



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

João Vitor Alcântara da Costa

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

**Impact of preservation methods on structural integrity of human amniotic  
membrane subregions - histological and immunohistochemical studies**

São José dos Campos, SP  
2025

João Vitor Alcântara da Costa

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

Dissertação de Mestrado apresentada 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:** Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna

São José dos Campos, SP  
2025

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Costa, João Vitor Alcântara da  
Efeitos dos métodos de preservação na morfologia das sub-regiões da membrana amniótica humana : estudo por imunohistoquímica / João Vitor Alcântara da Costa; orientadora, Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna. - São José dos Campos, SP, 2025.

1 CD-ROM, 73 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Membrana Amniótica. 3. Imuno-Histoquímica. 4. Preservação de Tecido. I. Sant'Anna, Profa. Dra. Luciana Barros, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, João Vitor Alcântara da Costa, 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, 14 de Maio de 2025.

  
\_\_\_\_\_  
Autor(a) da Obra

---

**JOÃO VITOR ALCÂNTARA DA COSTA**

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

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. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	<i>Emilia A L Arisawa</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Luciana Barros Sant'Anna	<i>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Barros Sant'Anna</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Janete Dias Almeida - Unesp	<i>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janete D. Almeida - Unesp</i>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juljana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 26 de fevereiro de 2025.

“Cada um alcança a verdade que é capaz de suportar. Ninguém se torna iluminado por imaginar figuras de luz, mas sim por se tornar consciente da escuridão.”

Carl Jung..

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, aquele que esteve comigo em todos os momentos.

À minha amada família, que nunca mediu esforços para me auxiliar em tudo que precisei. Que sempre contribuíu 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 a Gabriela e a Elisa, por me acompanharem e me ensinarem tanto. Sua amizade foi uma conquista tão grande quanto este projeto.

Aos que, pelas suas funções, ajudaram a conclusão da pesquisa, como as enfermeiras do hospital que auxiliaram na coleta das placentas.

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.

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) tem atraído atenção como biomaterial para a medicina regenerativa, devido às suas propriedades biológicas e mecânicas, que incluem ações anti-inflamatória, imunomoduladora, antifibrótica, epitelização, estabilidade, resistência e flexibilidade. Essas propriedades são atribuídas às suas características morfológicas e aos fatores bioativos solúveis e insolúveis produzidos por suas células e presentes no estroma da membrana. Recentemente, foram detectadas diferenças nas regiões anatômicas da MA, porém ainda não está estabelecido se essas regiões apresentam diferentes potenciais na regeneração tecidual, e os efeitos dos diferentes métodos de preservação sobre a integridade e morfologia das mesmas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a integridade estrutural e química da MA nas suas diferentes regiões anatômicas, âmnio placentário (PA) e âmnio refletido (RA), após diferentes métodos de preservação, por meio da técnica de imuno-histoquímica (IHC). Para isto, quatro placentas humanas a termo foram obtidas no Hospital Santa Casa de São José dos Campos e transportadas ao laboratório, onde, em condições estéreis, as membranas amnióticas foram processadas e divididas em 4 regiões: central (R1), intermediária (R2), periférica (R3) e âmnio refletido (R4), de acordo com sua posição em relação ao cordão umbilical. Os fragmentos foram distribuídos em 3 grupos, conforme o método de preservação: Grupo Controle: os fragmentos foram apenas fixados em formol; Grupo Fresca: os fragmentos foram imersos em meio DMEM a temperatura ambiente (24 °C) por 18h; Grupo Criopreservada: os fragmentos foram imersos em meio DMEM/glicerol (1:1) a -80 °C por 30 dias. Após os períodos específicos de cada grupo, os fragmentos foram processados histologicamente e incluídos em parafina para obtenção de cortes histológicos, os quais foram submetidos à análise de imuno-histoquímica e quantitativa de imagem para avaliação das proteínas constitucionais da membrana, incluindo citoqueratinas, laminina e colágeno tipo I. A análise das colorações de Hematoxilina-eosina (HE) evidenciou, no Grupo Controle, a região PA (R1, R2 e R3) com epitélio colunar simples, com células justapostas sobre a lâmina basal e núcleos na porção apical das células, contrastando com os achados da região RA (R4), a qual evidenciou epitélio com células cuboidais baixas, com núcleos centralizados. Em todas as sub-regiões anatômicas analisadas, as MA dos grupos experientais GF e GCrio eram compostas por cinco camadas estruturais (epitélio, membrana basal e as camadas compacta, fibroblástica e esponjosa) com aspectos morfológicos similares aos encontrados nas membranas do GC. As glicosaminoglicanas avaliadas por Alcian Blue, bem como as fibras colágenas, laminina e citoqueratinas avaliadas por IHC, apresentaram-se preservadas e íntegras após os diferentes métodos de armazenamento, com maior similaridade entre os grupos controle e criopreservada. Portanto, a criopreservação foi considerada eficiente para preservar a integridade epitelial e mesenquimal, nas quatro sub-regiões da MA, fundamentando seu uso na medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** Membrana Amniótica Humana; Imunohistoquímica; Preservação de Tecido; Âmnio Placentário; Âmnio Refletido.

## ABSTRACT

The amniotic membrane (AM) has attracted attention as a biomaterial for regenerative medicine due to its biological and mechanical properties, which include anti-inflammatory, immunomodulatory, antifibrotic, epithelialization, stability, resistance and flexibility. These properties are attributed to their morphological characteristics and the soluble and insoluble bioactive factors produced by their cells and present in the membrane stroma. Recently, differences in the anatomical regions of the MA have been detected, but it has not yet been established whether these regions have different potential for tissue regeneration, and the effects of different preservation methods on their integrity and morphology. In this context, the aim of this study was to evaluate the structural and chemical integrity of the MA in its different anatomical regions, placental amnion (PA) and reflected amnion (RA), after different preservation methods, using immunohistochemistry (IHC). For this purpose, four full-term human placentas were obtained from the Santa Casa Hospital in São José dos Campos and transported to the laboratory, where, under sterile conditions, the amniotic membranes were processed and divided into 4 regions: central (R1), intermediate (R2), peripheral (R3) and reflected amnion (R4), according to their position in relation to the umbilical cord. The fragments were divided into 3 groups according to the preservation method: Control Group: the fragments were only fixed in formaldehyde; Fresh Group: the fragments were immersed in DMEM medium at room temperature (24°C) for 18h; Cryopreserved Group: the fragments were immersed in DMEM/glycerol medium (1:1) at -80°C for 30 days. After the specific periods for each group, the fragments were processed histologically and embedded in paraffin to obtain histological sections, which were submitted to immunohistochemical and quantitative image analysis to assess the membrane's constitutional proteins, including cytokeratins, laminin and type I collagen. Hematoxylin-eosin (HE) staining analysis showed that in the Control Group, the PA region (R1, R2 and R3) had a simple columnar epithelium, with cells juxtaposed on the basal lamina and nuclei in the apical portion of the cells, contrasting with the findings in the RA region (R4), which showed an epithelium with low cuboidal cells, with centralized nuclei. In all the anatomical sub-regions analyzed, the MAs of the GF and GCrio experimental groups were composed of five structural layers (epithelium, basal membrane and the compact, fibroblastic and spongy layers) with morphological aspects similar to those found in the GC membranes. The glycosaminoglycans assessed by Alcian Blue, as well as the collagen fibers, laminin and cytokeratins assessed by IHC, were preserved and intact after the different storage methods, with greater similarity between the control and cryopreserved groups. Therefore, cryopreservation was found to be efficient in preserving epithelial and mesenchymal integrity in the four subregions of the MA, supporting its use in regenerative medicine.

