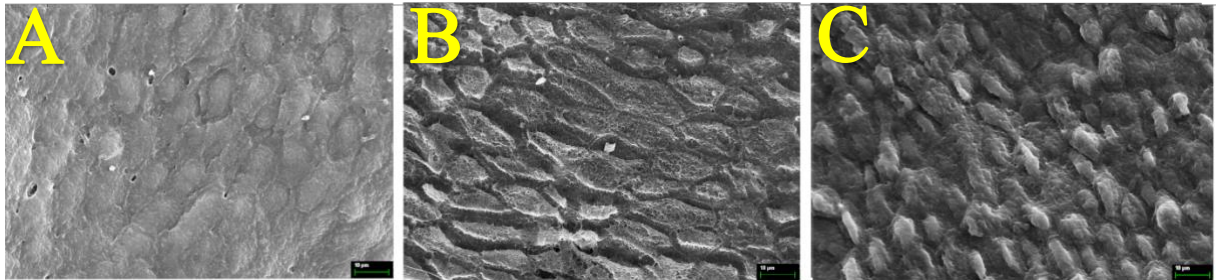
5.5.2 Células “Aranha”

Outro achado importante visualizado nas micrografias foram as “células aranhas”, que foram encontradas em R3 do grupo controle, R4 do grupo fresca. Estas células se diferenciam das outras, pois estão ligadas por projeções citoplasmáticas que atravessam o espaço intercelular formando assim um sistema de canais intercelulares, os quais são visualizados por meio das aberturas circulares entre as projeções (Figura 14).

5.5.3 Variação dos Microvilos

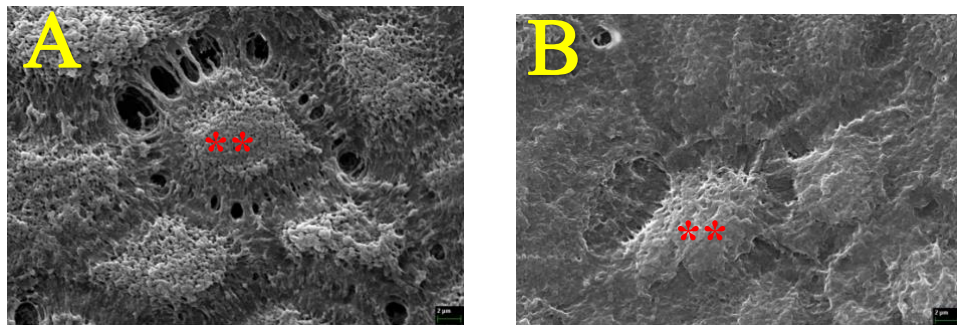
Neste estudo foi observado, a variação dos microvilos, ainda que dentro do mesmo grupo ou região (Figura 15). Na figura (A), visualizamos microvilos densos, condensados e com pouca definição, na figura (B), sendo a mesma placenta, mesma região e mesmo grupo, observamos que os microvilos perderam definição e ficaram mais achatados e colabados. Na figura (C), os microvilos estão com pouca definição, densos e condensados, já na figura (D), estão sem nenhuma definição e totalmente colabados com a célula.

Figura 13 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA na sub-região R1, dos grupos controle (A), fresca (B) e criopreservada (C), mostrando que, independente do grupo, as células desta região podem ser mais alongadas. Barras de ampliação: 10 μ m (10.000x).



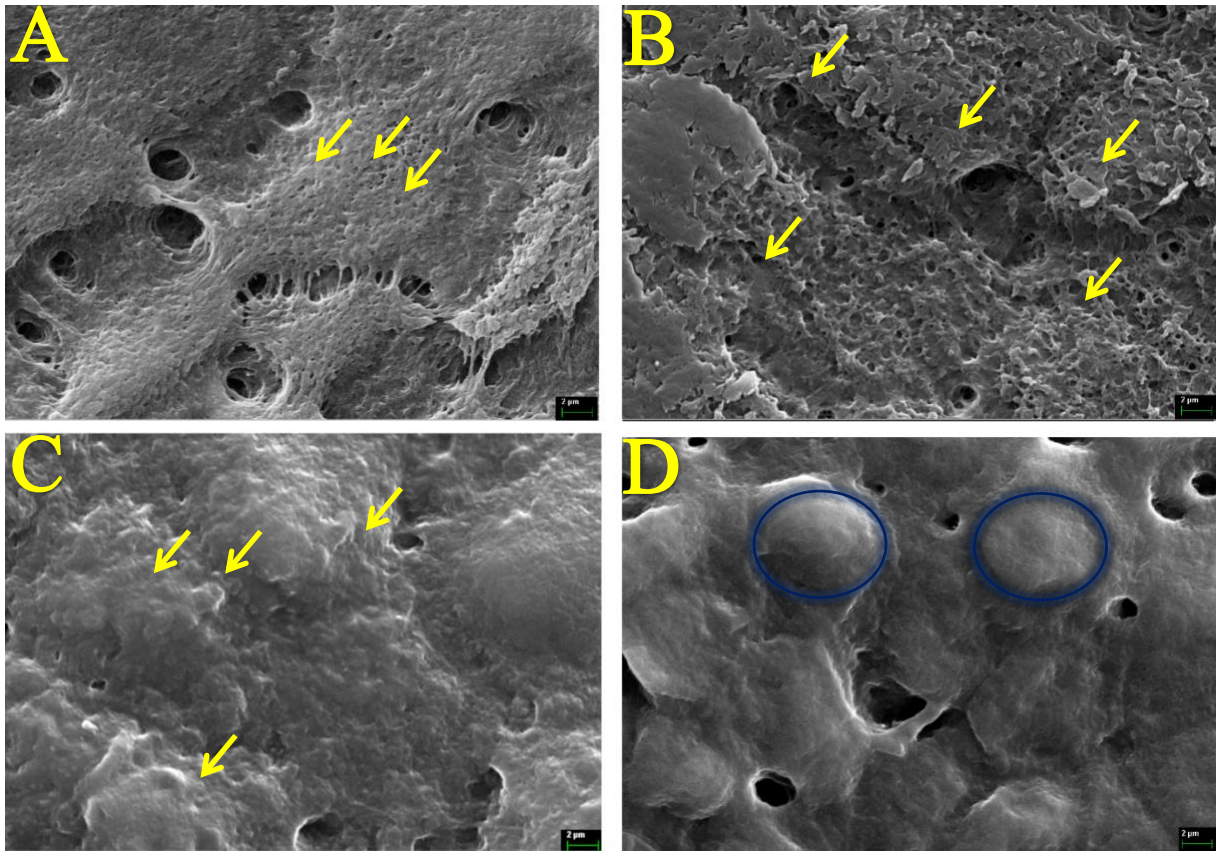
Fonte: Autor

Figura 14 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA na sub-região R3 do grupo controle (A) e R4 do grupo fresca (B) mostrando a morfologia de uma célula normalmente encontrada no meio das demais células epiteliais com forma poligonal, denominada de célula aranha (**), com finas projeções citoplasmáticas atravessando o espaço intercelular e formando um sistema de canais intercelulares, os quais são visualizados por meio das aberturas circulares entre as projeções. Barras de ampliação: 2 μ m (3000x).