**Keywords:** Human Amniotic Membrane; Immunochemistry; Tissue Preservation; Placental Amnion; Reflected Amnion.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura das membranas fetais. As membranas fetais são compostas pelo âmnio e pelo córion, e a decídua é a camada de revestimento interno do útero.....	18
Figura 2 - Esquema representativo da estrutura de MA e composição de cada camada da matriz extracelular.....	19
Figura 3 - Diferenciação morfológica e topográfica do âmnio placentário e âmnio refletido.	21
Figura 4 - Esquema representativo do Âmnio placentário (azul) e âmnio refletido (rosa). ....	22
Figura 5 - (A) Capela de fluxo laminar preparada para o processamento da MA; (B) Esterilização dos materiais pelo fluxo laminar com luz U.V.; (C) Separação manual da MA do córion materno. ....	30
Figura 6 - Fragmentação da MA. (A) MA separada do córion, com aspecto transparente e com um espaço central (local do cordão umbilical removido). (B) MA sobre fundo preto pautado para corte de sub-regiões. (C) Padrão de corte 3x3cm <sup>2</sup> (círculo) para cada sub-região. ....	31
Figura 7 - Representação esquemática de uma placenta mostrando as sub-regiões, incluindo R1(região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Os quadrados marcados com o número 1, 2 e 3 representam os fragmentos 3x3cm <sup>2</sup> do grupo controle, fresca e criopreservada, respectivamente, de cada sub-região. ....	32
Figura 8 - Esquema representativo do protocolo de colorações HE e Alcian Blue.....	34
Figura 9 - Esquema representativo do protocolo de Imuno-histoquímica.....	35
Figura 10 - Calibração da escala para análise global das imagens. (A) Ferramenta Straight para mensuração da barra de escala; (B) Set scale para abrir caixa de calibração da escala; (C) Caixa de calibração de escala da imagem.....	37
Figura 11 - Configuração da Grade para análise Estereológica. (A) Ferramenta Grid; (B) Configuração da Grade. ....	38
Figura 12 - Calculo de área por contagem de intersecções. (A) Contagem de intersecções para mensuração da área total de tecido da MA; (B) Contagem de intersecções para mensuração da marcação alvo.....	39
Figura 13 - Fotomicrografias da coloração HE da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e Gcrio (i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x. ....	43
Figura 14 -Fotomicrografias da coloração AB da MA. GC (a, c, e, g), GF (e, f, g, h) e Gcrio (i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x. ....	44
Figura 15 - Fotomicrografias da imunomarcção de CK da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e Gcrio (i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x. ....	45
Figura 16 - Padrão global de coloração adotado para contagem da imunomarcção de Citoqueratina.....	46
Figura 17 - Resultado do Teste ANOVA das sub-regiões R1, R2, R3 e R4 avaliados. ....	47

Figura 18 - Resultado do Teste ANOVA dos grupos experimentais GC, GF e GCrio avaliados.....	48
Figura 19 - Fotomicrografias da imunomarcação de Colágeno I da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e GCrio ( i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.....	50
Figura 20 - Distribuição da imunomarcação de Colágeno I da MA.....	51
Figura 21 - Padrão global de colora�o adotado para contagem da imunomarcação de Colágeno I.....	51
Figura 22 - Resultado do Teste ANOVA das sub-regiões R1, R2, R3 e R4 avaliados.....	52
Figura 23 – Resultado do Teste ANOVA dos grupos experimentais GC, GF e GCrio avaliados.....	53
Figura 24 - Fotomicrografias da imunomarcação de Laminina da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e GCrio ( i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.....	54

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Padronização dos achados morfológicos das sub-regiões da MA por coloração HE obtidos do GC com a descrição do aspecto normal de cada camada. Cabeça de seta: camada epitelial; Seta: vacuolizações citoplasmáticas. Aumento original de 40x. .... 42
- Quadro 2 – Relação das imunomarcações de Colágeno I da MA entre as regiões de PA e RA. Cabeça de seta: camada compacta; seta: camada fibroblástica. Aumento original de 40x..... 49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac – Anticorpo  
Ag – Antígeno  
AB – Alcian Blue  
ATP - Adenosina trifosfato  
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa  
Col.1 – Colágeno tipo 1  
CK – Citoqueratina  
CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclica  
CTGF - Fator de crescimento do tecido conjuntivo  
DAB – Diaminobenzidina  
DMEM - Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
GC – Grupo Controle  
GCrio – Grupo Criopreservada  
GF – Grupo Fresca  
HE – Hematoxilina &  
Eosina  
HLA - Antígenos leucocitários humanos  
IHC – Imunohistoquímica  
Lam - Laminina  
MA – Membrana  
Amniótica  
MAH - Membrana Amniótica  
Humana  
MB – Membrana Basal  
MEV – Microscopia Eletrônica de  
Varredura  
MHC – Molécula não clássica de complexo principal de  
histocompatibilidade  
OCT-4 – Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4  
PA – Âmnio placentário  
PBS - Phosphate  
Buffered Saline  
PBT - Solução tampão salina com Tween 20  
RA – Âmnio refletido  
RPMI – Meio Roswell Park Memorial  
Institute  
SOX-2 – Fator de transcrição SRY-Box 2  
TCLE - Termo de Consentimento Livre e  
Esclarecido  
TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformador  
beta

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	OBJETIVOS .....	17
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	18
3.1	PLACENTA.....	18
3.2	MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA .....	18
3.3	DIVISÃO ANATÔMICA E SUB-REGIÕES DA MA .....	20
3.4	APLICAÇÕES E PROPRIEDADES DA MA.....	22
3.5	PRESERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA.....	26
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	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO .....	32
4.5	MICROTOMIA E MONTAGEM DAS LÂMINAS .....	33
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	34
4.7	ANÁLISE QUANTITATIVA DE IMAGEM .....	36
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA: HEMATOXILINA-EOSINA.....	41
5.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA: ALCIAN BLUE .....	43
5.3	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E QUANTITATIVA DE IMAGEM: CITOQUERATINA (CK) – INTEGRIDADE DA CAMADA EPITELIAL .....	45
5.4	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E QUANTITATIVA DE IMAGEM: COLÁGENO TIPO I (COL.1).....	48
5.5	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA: LAMININA (LAM) – INTEGRIDADE DA MEMBRANA BASAL.....	53
6	DISCUSSÃO .....	55
7	CONCLUSÃO .....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	68
	ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	73
	ANEXO C: RESUMO APRESENTADO NO SIMPÓSIO DE ENGENHARIABIOMÉDICA DO VALE DO PARAÍBA .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de tecidos e células perinatais humanos vem gerando grande interesse na comunidade científica, particularmente pelo seu uso médico, em uma infinidade de configurações pré-clínicas de implementação, suporte regenerativo e abordagens intervencionistas. Isto se deve, primeiramente, as características e os recursos exclusivos apresentados pelos derivados perinatais, em grande parte atribuídos à sua origem e ao seu papel fisiológico, apoiando o desenvolvimento fetal adequado durante a gestação e fornecendo proteção contra o reconhecimento imunológico materno deletério (Gindraux *et al.*, 2022). O termo “perinatal” refere-se a tecidos associados ao nascimento que são obtidos de placentas a termo e anexos fetais e, mais especificamente, refere-se à membrana amniótica humana (MAH), células estromais multipotentes (MSC) e células-tronco incorporadas em diferentes partes da placenta ou do cordão umbilical humano (Silini *et al.*, 2020).

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. Assim, é um material disponível em alta quantidade, com baixos custos de processamento, e seu uso não apresenta conflitos éticos e/ou religiosos (Jahanafrooz *et al.*, 2023). A MA humana possui diversas propriedades biológicas, exercendo efeitos anti-inflamatórios, de baixa imunogenicidade, antifibróticos, antimicrobianos e antimutagênicos, além de ser uma fonte de fatores de crescimento, citocinas e células com propriedades de estaminais. Graças aos avanços nas abordagens baseadas em células-tronco, as células epiteliais amnióticas humanas (hAECs) têm sido amplamente estudadas para o tratamento de várias doenças, como lesão e fibrose pulmonar e hepática, diabetes, insuficiência renal aguda, doenças cardiovasculares, cicatrização de feridas e insuficiência ovariana prematura (Puyana *et al.*, 2020; Alencar *et al.*, 2021; Basile *et al.*, 2023).

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 a camada epitelial, quanto a camada mesenquimal ou estromal, para que a membrana exerça seus efeitos terapêuticos. O âmnio é uma membrana super-hidrofóbica semitransparente de 0,2 a 0,5 mm em contato com o feto e o líquido amniótico. As células epiteliais compõem a camada interna do âmnio e, ao secretar os fatores imunomoduladores, inibem a invasão de macrófagos maternos e células natural killer (NK) dentro do âmnio e do líquido amniótico (Jahanafrooz *et*

*al.*, 2023).

Esse tecido geralmente é aplicado como uma matriz biológica, pois atende aos três principais componentes do conceito de engenharia de tecidos: células, *scaffolds* e fatores de crescimento. A camada epitelial é a mais interna e mais próxima ao feto, em contato com o líquido amniótico, ela é formada por uma única camada de células com morfologia majoritariamente cuboidal. A membrana basal é uma das mais espessas dos tecidos humanos, sendo constituída por fibras colágenas do tipo III, IV e V, laminina e fibronectina, todas secretadas pelas células da camada epitelial (Silini *et al.*, 2020). O estroma avascular subdivide-se em camada compacta, camada fibroblástica e camada esponjosa. A camada compacta, adjacente à membrana basal, constitui o principal esqueleto fibroso da MA onde predominam o colágeno tipo I e III, mas também colágenos V e VI e fibronectina, que são secretados pelas células tronco mesenquimais presentes na camada fibroblástica, na qual existem também macrófagos esporádicos. Na camada esponjosa predominam proteoglicanos e glicoproteínas que lhe confere um aspecto esponjoso em preparações histológicas, e fibras colágenas do tipo III organizadas frouxamente, região onde ocorre a separação manual da MA do córion. Essa camada estromal é transparente devido a falta de vascularização e inervação (Hu *et al.*, 2023).