Fonte: Autor

Figura 15 – Micrografias eletrônicas representativas do lado epitelial da MA mostrando variações nos microvilos da região apical das células da sub-região R2 no grupo criopreservada (A e B), e da sub-região R3 no grupo fresca (C e D) (setas amarelas e círculo) Barras de ampliação: 2 μ m (3000x).



Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho a MEV foi aplicada para descrever as diferenças na morfologia superficial da MA em ambos os lados, epitelial e mesenquimal, e nas sub-regiões, incluindo as regiões central, intermediária e periférica do âmnio placentário, e o âmnio refletido. Em seguida a MEV foi utilizada para analisar os efeitos dos métodos de preservação, MA fresca e MA criopreservada. Embora alguns estudos recomendem considerar as diferenças entre as sub-regiões da MA no momento sua da aplicação clínica, ela continua sendo aplicada como um tecido homogêneo (BANERJEE *et al.*, 2015; WEIDINGER *et al.*, 2021).

O presente trabalho é pioneiro em comparar os efeitos dos métodos de preservação nas diferentes regiões anatômicas da MA, por meio da microscopia eletrônica de varredura. Outros estudos foram realizados, considerando apenas o estudo das sub-regiões, ou testes com os métodos de preservação e com outros tipos de análises, incluindo histologia, expressão gênica (HAN *et al.*, 2008), análise de transparência e resistência (DEIHIM; YAZDANPANAH; NIKNEJAD, 2016) análise de atividade mitocondrial das células epiteliais e mesenquimais da MA (BANERJEE *et al.*, 2018), e análise da expressão de fatores de crescimento (LITWINIUK *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o presente estudo inicialmente padronizou o método da MEV para análise das amostras de MA. Esta etapa foi importante, pois os estudos que utilizaram MEV para análise da MA apresentaram heterogeneidade de protocolos aplicados. O processo de fixação química realizado com compostos aldeídos (formaldeído e glutaraldeído) forneceram estabilidade e preservação estrutural das amostras da MA (AL SHEHADAT *et al.*, 2018). A adição do glutaraldeído foi importante, uma vez que por possuir uma molécula maior, apresenta uma ação fixadora química mais rápida devido à presença de mais grupos aldeídos livres (-CHO) (KIERNAN, 2000). Devido a adição do glutaraldeído foi possível a redução do tempo de fixação, pois é um fixador de penetração mais rápida, e se mostrou eficiente para a preservação morfológica da MA. O uso de tampão cacodilato pH 7,2, ao invés do tampão PBS pH 7,2, junto com os fixadores glutaraldeído e formaldeído, permitiu a neutralização e tamponamento, não causando acidificação da amostra, que resulta na perda ou redução severa da maioria das atividades enzimáticas demonstráveis, com consequente melhora na definição das micrografias eletrônicas da MA.

A desidratação com graduações crescentes intermediárias de álcool (30%, 50%, 70% e 100%), e a diminuição do tempo em cada concentração de etanol, evitaram que as amostras de MA ficassem muito quebradiças e sofressem um encolhimento da superfície epitelial, causando

alterações nas projeções citoplasmáticas no espaço intercelular visualizado nas micrografias, assim preservando a estrutura celular. Também, a adição da secagem de ponto crítico (química) com HMDS, permitiu maior controle do tempo de secagem, ou seja, remoção de líquido de maneira precisa e controlada, o que está de acordo com Al Shehadat *et al.* (2018).

Neste estudo o aspecto macroscópico opaco das membranas do grupo controle significou completa secagem das amostras, e melhor definição das imagens nas micrografias eletrônicas. No grupo fresca as amostras ficaram mais transparentes, ou seja, com um aspecto menos opaco e mais aderido ao fundo da placa de 24 poços, levando a perda de algumas membranas que rasgavam durante remoção da placa, e antes do início da metalização das amostras. Já no grupo criopreservada as membranas tiveram aspecto semelhante ao grupo controle, sendo removidas da placa sem muita dificuldade.

O fato de as membranas frescas estarem mais aderidas na placa pode ser explicado pela maior absorção de líquido pela camada mesenquimal uma vez que as amostras permaneceram armazenadas em DMEM por 18h. A hidratação da camada mesenquimal da MA, principalmente na camada esponjosa é um achado normal (GRÉMARE *et al.*, 2019). Outra possível explicação seria a ocorrência de reação dos meios de preservação, ou resíduo de HDMS, entre amostra e placa, dificultando sua retirada da placa. Entretanto, pelo fato das amostras do grupo fresca terem ficado mais hidratadas, e demorarem mais a secar, a etapa de secagem, que era de 12h inicialmente, necessitou de maior tempo, e estabilizou em 24h. Esta alteração permitiu que todas as amostras de todos os grupos secassem por igual, antes de passarem para a etapa de metalização.

Considerando o aspecto macroscópico das diferentes sub-regiões anatômicas da MA, a diferença observada, empiricamente, todas amostras da região periférica do âmnio placentário (R3), rasgavam no momento da sua remoção da placa por se apresentarem mais finas. Esta observação realizada neste estudo pode ser corroborada com Deihim, Yazdanpanah e Niknejad (2016), os quais mensuraram a espessura da MA em suas diferentes regiões por meio de cortes histológicos e análise digital computadorizada, concluindo que a região do âmnio refletido (R4) tem espessura menor quando comparada com a do âmnio placentário. Considerando que a sub-região R3 é a região periférica do âmnio placentário, e está na transição para R4, a espessura mais fina observada empiricamente neste estudo pode ser assim explicada.

Neste trabalho, os aspectos microscópicos do grupo controle, fresca e criopreservada foram comparados a outros trabalhos, visando a comprovação de eficácia do protocolo e criando uma base sólida para análise dos novos resultados.

De um modo geral, foram observadas muitas ligações celulares pelos microvilos. Estas ligações celulares promovidas pelos microvilos tem a função de aumentar o contato entre as células (VAN HERENDAEL; OBERTI; BROSENS, 1978). O estudo de Pena *et al.* (2007), não identificou quais regiões foram selecionadas para uso, porém na análise do lado epitelial, foi descrito o mesmo que este estudo, superfície epitelial homogênea, com células poligonais bem próximas umas das outras, delicados microvilos foram observados na superfície apical das células.

Nas regiões intermediárias (R2) e periféricas (R3), foram observadas células circulares e globosas. De acordo com Banerjee *et al.* (2015), nos cortes histológicos, as células epiteliais do PA aparecem cilíndricas com núcleos descentralizados, enquanto as células epiteliais do RA são achatadas e simétricas, também se concluiu que as mitocôndrias apresentaram maior potencial de membrana, o que é um indicador global da função da mitocôndria, foram encontradas na periferia das células, em PA, assim como maior atividade respiratória mitocondrial, esses são pontos que ajudam a explicar diferença da morfologia celular em R2 e R3.

Também em R2 e R3, foi descrito um encolhimento das células, deixando o espaço da junção intercelular maior. O aspecto de encolhimento foi visualizado por Hamid *et al.* (2014). Porém, diferente do nosso estudo, além da preservação em glicerol as membranas foram submetidas a esterilização por 35kGy de raios gama, o que explica além do encolhimento a presença de verdadeiros “gaps” entre as células, sendo este aspecto não visualizado em nosso estudo.

As maiores variações foram visualizadas na região periférica (R3). Han *et al.* (2008), Centurione *et al.* (2018) relataram que o âmnio placentário é uma região anatômica muito heterogênea. A sub-região R3 faz parte do âmnio placentário (PA), o qual, devido a heterogeneidade é metabolicamente ativo na função secreção celular e transporte inter e transcelular, demonstrado pela estrutura do epitélio, analisada histologicamente (BANERJEE *et al.*, 2015; CENTURIONE *et al.*, 2018) e por meio da microscopia eletrônica de transmissão (VAN HERENDAEL; OBERTI; BROSENS, 1978; VERSEN-HOYNCK *et al.*, 2004; PASSARETTA *et al.*, 2017). Conseqüentemente, as células epiteliais da R3 podem ser mais sensíveis às variações de métodos de preservação. Esta hipótese foi confirmada em estudo prévio (MORAES *et al.*, 2021), onde se observou redução significativa na viabilidade celular na região PA nos grupos fresca e também na MA criopreservada, utilizando o mesmo protocolo que o presente estudo.

O grupo criopreservada demonstrou diferença relação aos outros, a presença de aberturas em formato circular no espaço das junções intercelulares, no lado epitelial da membrana em todas as regiões desse grupo. Os estudos de Versen-Hoynck *et al.* (2004) e Pena *et al.* (2007), também utilizaram o método de criopreservação para a membrana, com uso de DMEM/glicerol (1:1) à -80°C, observando resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, como a superfície epitelial constituída por numerosas células poligonais, formando um padrão de mosaico, a borda apical e lateral das células com grande número de microvilosidades, as quais se estendem lateralmente formando um labirinto de pontes citoplasmáticas no espaço intercelular bem definido.

O achado microscópico deste estudo, descrito por “células alongadas”, comprovam a descrição de Malheiros e Abreu (2016), a morfologia do âmnio que reveste o cordão umbilical apresenta células com núcleos alongados, assim explicando o fato das células serem mais alongadas em algumas membranas de R1, se dá pela mudança de padrão celular entre o âmnio que reveste o cordão umbilical e o âmnio que forma a sub-região R1. Sendo R1 uma região que faz divisão com o cordão umbilical, o âmnio do cordão pode ter sido incluído junto com R1, no momento da separação das sub-regiões, pois as delimitações entre elas não são exatas.

Em relação as “células aranha”, mesma descrição foi encontrada nos estudos de Pollard, Aye e Symonds (1976) e Van Herendael, Oberti e Brosens (1978), que estudaram a anatomia microscópica do âmnio. Este último descreveu as etapas de um processo denominado, desprendimento celular no lado epitelial da membrana: Etapa 1. Ampliação da área de borda da célula entre duas células justapostas. A própria borda da célula permanece intacta. Etapa 2. Os óstios dos canais intercelulares nas bordas das células tornam-se mais visíveis entre duas células normais ativas. Etapa 3. A célula a ser eliminada é mantida apenas por pontes citoplasmáticas. As microvilosidades aparecem sob a célula a ser eliminada. Esta célula tem sido chamada de “célula da aranha”. Etapa 4. Um espaço vazio permanece coberto por microvilosidades.

De acordo com Hilmy, Yusof, e Nather (2017), as células aranhas são precursoras do processo de degeneração que ocorre nas células epiteliais da membrana amniótica. Em nosso estudo, esta célula foi um achado microscópico nas regiões R3 e R4 do grupo controle e fresca, respectivamente. Já o grupo MA criopreservada não apresentou “célula aranha”. Entretanto, foram observadas, em todas as sub-regiões, aberturas circulares no espaço intercelular. Para Pollard, Aye e Symonds (1976), Van Herendael, Oberti e Brosens (1978), estas aberturas são os óstios dos canais intercelulares nas bordas das células, e representam uma etapa do desprendimento celular do epitélio. Este desprendimento celular ou exfoliação foi também citado por Sonek *et al.* (1991) os quais observaram estes óstios dos canais intercelulares

relacionando-os com o processo fisiológico de remodelação do epitélio da membrana amniótica que ocorre momentos antes do trabalho de parto.

A variação dos microvilos, foi explicado por Pollard, Aye e Symonds (1976), afirmando que a morfologia das microvilosidades não estava relacionada com o padrão celular básico. Essa variação na morfologia foi observada em amostras da mesma placenta processados simultaneamente e, portanto, não deve ser atribuído a fatores técnicos. Finalmente, segundo Pollard, Aye e Symonds (1976) os achados microscópicos que foram encontrados no lado epitelial de algumas membranas são variações normais que podem ocorrer na MA de uma mesma placenta independente das regiões.

Adicionalmente, a influência de métodos de preservação na integridade epitelial da MA foi analisada por Versen-Hoynck *et al.* (2004), os quais observaram resultados semelhantes ao presente estudo, incluindo superfície epitelial uniforme, células poligonais, hexagonais, globosas, com microvilos, bordas integras e algumas aberturas circulares nos espaços intercelulares, concluindo que a criopreservação com glicerol foi útil em manter a integridade epitelial. Recentemente, Deihim, Yazdanpanah e Niknejad (2016) utilizaram o método de criopreservação sem glicerol com ciclos duplos de congelamento-descongelamento demonstrando por MEV, que a integridade epitelial se manteve, assim como o conteúdo de proteínas colágenas, fatores de crescimento e ácido hialurônico na matriz extracelular da membrana. Também foi observado que a transparência da MA e suas propriedades mecânicas foram preservadas, requisitos necessários para, por exemplo, a terapia na oftalmologia. Já Nicknejad *et al.* (2011) demonstraram uma morfologia epitelial normal no grupo fresca, e danos nas junções intercelulares no epitélio das membranas criopreservadas, sendo assim diferente do presente estudo. Estas diferenças podem estar relacionadas ao protocolo de preservação, visto que nesse estudo foi empregado a criopreservação com 50% de glicerol e adição de 40% DMEM/F12 e 10% FBS em -80C por 6 meses, e também não foi especificado qual sub-região da MA foi utilizada.

Analisando o lado mesenquimal, percebemos que as maiores variações são em relação a superfície ondulada ou lisa. Segundo Leal-Marin *et al.* (2020) e Ramuta *et al.* (2020), as depressões são próprias da superfície ondulada da trama colágena, assim como os feixes de fibras colágenas pouco homogêneas. O importante é a manutenção da trama colágena densa e compacta.