Embora a MA apresente essas camadas histológicas em toda a sua extensão, e é referida como uma estrutura única e contínua, é anatomicamente dividida em âmnio placentário ou “placental amnion” (PA- âmnio sobre o disco coriônico), âmnio refletido ou “reflected amnion” (RA- âmnio da parte extraplacentária das membranas fetais ou cório liso), e âmnio que cobre a superfície do cordão umbilical (Basile *et al.*, 2023). Estas diferenças entre as sub-regiões anatômicas da membrana têm sido demonstradas em diversos estudos, envolvidos em diferentes âmbitos, como na expressão gênica (Weidinger *et al.*, 2021), na atividade mitocondrial (Banerjee *et al.*, 2015) e em parâmetros metabólicos, como ATP e espécies reativas de oxigênio (García-López *et al.*, 2019). Basile *et al.*, 2023, demonstraram diferenças ultraestruturais entre as regiões da MA incluindo morfologia das células epiteliais, quantidade de vesículas e grânulos, o que pode ser uma evidência de diferenças na atividade secretória das células epiteliais, sugerindo que diferentes sub-regiões possam apresentar diferentes efeitos na regeneração tecidual. Fazendo uma associação, também pode ser possível que os vários métodos de preservação da MA existentes podem ter efeitos diferentes sobre a integridade das sub-regiões da membrana.

Tendo em vista que a MA se caracteriza como um tecido multi-camadas com grande complexidade estrutural, é provável que cada método de preservação afete as propriedades e potenciais da membrana de diferentes formas (Leal-Marin *et al.*, 2020). A preservação da MA

vem sendo analisada nos últimos anos de diversas formas diferentes, tais como métodos de vitrificação, desidratação, liofilização e criopreservação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Leal-Marín et al., 2020; Fénelon *et al.*, 2021). Esses métodos específicos apresentam características positivas e negativas, a depender da aplicação clínica em que será utilizada, sendo de vital importância a análise minuciosa de cada protocolo para garantir a qualidade da membrana como biomaterial aplicado na clínica médica. Por tanto, faz-se necessário levar em consideração aspectos como temperatura e tempo de armazenamento, bem como o uso ou não de agentes crioprotetores, como glicerol e DMSO, caso a metodologia empregada seja a criopreservação (Leal-Marín et al., 2020; Horvath *et al.*, 2023).

A criopreservação é o método mais frequente para a aplicação clínica da MA, uma vez que permite o armazenamento por longos períodos antes da sua utilização, assim sendo possível a repetição dos testes sorológicos realizados no período pré-natal, a fim de eliminar qualquer risco biológico. Entretanto ainda existem opiniões diversas entre qual o melhor crioprotetor, glicerol ou dimetilsulfóxido (DMSO), assim como os efeitos de diferentes métodos de preservação sobre a viabilidade celular e integridade tecidual (Jafari *et al.*, 2024).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a integridade estrutural e química da MA nas suas diferentes regiões anatômicas, PA e RA, em suas camadas epitelial e mesenquimal, após diferentes métodos de preservação, por meio da técnica de imuno-histoquímica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar, por imuno-histoquímica, a expressão e distribuição dos colágenos tipos I e III, da proteína laminina entre as camadas do estroma da MA, e as citoqueratinas (CK), as quais são proteínas específicas da camada epitelial da membrana. Esta avaliação ocorrerá na região PA, nas suas diferentes porções (R1, R2 e R3), e na região RA (R4):

- 1) Imediatamente após seu processamento, sem nenhum método de preservação;
- 2) Após preservação em meio DMEM e armazenamento à temperatura ambiente por 18h; e
- 3) Após preservação em meio DMEM/glicerol 1:1 (v/v) e armazenamento à -80°C por um período de 30 dias.

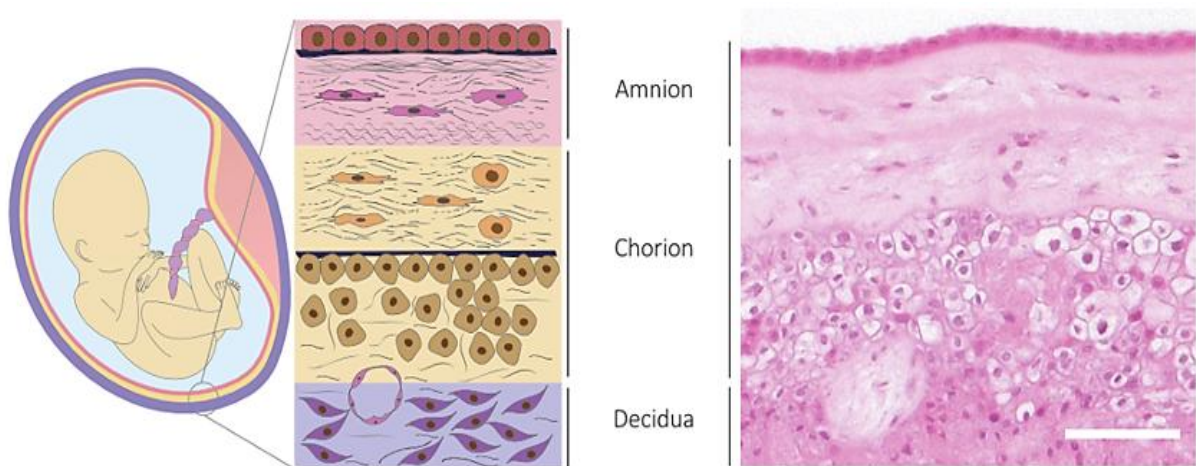
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PLACENTA

A placenta humana é um órgão transitório formado por componentes fetais e maternos que se originam do blastocisto e do endométrio materno, respectivamente. Esta estrutura fetal possui diâmetros que variam de 15 a 20 cm e espessuras que variam de 2 a 3 cm. Este órgão é formado pelo disco placentário, as membranas amnióticas e coriônicas, comumente referidas como membranas fetais, e o cordão umbilical. A decídua basal, originada do endométrio, é a parte materna (Basile *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, além da utilização de partes da membrana amniótica (MA) como material cirúrgico, houve uma grande ênfase na identificação de diferentes tipos de células que podem ser extraídas da placenta. Com o progresso na compreensão das características dessas células, várias pesquisas têm sido conduzidas para investigar seus possíveis impactos em modelos animais de várias enfermidades, visando possíveis aplicações clínicas no futuro (Horvath *et al.*, 2023; Jafari *et al.*, 2023).

Figura 1 - Estrutura das membranas fetais. As membranas fetais são compostas pelo âmnio e pelo córion, e a decídua é a camada de revestimento interno do útero.



Fonte: Avilla-Royoe. *et al.*, (2021)

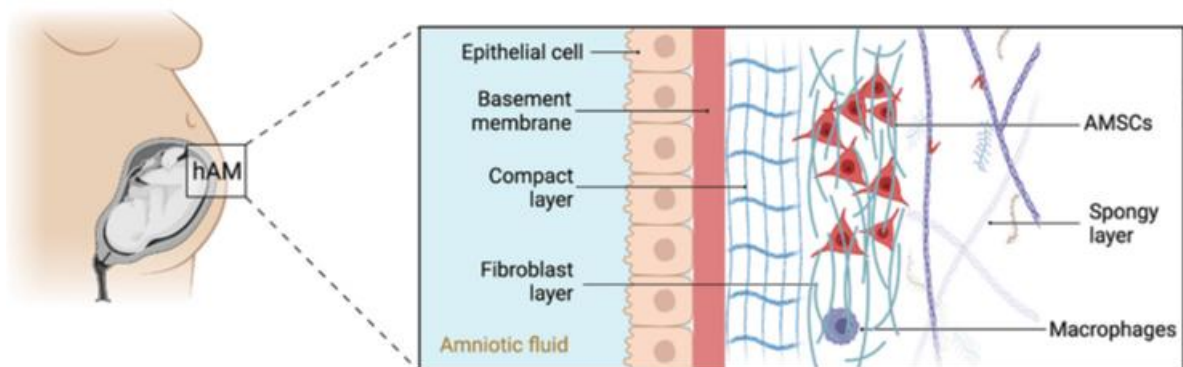
#### 3.2 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

A porção fetal da placenta é composta pelas membranas amniótica e coriônica, também conhecidas como âmnio e córion, respectivamente. O âmnio se conecta diretamente com o

feto, enquanto o córion se localiza próximo ao endométrio, tecido de origem materna (Leal-Marín *et al.*, 2020). A membrana amniótica humana (MA), também chamada de âmnio, constitui a camada interna das membranas fetais. Está indefinidamente ligada à membrana coriônica ou córion. As membranas fetais, quando unidas, constituem o saco amniótico, que abriga o embrião e o líquido amniótico durante a gestação. As duas membranas estão estreitamente ligadas por uma fina camada de colágeno esponjoso, o que torna a sua separação mais fácil (Arrizabalaga; Nollert, 2018).