Os pequenos rasgos observados na trama colágena de R2 são provavelmente artefatos de técnica, uma vez que os feixes de fibras colágenas possuem a sua continuidade mantida (AL SHEHADAT *et al.*, 2018).

Histologicamente abaixo da camada epitelial da MA existe a camada basal e a camada mesenquimal ou estroma, a qual é constituída principalmente da proteína colágeno, a qual forma feixes de fibras colágenas alinhadas paralelamente ou perpendicularmente à superfície epitelial, que mantem a integridade mecânica da membrana, e sendo assim um atrativo para servir de *scaffold* na engenharia tecidual (NICKNEJAD *et al.*, 2008, DÍAZ-PRADO *et al.*, 2010, TEHRANI *et al.*, 2021; FÉNELON *et al.*, 2021). De acordo com o presente estudo, Weidinger *et al.* (2021), consideraram importante separar a membrana em sub-regiões, uma vez que elas podem ter potenciais diferentes. Grémare *et al.* (2019) e Connon *et al.* (2007), demonstraram que a camada conjuntiva do âmnio placentário é mais rica em colágeno em comparação com o âmnio refletido, assim como o alinhamento das fibras colágenas, sendo mais perpendicular à superfície na região distal à placenta, ou seja, RA, enquanto a região proximal à placenta (PA) pode apresentar um alinhamento mais paralelo à superfície amniótica. No atual trabalho, por meio da MEV, pode-se visualizar que a R4, tanto no controle, quanto no grupo criopreservada mostrou a aparência de feixes de fibras mais alinhadas perpendicularmente. Já a quantidade de colágeno não foi avaliada no presente estudo.

A integridade da camada mesenquimal ou estroma da MA foi avaliada em estudo prévio, por meio do método de polarização com Picosirius e H/E, com a finalidade de analisar o impacto do método da criopreservação sobre o colágeno e as células das camadas epiteliais e mesenquimais, respectivamente, comparando as membranas das regiões PA e RA, porém sem a subdivisão. O estudo demonstrou uma complexa estrutura reticular na camada mesenquimal composta principalmente de grossas fibras colágenas do tipo I e finas fibras colágenas do tipo III, assim como a preservação da morfologia sugerindo que a criopreservação preserva a integridade da MA e, que a região PA pode atuar melhor como *scaffold* para a engenharia tecidual, quando comparado com a região RA (MORAES *et al.*, 2021).

Assim, considerando o presente estudo conclui-se que ambos os métodos, MA fresca e MA criopreservada preservaram a integridade da ultraestrutura mesenquimal. Já o lado epitelial da MA foi melhor preservado pelo método de criopreservação da MA, incluindo todas as suas sub-regiões. É uma descoberta importante considerando que a criopreservação é o método frequentemente mais utilizado para a aplicação clínica de MA, porque permite que a membrana seja armazenada por um tempo adequado à realização dos testes de segurança obrigatórios do material doador, garante a avaliação da esterilidade, e por fim permite que a membrana seja armazenada em um “banco” de tecido, o que facilitará a sua distribuição para uso clínico de forma pronta a ser utilizada (PEREPELKING *et al.*, 2016; POGOZHYPKH *et al.*, 2020)

7 CONCLUSÃO

Com esta pesquisa, foi possível otimizar o método MEV para o estudo da MA, bem como, foi criado um novo protocolo laboratorial, para as etapas de fixação, desidratação e secagem, acarretando em melhor definição de imagem no MEV.

Foi possível realizar uma definição de diferenças morfológicas das sub-regiões no lado epitelial, e para o lado mesenquimal, as diferenças não foram tão conclusivas.

Em relação aos meios de preservação, o método MA fresca induziu um achatamento e colabamento dos microvilos na superfície das células, junções celulares menos definidas.

Finalmente, o método de criopreservação da MA em 50% DMEM e 50% glicerol, por 30 dias, foi adequado para preservar a integridade morfológica da superfície da MA nas regiões central (R1), intermediária (R2), periférica (R3) e âmnio refletido (R4), incluindo os lados epitelial e mesenquimal.

REFERÊNCIAS

- ADDS, P.; HUNT, C.; DART, J. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. **Br J Ophthalmol**, v. 85, n. 8, p. 905–907, 2001.
- AL SHEHADAT, S. *et al.* Optimization of scanning electron microscope technique for amniotic membrane investigation: A preliminary study. **Eur J Dent**, v. 12, n. 4, p. 574-578, 2018.
- AMORIM, F. C. M. *et al.* Amniotic membrane applied to burns healing: pre-clinical study. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2021.
- ARRIZABALAGA, J. H.; NOLLERT, M. U. Human Amniotic Membrane: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering. **ACS Biomater. Sci. Eng.**, v. 4, n. 7, p. 2226–2236, 2018.
- ASHRAF, N. N. *et al.* Comparison of efficacy of storage of amniotic membrane at -20 and -80 degrees centigrade. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 25, n. 4, p. 264–267. 2015.
- AYALAPURAM, A.; YADAV, S. C.; ANNAM, T. Differential concentration of growth factors in freeze dry versus cryopreserved human amniotic membrane and determination of the regenerative potentials. **Annals and Essences of Dentistry**, v. 9, n. 3, 2017.
- BANERJEE, A. *et al.* Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane. **Placenta**, v. 36, n. 11, p. 1329–1332, 2015.
- BENERJEE, A. *et al.* Cellular and Site-Specific mitochondrial characterization of vital human amniotic membrane. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 1, p. 3-11, 2018.
- BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN, R. N. Pathology of the Human Placenta. **Springer**, v. 5, p. 42–49, 2006.
- BRASIL. Ativistas falam sobre a importância da placenta. **UMA SUS**, 31 mar. 2015. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/ativistas-falam-sobre-importancia-da-placenta>. Acesso em: 19 jun. 2021
- CENTURIONE, L. *et al.* Mapping of the Human Placenta: Experimental Evidence of amniotic Epithelial Cell Heterogeneity. **Cell Transplantation**, v.27, n. 1, p. 12-22, 2018.
- CHÁVEZ-GARCÍA, C. *et al.* Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience. **Cell Tissue Banking**, v. 17, n. 2, p. 261-268, 2016.
- CONNON, C. J. *et al.* The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration. **Br J Ophthalmol**, v. 94, n. 8, p. 1057-1061, 2009.
- DEIHIM, T.; YAZDANPANA, G.; NIKNEJAD, H. Different light transmittance of placental and reflected regions of human amniotic membrane that could be crucial for corneal tissue engineering. **Cornea**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2016.

DÍAZ-PRADO, S. *et al.* Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. **Cell Tissue Banking**, v. 11, p. 9144-1, 2010.

DUA, H. S. *et al.* Variations in amniotic membrane: relevance for clinical applications. **British Journal of Ophthalmology**, v. 94, n. 8, p. 963-964, 2010.