A membrana amniótica é uma membrana delicada, translúcida, sem vasos sanguíneos e sem a presença de nervos ou músculos. Ela é composta por cinco camadas distintas, incluindo uma camada epitelial, uma membrana basal, uma camada compacta, uma camada de fibroblastos e uma camada esponjosa (Figura 2) (Leal-Marín *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2023). A membrana basal é composta por colágeno tipo IV e VII, fibronectina, laminina e ácido hialurônico, produzidos pela camada epitelial. A camada compacta é formada por colágeno I e III, produzidos por células-tronco mesenquimais, ao passo que a camada de fibroblastos é constituída por tais células-tronco, que possuem formato fibroblástico, assim como eventuais macrófagos (Leal-Marín *et al.*, 2020; Jahanafrooz *et al.*, 2023). Além disso, a camada esponjosa é predominantemente constituída por proteoglicanos e glicoproteínas, que lhe dão uma aparência esponjosa em preparações histológicas, e fibras de colágeno do Tipo III, de estrutura frouxa, área onde a MA é separada manualmente do córion (Basile *et al.*, 2023). Em última análise, a camada esponjosa possibilita que a MA deslize sobre o córion. A distinção entre o córion e o MA pode ser notada na Figura 1b (Leal-Marín *et al.*, 2020; Jafari *et al.*, 2024).

Figura 2 - Esquema representativo da estrutura de MA e composição de cada camada da matriz extracelular.



Fonte: Hu *et al.*, (2023)

### 3.3 DIVISÃO ANATÔMICA E SUB-REGIÕES DA MA

A MA é composta por 5 camadas histológicas ao longo de sua totalidade, sendo caracterizada como uma estrutura única e contínua. No entanto, anatomicamente, ela é segmentada nas seguintes áreas: âmnio placentário, âmnio refletido e âmnio umbilical (Horvath *et al.*, 2023).

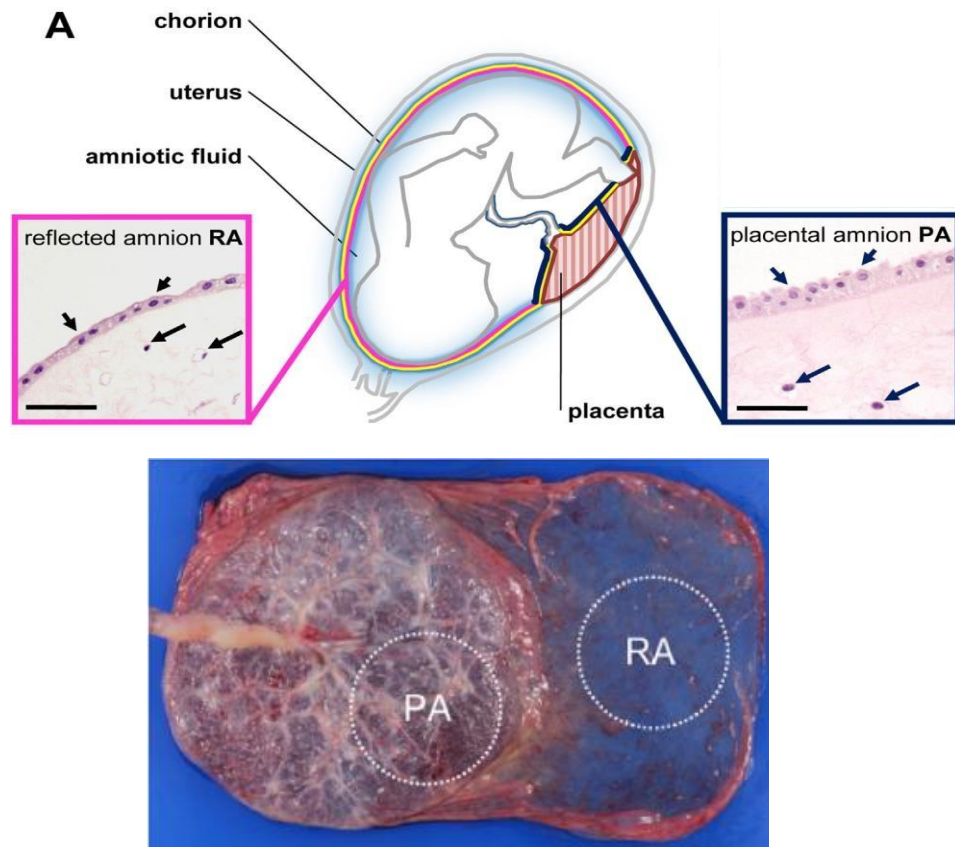
A partir dos estudos empíricos de García-López e seus colaboradores, em 2019, sobre as variações histológicas regionais, particularmente entre o âmnio placentário, refletido e âmnio umbilical, sugeriu-se que o âmnio humano é biologicamente variado. Para comprovar essa hipótese, eles examinaram, por meio de microarrays, o efeito da região na expressão global de 388 genes. Demonstraram a presença do mRNA e da proteína dos principais fatores de pluripotência nas diferentes regiões do tecido do âmnio humano. No entanto, a imunolocalização de OCT-4 e NANOG foi citoplasmática, enquanto a imunolocalização de SOX-2 foi nuclear, independentemente da região analisada. Apesar disto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o âmnio refletido e o âmnio placentário.

Moraes *et al.* (2021) analisaram a MA em 4 regiões diferentes de acordo com sua posição em relação ao cordão umbilical: área central, intermediária, periférica e refletida. Os resultados encontrados 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. Weidinger *et al.*, (2021) Observaram que as áreas periféricas e refletidas têm 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.

De acordo com Banerjee *et al.* (2015), e Horvath *et al.*, (2023), a atividade mitocondrial é significativamente superior na região do âmnio placentário. Logo, sugeriu-se que o PA pode possuir uma capacidade antioxidante mais elevada. Em conjunto, esses elementos podem afetar de maneira crítica a funcionalidade, as características secretoras, a capacidade de diferenciação e enxerto celular e o destino das células da MA, aspectos que devem ser levados

em conta para a regeneração de tecidos.

Figura 3 - Diferenciação morfológica e topográfica do âmnio placentário e âmnio refletido.



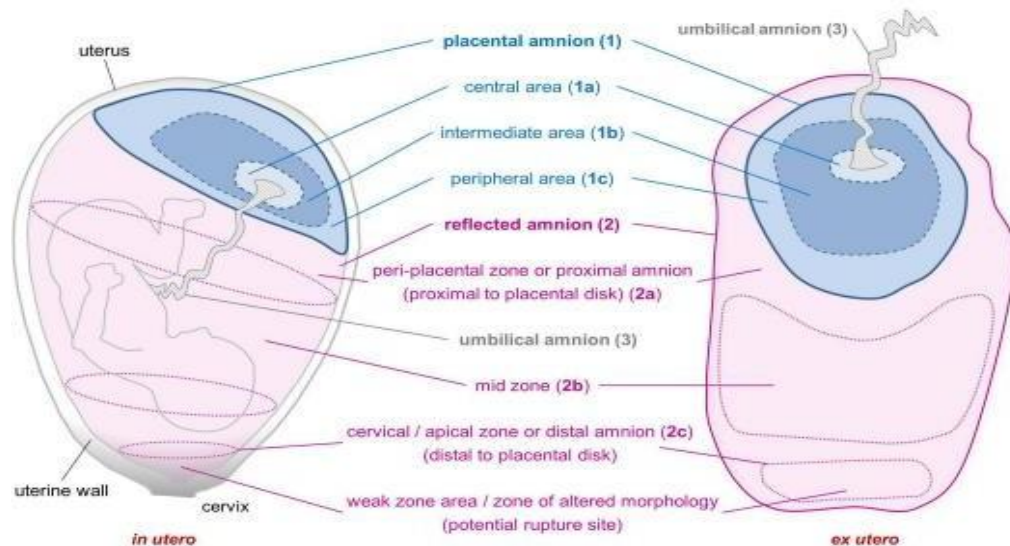
Fonte: Han *et al.* (2008); Banerjee *et al.* (2015)

Farhadihosseinabadi *et al.* (2018) e Avilla-Royo *et al.* (2021), notaram variações na transparência entre as regiões. Os âmnios foram coletados de áreas placentárias e refletidas de placentas obtidas por meio de cesarianas eletivas, com a finalidade de analisar os impactos da eliminação da camada epitelial (descelularização) e da camada esponjosa na transparência e espessura das membranas frescas e liofilizadas. A análise histológica e a microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para avaliar a superfície epitelial da MA. A área refletida apresentava-se mais fina e transparente do que a área do âmnio placentário. Com base na avaliação histológica, descobriu-se que a principal razão para as diferenças entre estas áreas decorria das células da camada epitelial. A descelularização aprimorou a transmissão de luz através da MA, seja na área do âmnio placentário, como na região refletida.