ELAHI, A. *et al.* Evaluation of the Human Amniotic Membrane as a Scaffold for Periodontal Ligament Fibroblast Attachment and Proliferation. **Sains Malaysiana**. v. 48, n. 9, p. 1927–1935, 2019.

FÉNELON, M. *et al.* Human amniotic membrane for guided bone regeneration of calvarial defects in mice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 6, p. 1-11, 2018.

FÉNELON, M. *et al.* Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. **Membranes**, v. 387, n. 11, 2021.

FERENCZY, P. A. V. H.; SOUZA, L. B. Comparison of the preparation and preservation techniques of amniotic membrane used in the treatment of ocular surface diseases. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 79, n. 1, p. 71-80, 2020.

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.

HAMID, S. S. A. B. *et al.* Scanning electron microscopic assessment on surface morphology of preserved human amniotic membrane after gamma sterilisation. **Cell And Tissue Banking**, v. 15, p. 15-24, 2014.

HAN, Y. M. *et al.* Region-Specific gene expression profiling: Novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 954-961, 2008.

HENNERBICHLER, A. *et al.* Repair Response of the Inner and Outer Regions of the Porcine Meniscus In Vitro. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 5, p. 754–762, 2007.

HILMY, N.; YUSOF, N.; NATHER, A. Human amniotic membrane: basic science and clinical application. **World Scientific**, 2017.

JERMAN, U. D.; VERANIČ, P.; KREFT, M. E. Amniotic membrane scaffolds enable the development of tissue-engineered urothelium with molecular and ultrastructural properties comparable to that of native urothelium. **Tissue Engineering Part C Methods**, v. 20, n. 4, p. 317-327, 2014.

KIERNAN, J. A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. **Microscopy Today**, v. 8, n. 1, p. 8–13, 2000.

KIM, J. C.; TSENG, S. C. G. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. **Korean Journal of Ophthalmology**, v. 9, n. 1, p. 32-45, 1995.

- KOPACZKA, K. *et al.* The relationship between amniotic epithelial cells and their microenvironment. **J Appl Biomed.**, v. 14, p. 1-17, 2016.
- LEE, S. H.; TSENG, S. C. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **Am J Ophthalmol.**, v.123, n. 3, p. 303–312, 1997.
- LEAL-MARIN, S. *et al.* Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **J Biomed Mater Res.**, v. 109, p. 1198–1215, 2020.
- LITWINIUK, M. *et al.* Amount and distribution of selected biologically active factors in amniotic membrane depends on the part of amnion and mode of childbirth. Can we predict properties of amnion dressing? A proof-of-concept study. **Centr Eur J Immunol**, v. 43, n. 1, p. 97-102, 2018.
- MALHEIROS, G. C.; ABREU A. M. O. W. Características morfológicas do cordão umbilical. **Revista Científica da FMC**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2016.
- MAMEDE, K. M.; SANT'ANNA, L. B. Antifibrotic effects of total or partial application of amniotic membrane in hepatic fibrosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019.
- MILLAR, L. K. *et al.* Fetal membrane distention: Determination of the intrauterine surface area and distention of the fetal membranes preterm and at term. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, n. 1, p. 128–134, 2000.
- MODARESIFAR, K. *et al.* The effect of cryopreservation on anti-cancer activity of human amniotic membrane. **Cryobiology**, v. 74, p. 61-67, 2017.
- MORAES, J. T. G. O. *et al.* Effects of Preservation Methods in the Composition of the Placental and Reflected Regions of the Human Amniotic Membrane. **Cells Tissues Organs**, v. 210, n. 1, p. 66-76, 2021.
- NEJAD, A. R. *et al.* Update review on five top clinical applications of human amniotic membrane in regenerative medicine. **Placenta**, v. 103, p. 104–119, 2021.
- NIKNEJAD, Hassan *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur Cells Mater**, v. 15, p. 88-99, 2008.
- NIKNEJAD, H. *et al.* The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. **Cryobiology**, v. 63, n. 3, p. 145-151, 2011.
- NIKNEJAD, H. *et al.* Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. **Placenta**, v. 34, n. 4, p. 340-345, 2013.
- PAROLINI, O. *et al.* Isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: Na update. **Trophoblast Research**, v. 25, n. 32, p. 186-195, 2011.

PASSARETTA, F. *et al.* Ultrastructural analysis reveals differences in the secretory activity among four regions of amniotic membrane. **Italian Journal Of Anatomy And Embryology**, v. 122, n. 1, 2017.

PENA, J. D. O. *et al.* Análise ultraestrutural e de fatores de crescimento de diferentes métodos de preservação da membrana amniótica utilizada em cirurgia ocular. **Arq Bras Oftalmol**, v. 70, n. 5, p. 756-762, 2007.

PEREPELKIN, N. M. J. *et al.* Cryopreserved amniotic membrane as transplant allograft: viability and post-transplant outcome. **Cell and tissue banking**, v. 17, n. 1, p. 39-50, 2016.

POLLARD, S. M.; AYE, N. N.; SYMONDS, E. M. Scanning Electron Microscope Appearances of Normal Human Amnion and Umbilical Cord at Term. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 83, n. 6, p. 470-477, 1976.

POGOZHYKH, D. *et al.* Towards Reduction or Substitution of Cytotoxic DMSO in Biobanking of Functional Bioengineered Megakaryocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7654, 2020

PRAKASH, S.; KALRA, P.; DHAL, A. Flexor tendon repair with amniotic membrane. **International Orthopaedics**, v. 44, n. 10, p. 2037-2045, 2020.

RAMUTA, T. Ž. *et al.* The cells and extracellular matrix of human amniotic membrane hinder the growth and invasive potential of bladder urothelial cancer cells. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.

RIAU, A. K. *et al.* Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 31. p. 216–25, 2011.

RICCI, Emanuele *et al.* Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. **Cell Tissue Banking**, v. 14, n. 3, p. 475-488, 2013.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Antifibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Transplantation in Established Biliary Fibrosis Induced in Rats. **Cell Transplantation**, v. 25, p. 2245–2257, 2016.

SILINI, A. *et al.* Soluble Factors of Amnion-Derived Cells in Treatment of Inflammatory and Fibrotic Pathologies. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, p. 6-14, 2013.

SONEK, J. *et al.* Morphologic changes in the human amnion epithelium that accompany labor as seen with scanning and transmission electron microscopy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 164, n. 5, p. 1174-1180, 1991.

SWIM, M. M. *et al.* Amnion-based scaffold with enhanced strength and biocompatibility for in vivo vascular repair. **Tissue Engineering**, v. 25, n. 7-8, p. 1-41, 2018.

TEHRANI, F. A.; AHMADIANI, A.; NIKNEJAD, H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 293-298, 2013.

TEHRANI, F. D. *et al.* A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1444, 2021.

TEOFILI, L. *et al.* Incorporating placental tissue in cord blood banking for stem cell transplantation. **Expert Review of Hematology**, v. 11, n. 8, p. 649-661, 2018.