Em seu estudo, Litwiniuk *et al.* (2018) Sugeriram que a membrana amniótica (MA) na

área da placenta, particularmente nas membranas de parto fisiológico (natural), é marcada por elevadas concentrações de fatores de crescimento e reguladores do *turn-over* da matriz extracelular, que estimulam o processo de regeneração dos tecidos. Desta forma, sua aplicação pode ser mais eficiente no tratamento de feridas que não cicatrizam. Por outro lado, as membranas amnióticas obtidas de cesarianas eletivas, especialmente suas porções cervicais, são relativamente pobres em fatores pró-angiogênicos. Essas características poderiam ser potencialmente benéficas, por exemplo, para aplicações oftalmológicas, como tratamento de lesões da córnea e reconstrução da superfície ocular, onde a estimulação da proliferação de fibroblastos ou a angiogênese não são desejadas.

Figura 4 - Esquema representativo do Âmnio placentário (azul) e âmnio refletido (rosa).



Fonte: Weidinger *et al.*, 2021

### 3.4 APLICAÇÕES E PROPRIEDADES DA MA

Dependendo da aplicação de engenharia de tecidos visada, a MA pode ser combinada com materiais naturais ou sintéticos e/ou células adicionais. Desde seu primeiro uso, na reconstrução e transplante de pele pelo Dr. Davis em 1910, a MA tem sido empregada em uma ampla gama de aplicações, tais como 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 (Chávez-garcía *et al.* 2016). Inicialmente, houve grande interesse da comunidade científica por este biomaterial, porém, devido a regulamentos mais rigorosos

sobre transplantes de tecidos, seu uso cessou, e a MA quase desapareceu da literatura por cerca de 50 anos (Versen-H'Oynck *et al.*, 2004; Dua *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2023). O ressurgimento da MA aconteceu na década de 1990, quando foi relatado por Kim *et al.* (1995) como um *scaffold* ou suporte eficaz para reconstrução de superfície ocular. Neste mesmo período, novos protocolos de preparação, preservação e técnicas de armazenamento também foram desenvolvidos, 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). Embora o transplante de MA tenha sido adotado principalmente na oftalmologia para a reconstrução da superfície ocular (úlceras de córnea, defeitos epiteliais persistentes, deficiência de células-tronco do limbo, neoplasia ocular, pterígio) e para a cicatrização de feridas na superfície ocular (por exemplo, lesões químicas e térmicas, doença do olho seco, erosões recorrentes da córnea ou conjuntivite cicatrizante, como a síndrome de Steven Johnson, necrólise epidérmica tóxica, etc.), posteriormente, sua aplicação foi ampliada para o problema de cicatrização de feridas que não sejam oculares, e seu uso vem se ampliando fortemente nas últimas décadas (Horvath *et al.*, 2023).

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. Além disso, a presença de substâncias que podem ser responsáveis pelo efeito analgésico direto da MA tem sido sugerida recentemente (Svobodova *et al.*, 2023).

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 conseqüentemente acelerar o processo de reparação (Prakash; Kalra; Dhal, 2020).

A MA também é usada como superfície de suporte, *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, cimento 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 capacidades regenerativas 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 Irvani *et al.* (2024) 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* nativo 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 a duração e 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, então testadas para 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; Hu *et al.*, 2023).

O sucesso dessas aplicações terapêuticas é devido às propriedades da membrana. E essas propriedades são atribuídas a presença de fatores biológicos solúveis e insolúveis presentes na estrutura da MA (Kopaczka *et al.*, 2016; Silini *et al.*, 2020). 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 permite o transporte de água e a presença de fatores de crescimento como o fator de crescimento epitelial. Tem características vantajosas, incluindo efeitos anti-inflamatórios devido à produção de fatores anti-inflamatórios como ácido hialurônico; supressão de citocinas; propriedades antibacterianas devido a moléculas de defesa como  $\beta$ -defensina e elafina; propriedades antifibróticas devido à regulação negativa de TGF- $\beta$  e sua expressão de

receptor; baixa antigenicidade; bem como propriedades imunomodulatórias como resultado do fator secretado pelas células epiteliais, que inibem a migração de macrófagos e células naturalkiller (glóbulos brancos) para proteger de ataque imunológico materno (Leal-Marín *et al.*, 2020; Wassmer; Berishvili, 2020; Elkhenany *et al.* 2022; Svobodova *et al.*, 2023).

A forma de uso da membrana implica diretamente sobre sua resposta. Iravani e seus colaboradores, em 2024, avaliaram por meio de um modelo experimental em coelhos, se o uso da MA como *scaffold* se mostra eficaz no reparo de cartilagem laringeal. Para tal, foi criado um defeito cartilaginoso de 5 mm na lâmina tireoidiana direita e esquerda. Os animais foram divididos em dois grupos aleatoriamente. No lado direito, o defeito foi coberto com *scaffolds* de colágeno no grupo 1, e *scaffolds* envoltos pela membrana amniótica (MA/C) no grupo 2. Os defeitos do lado esquerdo não foram reparados, servindo como controle. A avaliação histológica foi feita 45 e 90 dias após a aplicação do colágeno e do MA/C com critérios de morfologia do tecido e das células, formação de lacunas, vascularização e inflamação. Com isso, foi observada uma melhora significativa no reparo da cartilagem no lado AM/C em comparação com o lado Controle em todos os critérios histológicos após 45 dias ( $p < 0,05$ ). Após 90 dias, o reparo da cartilagem melhorou significativamente na morfologia celular, na formação de lacunas e na inflamação ( $p < 0,05$ ). A partir destes resultados, concluíram que a combinação de membrana amniótica e *scaffolds* de colágeno oferece uma modalidade de tratamento promissora para melhorar os defeitos da cartilagem laríngea.

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). 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 diminuiu 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 são 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 (García-López *et al.*, 2019). Segundo Leal-Marín *et al.* (2020) as propriedades de elasticidade, rigidez e tração a força estão relacionadas à composição da placenta. A orientação das fibrilas de colágeno na matriz extracelular é responsável pela resistência à tração, enquanto que a deformação elástica está relacionada à presença de fibras de elastina, laminina, ácido hialurônico e glicosaminoglicanas (Leal-Marín *et al.*, 2020). Interessante que o tipo de parto e a região da 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 PRESERVAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

O armazenamento prolongado antes do uso da MA é recomendado pelas agências reguladoras de muitos países para evitar a possibilidade de o doador estar no período de “janela imunológica” da infecção. Assim, vários métodos de preservação, como criopreservação, liofilização, desidratação ou secagem ao ar, foram desenvolvidos. Seja qual for o método utilizado, o processamento e a preservação do hAM afetarão as propriedades do material biológico (Fénelon *et al.*, 2021).

Lamon *et al.*, (2022) avaliaram a viabilidade e preservação da MA quando criopreservada a partir de diferentes protocolos. Foram testadas cinco condições de preservação: dimetilsulfóxido (DMSO) a -180 °C; DMSO a -80 °C, meio à base de dextrana a -180 °C, meio à base de dextrana a -80 °C e congelamento a seco a -80 °C (sem meio). Ao final do período de armazenamento de quatro meses, as propriedades e a estrutura adesiva da MA foram analisadas. Para análises histológicas, os blocos de parafina foram cortados em fatias de 5 µm e três colorações diferentes foram realizadas: hematoxilina e eosina (HE), Periodic Acid-Schiff (PAS) e tricrômio de Masson (MT). Quanto a imunocoloração, esta foi realizada com Anti-corpo anticólageno IV, para análise da composição estromal e Anti-corpo anti-laminina 5, para análise da preservação da lâmina basal.

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 em um banco de tecidos, e o uso em várias aplicações clínicas (Basile *et al.*, 2023; Jafari *et al.*, 2024).

Segundo Mohammad-Pour *et al.*, (2023) 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 Jafari *et al.*, (2024), 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 como criopreservados. Entretanto, na criopreservada a MEV demonstrou danos nas junções intercelulares da camada epitelial, enquanto que a liofilizada preservou estes componentes, sendo assim superior quando a MA for usada como *scaffold* para o crescimento de células endoteliais. Já Ramuta *et al.* (2020), cultivaram células cancerígenas do epitélio da bexiga em ambos os lados da MA criopreservada, verificando uma redução maior na proliferação destas células quando o lado epitelial foi usado como *scaffold*.

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 foi introduzido por Lee e Tseng, em 1997, e consiste no armazenamento da MA em uma solução de 50% glicerol e 50% DMEM, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por até 2 anos, e desde então tem se obtido 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.

Com relação à preservação da viabilidade celular das camadas estruturais da membrana, ainda existem opiniões diversas entre qual é o melhor crioprotetor, glicerol ou DMSO. 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 a alterações nas moléculas intracelulares causadas pela baixa temperatura, e isso pode interferir no seu uso clínico (Mohammad-Pour *et al.*, 2023).

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. Ruiz-Cañada *et al.*, (2021) 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- $\beta$ 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, ao contrário da MA desidratada.

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 MA 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 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 um número reduzido de células, quando comparado 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, mas 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.

Fénelon *et al.* (2019) afirmaram que a criopreservação e a liofilização são as mais comumente usadas nos procedimentos de preservação da MA. Uma vez que a MA foi descelularizada, realizaram a 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.

## 4 METODOLOGIA

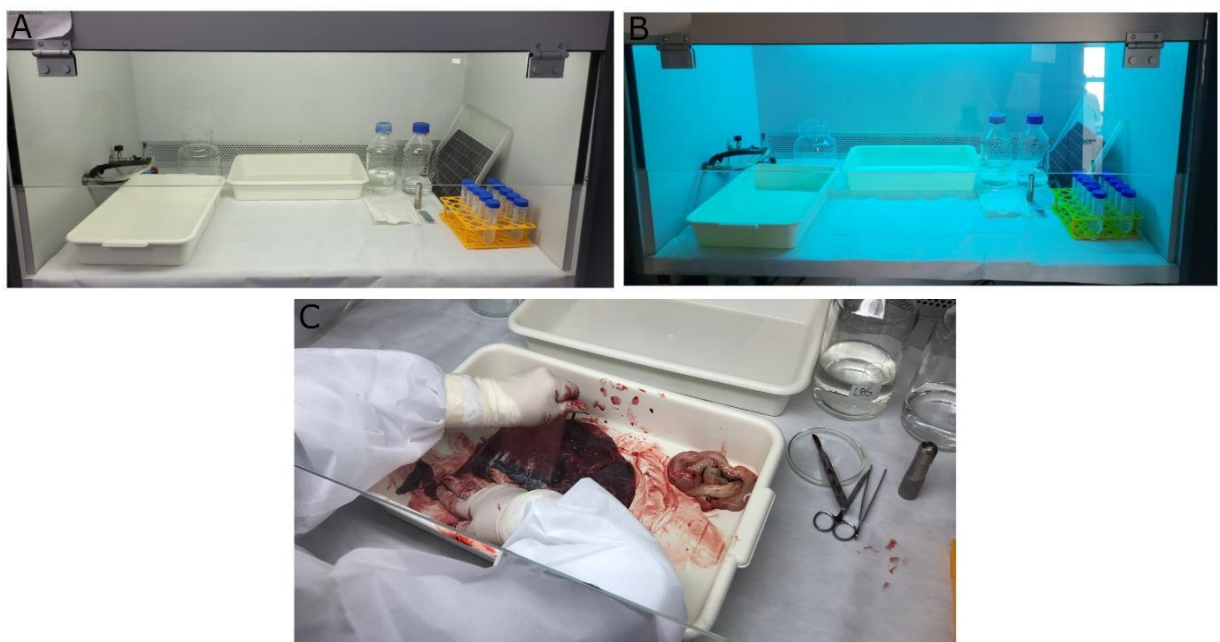
O estudo foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e obteve aprovação com protocolo número 6.537.068.

### 4.1 COLHEITA DA PLACENTA E PROCESSAMENTO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

A MA foi obtida de quatro placentas humanas a termo, com idade gestacional igual ou superior a 39 semanas, a partir de cesárias eletivas de gestantes com gestação normal, provenientes da maternidade do Hospital Santa Casa de São José dos Campos. A colheita da placenta e suas membranas fetais, incluindo a membrana amniótica, foram realizadas mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela gestante e após certificação de sorologia negativa para HIV-1 e 2, hepatite B e C e sífilis.

Em seguida, a MA foi transportada em caixa térmica a temperatura aproximada de 10 a 15 °C. No laboratório, sob fluxo laminar, a MA foi manualmente separada do córion e extensivamente lavada com solução fisiológica contendo 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina e anfotericina B (figura 4).

Figura 5 - (A) Capela de fluxo laminar preparada para o processamento da MA; (B) Esterilização dos materiais pelo fluxo laminar com luz U.V.; (C) 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 do âmnio refletido. As regiões R1, R2, e R3 fazem parte do âmnio placentário (Figura 4). Em seguida, foi seccionada em fragmentos de 3x3 cm<sup>2</sup>, e preservados seguindo o protocolo para cada grupo experimental, descritos no item 4.3. A figura 6 demonstra o aspecto da MA após o seu processamento, assim pronta para ser fragmentada nas sub-regiões.

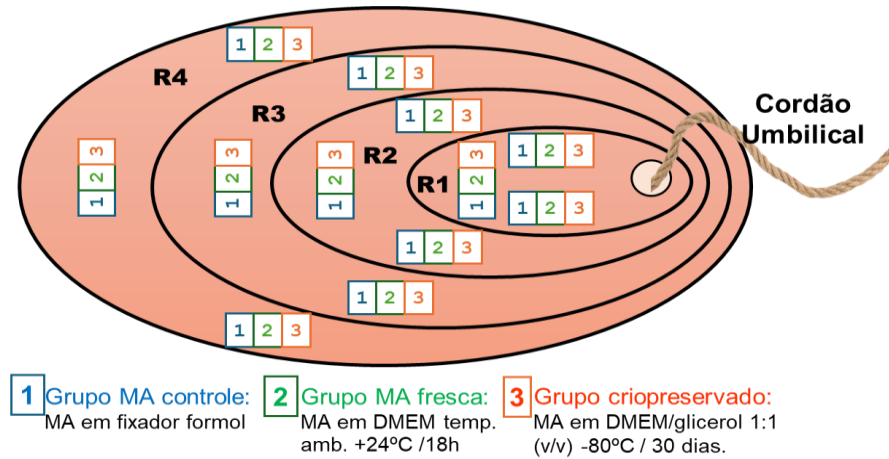
De cada uma das sub-regiões acima descritas foram obtidos 3 fragmentos (amostras) de MA (3x3 cm<sup>2</sup>). De cada região foram obtidos 9 fragmentos ou amostras de (3x3 cm<sup>2</sup>), sendo 3 fragmentos para cada um dos grupos experimentais. Considerando que são 4 sub-regiões, cada grupo foi composto por 12 fragmentos. Então, 12 fragmentos no grupo controle, 12 no grupo fresca e 12 fragmentos no grupo criopreservada. Assim, em cada uma das 4 placentas foram obtidos 36 fragmentos (= 9 fragmentos x 4 sub-regiões). (Figura 7).

Figura 6 - Fragmentação da MA. (A) MA separada do córion, com aspecto transparente e com um espaço central (local do cordão umbilical removido). (B) MA sobre fundo preto pautado para corte de sub-regiões. (C) Padrão de corte 3x3cm<sup>2</sup> (círculo) para cada sub-região.



Fonte: Autor

Figura 7 - Representação esquemática de uma placenta mostrando as sub-regiões, incluindo R1 (região central), R2 (região intermediária), R3 (região periférica), e R4 (âmnio refletido). Os quadrados marcados com o número 1, 2 e 3 representam os fragmentos 3x3cm<sup>2</sup> 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, possuindo o mesmo número de fragmentos em cada um dos grupos experimentais. No grupo controle (GC, n=12), os fragmentos de membrana após serem processados, conforme descrito no item 4.1, foram imersos imediatamente em formol. Já no grupo MA fresca (GF, n=12) os fragmentos de membrana após serem processados, foram imersos em meio DMEM a temperatura ambiente (24 °C) por 18 h. E, no grupo MA criopreservada, (Gcrio, n=12) os fragmentos de membrana, após serem processados, foram imersos em meio DMEM/glicerol 1:1 (v/v) a -80 °C por 30 dias.