THOMASEN, H. *et al.* Comparison of cryopreserved and air-dried human amniotic membrane for ophthalmologic applications. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 247, p. 1691–1700, 2009.

THOMASEN, H. *et al.* The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. **Current Eye Research**, v. 36, n. 3, p. 247-255, 2011.

VAN HERENDAEL, B. J.; OBERTI, C.; BROSENS, I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v. 131, n. 8, p. 872-880, 1978.

VATSA, R. *et al.* Evaluation of amnion in creation of neovagina in women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 2, p. 341–345, 2017.

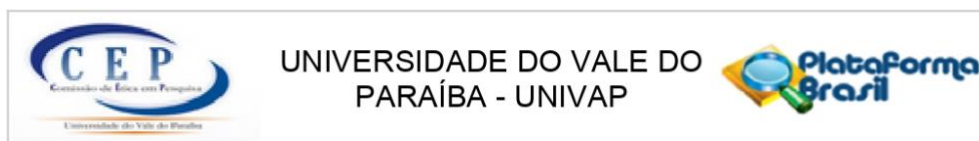
VERSEN-HOYNCK, F. *et al.* The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts – light and scanning electron microscopic studies. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, p. 45-56, 2004.

WAGNER, M. *et al.* Cryopreservation of amniotic membrane with and without glycerol additive. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 256, p. 1117–1126, 2018.

WEIDINGER, A. *et al.* Sub-Regional Differences of the Human Amniotic Membrane and Their Potential Impact on Tissue Regeneration Application. **Front. Bioeng. Biotechnol**, v. 8, 2021.

YAZDANPANA, G. *et al.* The effects of cryopreservation on angiogenesis modulation activity of human amniotic membrane. **Cryobiology**, v. 71, p. 413–418, 2015.

ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA MORFOLOGIA DAS SUB-REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA: ESTUDO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Pesquisador: ANA CLARA REZECK DE MOURA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52149321.9.0000.5503

Instituição Proponente: Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.098.657

Apresentação do Projeto:

O projeto é uma pesquisa de estudo, quantitativa, básica, explicativa e experimental. A amostra consistirá de 7 placentas humanas, as quais serão utilizadas para obtenção da membrana amniótica humana (MA), a qual será processada e fragmentada em dimensões adequadas relacionadas aos métodos de conservação fresca e criopreservada. Para a microscopia eletrônica de varredura, a membrana será dividida em 4 diferentes regiões de acordo com sua posição relacionada ao cordão umbilical (região central, região intermediária, região periférica, região âmnio refletido). De cada uma das regiões acima descritas serão obtidos 6 fragmentos de MAH (1x1cm²), sendo 3 fragmentos para a análise do lado epitelial da membrana e os outros 3 para a análise do lado mesenquimal, marcados de forma a possibilitar a identificação dos lados (epitelial e mesenquimal), e preservadas seguindo o protocolo para cada grupo experimental: Grupo Controle: os fragmentos de membrana após serem processados, conforme acima, serão imersos imediatamente em fixador para a MEV; Grupo Fresca: os fragmentos de membrana após serem processados, serão imersos em meio DMEM a temperatura ambiente (24°C) por 18h; Grupo Criopreservada: os fragmentos de membrana após serem processados, serão imersos em meio DMEM/glicerol 1:1 (v/v) a -80°C por 30 dias. Assim, no grupo controle todas as análises descritas acima foram realizadas logo após o término do processamento da MA, enquanto que o grupo MA fresca permaneceu em temperatura ambiente (24°C) por um período de 18 horas armazenado em

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 33
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.098.657

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), e o grupo MA criopreservada foi armazenado em DMEM e glicerol 1:1 (v/v) a -80°C por 30 dias. Após esse período, os fragmentos serão descongelados em temperatura ambiente, lavados 2 vezes de 5min em PBS (Tampão Fosfato Salino), para então realizar as análises por MEV.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a morfologia e composição química da MAH nas suas diferentes regiões anatômicas, denominadas de amnion placentário e amnion refletido, após diferentes métodos de preservação por meio da análise da em microscópio eletrônico de varredura, que é capaz de produzir imagens de alta resolução das superfícies da membrana amniótica.

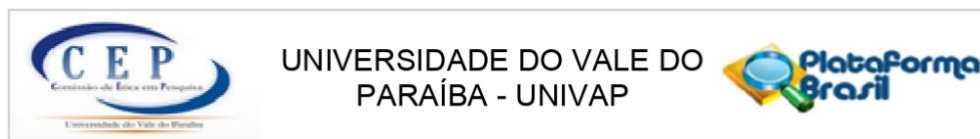
Objetivo Secundário: Otimizar o método de MEV para o estudo da morfologia da MAH; Avaliar, por meio da MEV, a morfologia superficial da MAH obtida da região PA nas suas diferentes porções (central, intermediária e periférica), e da região RA, em 3 condições: 1ª) imediatamente após seu processamento, e sem nenhum método de preservação; 2ª) após preservação em meio DMEM e armazenamento à temperatura ambiente por 18h; 3ª) após preservação em meio DMEM/glicerol 1:1 (v/v) e armazenamento à -80°C por um período de 30 dias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos A colheita da placenta é um procedimento seguro, e a equipe de enfermagem que está conversando com você foi informada sobre a pesquisa em questão, e estará à disposição para esclarecer dúvidas. Pode haver risco de quebra de sigilo profissional, mas este será minimizado pela não divulgação do seu nome ou das iniciais do seu nome, e somente pelo uso de código numérico.

Benefícios: Esperamos com esta pesquisa, a caracterização da morfologia de cada região da membrana, uma vez que ele possui uma grande área e principalmente se o método usado para seu armazenamento e preservação mantém a sua integridade estrutural em cada região. Isto é importante, pois a preservação da qualidade é fundamental para que a membrana exerça seus efeitos benéficos no organismo, como ser anti-inflamatória, antimicrobiana, reduzir a formação de cicatrizes e estimular a capacidade do corpo de regenerar seus tecidos e órgãos, quando estes são danificados por traumas ou doenças degenerativas.

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 33
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.098.657

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo tem previsão para início em 10 de dezembro de 2021 e término em 28 de fevereiro de 2023. O cronograma encontra-se adequado para a proposta apresentada e o protocolo de pesquisa contém as diferentes etapas de pesquisa.

Em parecer anterior este CEP indicou a ausência de referência ao risco de constrangimento aos participantes. Os pesquisadores adicionaram o risco de constrangimento e forma de minimizar no item Riscos, uniformizando estes dados no formulário on line, projeto brochura e TCLE

Este CEP destacou ainda, a ausência da descrição do item "Riscos e Benefícios" e de uma descrição clara dos "critérios de inclusão e exclusão no projeto brochura. Em sua carta resposta, os pesquisadores relataram " O item "Riscos e Benefícios" foram incluídos no Projeto Brochura no item 5. Foi realizada uma descrição clara e detalhada dos critérios de inclusão e exclusão, e também incluído no Projeto Brochura no item 4.2. Assim a uniformização de dados foi mantida entre os documentos." Portanto, entende-se ter sido atendida a solicitação.