#### 4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os fragmentos iniciais obtidos de ambos os grupos experimentais foram, primeiramente, clivados em fragmentos menores, com cerca de 1,5x1 cm<sup>2</sup>, e colocados em triplicata dentro de cassetes histológicos forrados com gaze. Estes foram armazenados em formol por 24 horas a fim de interromper o metabolismo celular no tecido (Fixação), para posteriormente serem lavados por 3 vezes com água corrente e embebidos em álcool 70 % por 12 horas.

Após este período, iniciou-se o processamento histológico com a retirada dos cassetes do álcool 70 % e passagem para 4 estações subsequentes de álcool absoluto (100 %), de 50 minutos

cada, para desidratação dos tecidos.

Finalizada a última estação de álcool, os cassetes histológicos foram passados para um béquer contendo xilol, para início da etapa de diafanização, visando remover completamente o álcool do interior dos tecidos e preparando-os para as impregnações em parafina, sendo realizada em duas estações, a primeira de 20 minutos e a segunda de 30 minutos.

As impregnações em parafina foram realizadas em duas estações dentro da estufa, a fim de manter a parafina líquida, em cerca de 56 °C a 60 °C. A primeira etapa da impregnação durou 1 hora e 15 minutos, seguida da segunda estação, de 2 horas e 15 minutos.

Por fim, realizou-se a etapa de inclusão dos fragmentos em parafina, a fim de obter-se os blocos finais utilizados para confecção dos cortes histológicos por microtomia. A inclusão foi realizada com o auxílio de pinça previamente aquecida, um molde metálico para a blocagem e a base do cassete. Primeiramente, colocou-se parafina aquecida no molde, e em seguida os fragmentos foram retirados do interior dos cassetes com auxílio de pinça e colocados dentro da parafina no molde; após isso, o cassete foi desmontado e sua base foi colocada sobre o molde e em contato com a parafina. Por fim, os moldes com material incluído foram colocados sobre uma placa resfriada, com intuito de solidificar a parafina e possibilitar a retirada do bloco final.

#### 4.5 MICROTOMIA E MONTAGEM DAS LÂMINAS

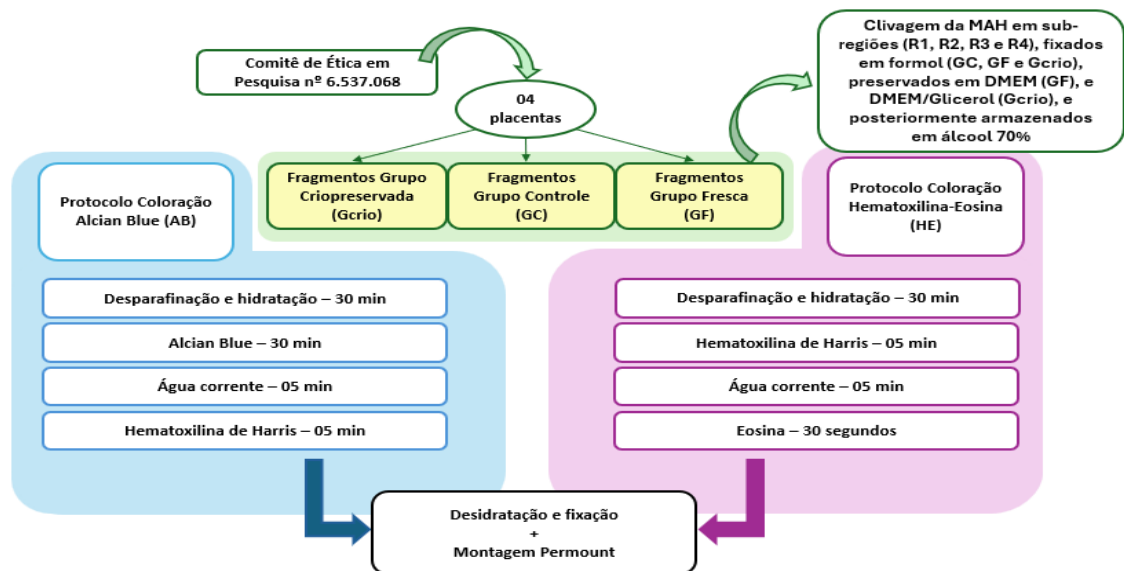
Para a execução dos cortes, utilizou-se um micrótomo semiautomático Leica RM2245. Os blocos contendo os fragmentos da MA foram fixados na base do micrótomo e alinhados verticalmente ao fio da navalha. Para retirada do excesso de parafina, foi utilizada a configuração “TRIM” do aparelho, com medida de corte em 10µm. Assim que alcançados os fragmentos dentro do bloco, alterou-se o aparelho para configuração “SECT”, cuja espessura de corte para confecção de lâminas para as colorações histológicas (Hematoxilina Eosina-HE e Alcian Blue-AB) foi de 5 µm, e para as lâminas voltadas a imunohistoquímica foi de 4 µm. Com auxílio da pinça, foi retirada a fita formada após o corte e levada até o banho-maria, para distensão dos cortes. A temperatura do banho-maria estava em torno de 40 °C para total distensão dos cortes sobre a superfície da água, evitando-se a formação de pregas.

Por fim, foram utilizadas lâminas adesivas sinalizadas (Menzel-Glaser, Braunsch, Germany) para coleta dos cortes. As lâminas foram deixadas sobre a borda metálica do banho-maria para secagem e posteriormente guardadas para as próximas etapas.

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a realização das análises, as lâminas selecionadas foram previamente desparafinizadas em duas estações de xilol, e hidratadas em séries crescentes de etanol (70%, 95% e 100%), e uma estação de água destilada, todas por 5 minutos. Após esse processo, as lâminas foram coradas, de acordo com os protocolos específicos de cada coloração utilizada (figura 7). Em seguida, foram desidratadas em álcool 95% e 100%, diafanizadas em xilol e montadas com lamínula e Permount.

Figura 8 - Esquema representativo do protocolo de colorações HE e Alcian Blue

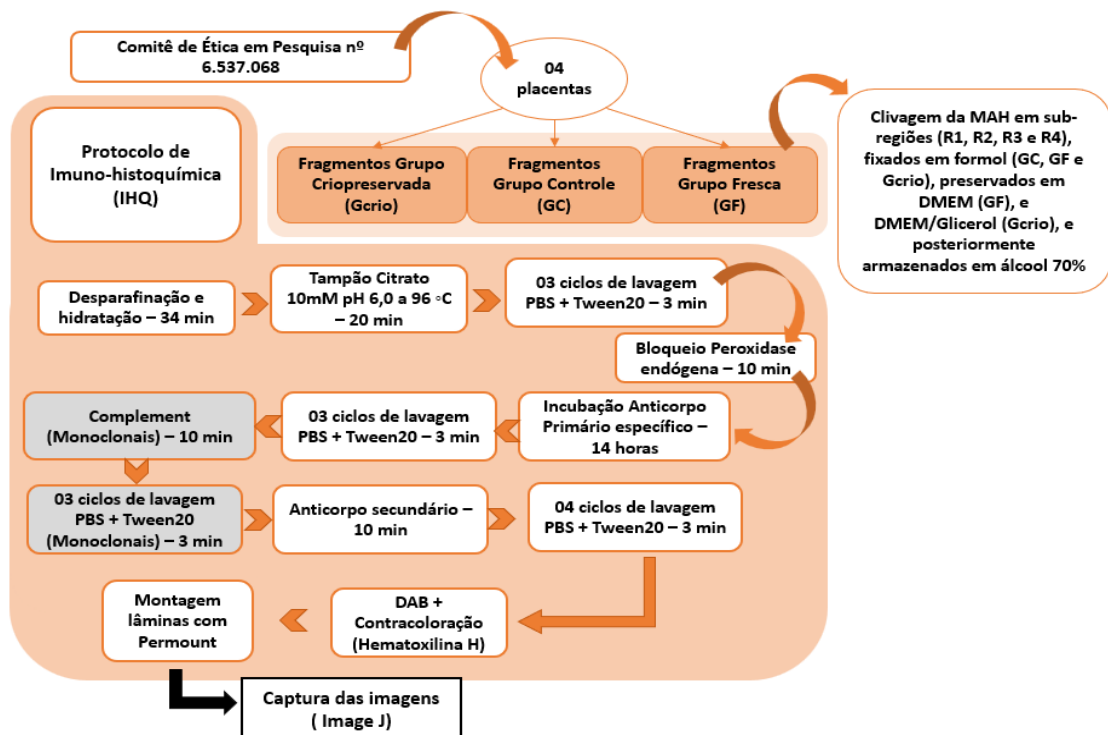


Fonte: O autor

Para o método da imuno-histoquímica (Figura 8), as amostras de todos os grupos experimentais foram desparafinizadas, em duas estações de xilol, por 10 minutos cada, seguida pela desidratação, em séries crescentes de etanol (70%, 95% e 100%), por 3 minutos em cada concentração, e uma estação de água destilada, todas por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram colocadas em banho-maria, em solução de tampão citrato 10mM pH 6,0 a 96 °C por 20 min, seguido da imersão em água destilada, visando a recuperação antigênica. Para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena, as lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em câmara úmida, para incubação com o reagente Hydrogen Peroxide Block do kit EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (Abcam®, Cambridge, UK; ab80436), por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se 3 lavagens em PBS+0,05 % Tween 20 (Sigma, Saint Louis, MO, E.U.A.) (PBST) e a adição da solução