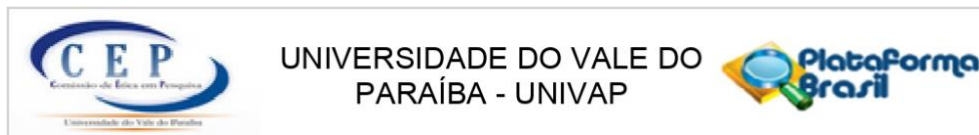
Em versão anterior, no item metodologia proposta do formulário online e no item 4.1 da Metodologia no projeto brochura, os pesquisadores relataram que "no grupo controle todas as análises descritas acima foram realizadas logo após o término do processamento da MA, enquanto que o grupo MA fresca permaneceu em temperatura ambiente (24°C) por um período de 18 horas armazenado em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), e o grupo MA criopreservada foi armazenado em DMEM e glicerol 1:1 (v/v) a -80°C por 30 dias". Neste sentido, este CEP questionou se esta análise já havia sido realizada e alertou para o fato de que não avalia projetos em andamento. Em carta resposta, os pesquisadores justificaram a escrita equivocada em razão de projeto anterior e que não houve coleta de dados sem aprovação do CEP.

Além disso, a metodologia de dados descrita apenas no formulário on line foi incluída no projeto brochura.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos: formulário online, projeto brochura, TCLE, folha de rosto assinada pelo pesquisador responsável e pela diretora do IP&D, e Lista de presença do Treinamento de colheita de placenta no Hospital Santa Casa bem como Termo de Compromisso e Confidencialidade.

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 33
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.098.657

O Termo de Compromisso e Confidencialidade está assinado pela mesma equipe de Técnicos de Enfermagem que participaram do treinamento de colheita de material biológico (placenta) e assinaram lista de presença. O Termo de Anuência do Hospital Santa Casa de Misericórdia de São José dos Campos foi apresentado neste última versão.

O TCLE apresenta o riscos de quebra de sigilo e descreve a forma de minimizá-lo por meio da identificação do material coletado (placenta) somente por códigos numéricos. Descreve o risco de constrangimento aos participantes nesta versão recente do projeto. Garante ainda o ressarcimento do participante em caso de gastos e ressarcimento em caso de eventuais danos.

O documento TCLE será impresso em três vias garantindo a entrega de uma via impressa para registro da Maternidade do Hospital Santa Casa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A partir das observações acima este CEP considera o trabalho está aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

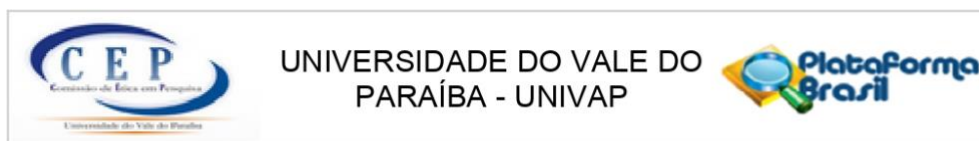
Segundo a Resolução 466/12 (item XI), cabe ao pesquisador "elaborar e apresentar os relatórios parciais e final", sendo esta uma responsabilidade "indelével e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais". A Resolução 510/16, no art. 28, V, reforça que cabe ao pesquisador "apresentar no relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção." Segundo a carta circular n. 0226/CONEP/CNS, de 2010, o relatório final deve incluir (veja modelo no site do CEP-Univap):

- Dados do projeto: Registro CONEP e
- Título do Projeto e Dados dos participantes: total de participantes recrutados, incluídos, selecionados, excluídos, retirados/descontinuados, concluintes (em cada centro, se for o caso, e no total). Ocorrendo participantes retirados/descontinuados, indicar principais razões disto. Ocorrendo "eventos sérios", indicar as condutas adotadas. Se houve pedido de indenização por danos causados por este estudo, indicar qual o dano e conduta tomada.

CEP-Univap - (12) 3947-1111

www.univap.br/cep

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 33
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 5.098.657

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1829130.pdf	24/10/2021 16:09:23		Aceito
Outros	Carta_resposta_Ana.docx	24/10/2021 16:08:47	ANA CLARA REZECK DE	Aceito
Outros	Termo_hospital.pdf	24/10/2021 16:03:42	ANA CLARA REZECK DE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Ana_corrigido.docx	24/10/2021 15:59:14	ANA CLARA REZECK DE MOURA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMestradoANA_corrigido.docx	24/10/2021 15:58:15	ANA CLARA REZECK DE MOURA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/09/2021 13:25:22	ANA CLARA REZECK DE	Aceito
Outros	TREINAMENTODAEQUIPEETERMODECONFIDENCIABILIDADE_compressed.pdf	27/09/2021 18:10:56	ANA CLARA REZECK DE MOURA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 10 de Novembro de 2021

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

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 33
Bairro: Urbanova **CEP:** 12.244-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 **Fax:** (12)3947-1149 **E-mail:** cep@univap.br

ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: EFEITOS DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA MORFOLOGIA DAS SUB-REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA: ESTUDO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Pesquisador Responsável: Ana Clara Rezeck de Moura (CPF: 113.316.976-70 e celular: (35) 999245381

Equipe: Ana Clara Rezeck de Moura (CPF: 113.316.976-70 e-mail: ana.clara10@hotmail.com), Amanda Cerqueiro Rodrigues Dos Santos (CPF: 416.476.878-96 e e-mail: amandacerqueiro@gmail.com), Gabriela Antonia Tie Calheiro (CPF: 418.130.928-26 e e-mail: gabriela.atie@hotmail.com, Thainá Almeida de Oliveira Bonfim (CPF:498.692.028-61 e e-mail: thainaoiliveira.bonfim@gmail.com) e Luciana Barros Sant'Anna (CPF: 159.668.068-70 e-mail: lucianabsa@gmail.com).

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento- UNIVAP
Telefones para contato (35)999245381, (12) 39471169.

Nome do participante: _____ R.G. _____
Idade: _____ anos CÓDIGO: _____

A Sr.^a está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa tendo como título “EFEITOS DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA MORFOLOGIA DAS SUB-REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA: ESTUDO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA”, de responsabilidade da pesquisadora Ana Clara Rezeck de Moura. O objetivo deste é avaliar a morfologia (forma e composição) da membrana amniótica humana nas suas diferentes regiões anatômicas, após diferentes métodos de preservação, por meio da análise em microscópio eletrônico de varredura, que é capaz de produzir imagens de alta resolução das superfícies da membrana amniótica. Esperamos com esta pesquisa, a caracterização (conhecimento-estudo detalhado) da morfologia (forma e composição) de cada região da membrana, uma vez que ele possui uma grande área (parte interna, externa e cordão umbilical) e principalmente se o método usado para seu armazenamento e preservação mantém a sua integridade estrutural em cada região. Isto é importante, pois a preservação da qualidade é fundamental para que a membrana exerça seus efeitos benéficos no organismo, como ser anti-inflamatória, antimicrobiana, reduzir a formação de cicatrizes e estimular a capacidade do corpo de regenerar seus tecidos e órgãos, quando estes são danificados por traumas ou doenças degenerativas.

A membrana amniótica humana é a parte interna das membranas fetais (também conhecida como “bolsa das águas”, a qual que se rompe para dar início ao parto), que juntamente com a placenta são retiradas pelo médico obstetra do organismo materno logo após o parto, e descartadas pelo hospital, não tendo mais nenhuma função para a mãe ou bebê. A membrana amniótica é um tecido humano muito rico em células tronco (aquelas capazes de se transformarem em diferentes tipos de células que formam os tecidos do nosso corpo). Além disto, esta membrana é anti-inflamatória, reduz formação de cicatrizes, não induz rejeição, e estimula a capacidade do corpo de regenerar seus tecidos e órgãos, quando estes são danificados por traumas ou doenças degenerativas, as quais causam a perda da função do órgão e levam a diminuição da qualidade de vida. Adicionalmente, pesquisas recentes estão demonstrando que esta membrana pode ter uma ação antimicrobiana sobre determinadas bactérias ou microrganismos causadores de doenças.

Sua participação consistirá em ceder a placenta. A colheita da sua placenta será feita somente após o nascimento do bebê e após a retirada, pelo médico, do seu corpo. Nesse momento a placenta e as membranas fetais serão inspecionadas pelo médico e colocadas em um saco plástico estéril, sem a identificação do seu nome, nem as iniciais, dentro de caixa térmica refrigerada, e entregue ao pesquisador responsável pelo estudo, o qual transportará para o laboratório onde será utilizada de acordo com o objetivo do estudo.

A colheita da placenta é um procedimento seguro, e a equipe de enfermagem que está conversando com você foi informada sobre a pesquisa em questão, e estará à disposição para esclarecer dúvidas. Pode haver risco de quebra de sigilo profissional, mas este será minimizado pela não divulgação do seu nome ou das iniciais do seu nome, e somente pelo uso de código numérico. Pode haver o risco de constrangimento, pelo

fato da gestante ser abordada em um momento que antecede o parto, porém este será minimizado pela forma de abordagem realizada pela enfermeira em ambiente reservado, no que se refere ao aceite ou não da participação e da liberação dos dados da carteirinha do pré-natal referente aos exames sorológicos.”

Garantimos o sigilo e a confidencialidade das informações que você fornecer, assim como sua privacidade pois não será divulgado seu nome, nem as iniciais do seu nome, em momento algum. A qualquer momento, você pode se recusar a participar e se retirar da pesquisa, sem constrangimentos, penalidades ou qualquer prejuízo (caso esteja em acompanhamento ou tratamento, este permanece como está, nada muda). As informações e materiais obtidos nesta pesquisa não poderão ser utilizados para outras finalidades que não sejam a desta pesquisa científica.

Todos os gastos decorrentes da sua participação nesta pesquisa, caso ocorram, serão imediatamente e integralmente ressarcidos, incluindo gastos do participante e de quem o acompanhe. No caso de eventual dano, imediato ou tardio, decorrente desta pesquisa, você também tem direito de ser indenizado pelo pesquisador desta pesquisa, bem como a ter assistência gratuita, integral e imediata, pelo tempo que for necessário.

Sempre que desejar, você poderá entrar em contato para obter informações sobre este projeto de pesquisa, sobre sua participação ou outros assuntos relacionados à pesquisa, com a pesquisadora responsável ou equipe executora pelo telefone 35999245381 e e-mail ana.clara10@hotmail.com. Você também pode entrar em contato com o CEP – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), corresponsável por garantir e zelar pelos direitos do participante da pesquisa, pelo telefone (12) 3947-1111, pelo e-mail cep@univap.br ou pessoalmente na Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova – Bloco 11 – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento II, sala 33, de segunda a sexta-feira, das 08h às 12h

Este termo está elaborado em três vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo participante da pesquisa e pelo pesquisador, sendo uma das vias entregue ao participante, a 2ª via entregue ao pesquisador e a 3ª via ficará guardada na Maternidade.

Eu, _____, fui informado e concordo em participar, voluntariamente, do projeto de pesquisa acima descrito.

São José dos Campos, ____ de _____ de _____

Nome e assinatura do participante

Nome e assinatura do pesquisador

Testemunha

Testemunha

Este Termo de Consentimento Livre Esclarecido deve ser impresso em três vias, sendo uma via entregue ao participante da pesquisa, outra arquivada pelo pesquisador e a 3ª via ficará guardada na Maternidade. Em caso de mais de uma página, todas as páginas devem ser rubricadas pelo pesquisador e pelo participante.

ANEXO C: RESUMO APRESENTADO NO SIMPÓSIO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA DO VALE DO PARAÍBA



DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA PARA ESTUDO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Rezeck ACM, Calheiro GAT, Sant'Anna LB.

Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil,
ana.clara10@hotmail.com; gabriela.atie@hotmail.com; lucianabsa@gmail.com

Resumo

Introdução. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada para análise da morfologia superficial da membrana amniótica humana (MAH). Para o uso clínico, é necessário preservar sua estrutura, porém cada método aplicado apresenta diferentes impactos na integridade morfológica da MAH. Estudos que utilizaram MEV em amostras de MAH demonstram uma heterogeneidade entre os protocolos. Assim, há a importância em padronizar o método da MEV nas amostras de MAH, para melhor análise e uso da MAH. **Objetivos.** Otimizar as etapas do método da MEV para o estudo da integridade morfológica da membrana amniótica humana, tanto do lado epitelial, quanto do lado mesenquimal. **Metodologia.** O projeto foi aprovado pelo CEP (Protocolo No 5.172.755). Após o processamento da MAH com solução antibiótica e antifúngica, começaram os testes em cada etapa do método, baseando-se em protocolos já utilizados na literatura, compostas por: fixação, lavagem com tampão, desidratação, secagem, montagem do stub, metalização e análise no MEV. **Resultados.** Observou-se que a fixação das amostras deve-se ser realizada com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,05M por 2 horas, seguida de uma simples passagem em tampão PBS 1X, e desidratação em concentrações crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 100% e 100% de etanol + hexamethyldisilazane por 5 minutos cada. Finalmente, as amostras de MAH foram secas em temperatura ambiente por 12 horas, em uma placa de 24 poços fechada. **Conclusão.** Após diversos testes com variação de fixadores, tempo de exposição às soluções de desidratação, alteração no recipiente das amostras e principalmente ao modo de secagem, estabeleceu-se um protocolo funcional, que melhor manteve a integridade da MAH permitindo uma melhor resolução das imagens da MAH.

Palavras-chave: Membrana Amniótica Humana; Microscopia Eletrônica de Varredura;

Áreas de Concentração: Biomateriais e Materiais Biocompatíveis