Protein Block, reagente do mesmo kit EXPOSE citado acima, por 10 min, visando bloquear possíveis marcações inespecíficas. Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo (Ac) primário (Monoclonal/Policlonal), em câmara úmida a 4 °C durante 14 horas. Os anticorpos utilizados foram: 1) Anticorpo policlonal anti-wide spectrum cytokeratins (WSCK) (ab9377, diluição 1: 300; Abcam®); 2) Anticorpo anti-collagen I (ab34710, diluição 1:200; Abcam®); 3) Anticorpo policlonal anti-laminin alpha 5/LAMA5 (CL3118) (ab210957, diluição 1:200; Abcam®). Após 3 lavagens de 3 min/cada, com tampão PBST, foi adicionado o reagente Complement do kit EXPOSE, em reações utilizando-se anticorpos primários monoclonais (Anti-laminina), seguido por 3 lavagens de 3 min/cada com PBST. Para as reações com anticorpos policlonais, a incubação de Ac primário foi sucedida pela adição do Ac secundário (Goat anti-rabbit HRP Conjugate of EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (Abcam®, Cambridge, UK; ab80436), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Em seguida, realizou-se lavagens com tampão PBST, e a adição de substrato/cromógeno DAB– Kit Abcam®, seguido da contracoloração com hematoxilina de Harris por 35 segundos, desidratação em álcool 95 % e 100 %, diafanização em xilol e montagem com Permount. A especificidade da reação antígeno-anticorpo foi testada por meio da substituição dos anticorpos primários pelo tampão PBS + 0,05 % Tween 20.

Figura 9 - Esquema representativo do protocolo de Imuno-histoquímica.



#### 4.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DE IMAGEM

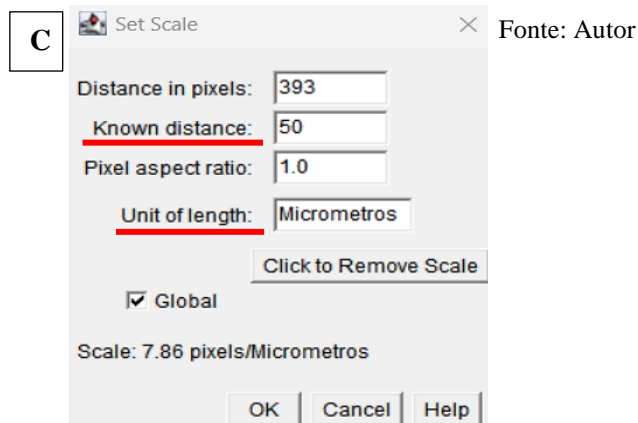
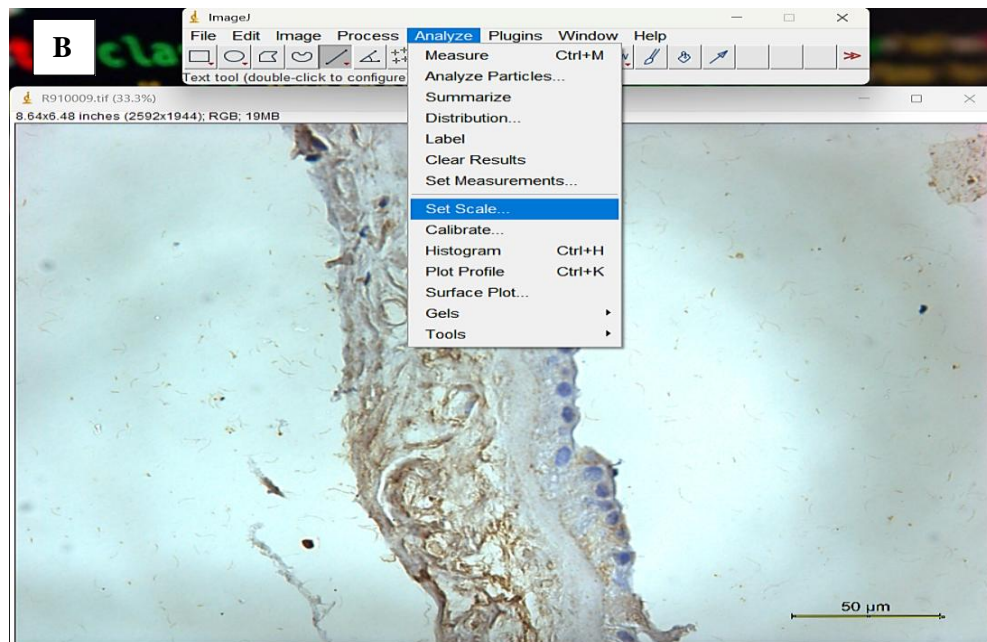
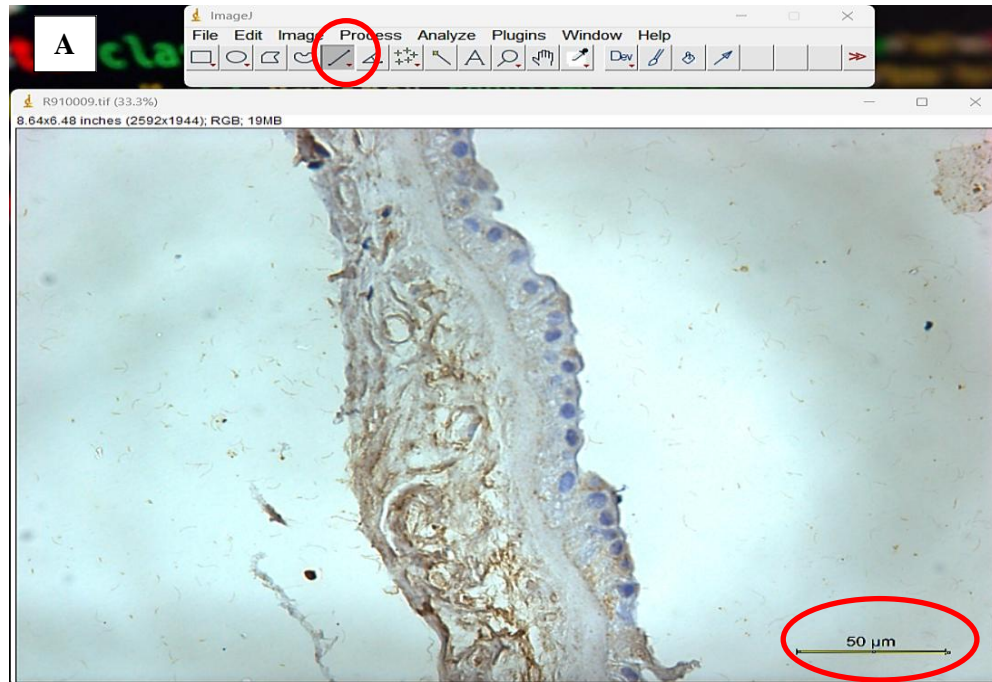
As imunomarcações foram avaliadas ao microscópio de luz, observando a distribuição e/ou intensidade dos componentes de interesse e, quantitativamente, pela análise digital de imagem para a obtenção da área ocupada pela expressão da citoqueratina, colágenos tipo I e III, e laminina na MA, em cada uma de suas sub-regiões, nos 3 grupos experimentais.

Para isto, após a obtenção das lâminas histológicas, as imagens microscópicas das imunomarcações foram visualizadas no Microscópio Trinocular Leica DM2500 e capturadas por uma câmera digital (LEICA DFC 425) e digitalizadas em 1024x768 pixels, 24 bits / pixel de resolução com ampliação global de 400 x. Em seguida, as imagens digitais foram processadas e analisadas pelo software Image J (Varghese *et al.*, 2014) o qual identifica, isola e determina a porcentagem das áreas ocupadas pelas imunomarcações (áreas marcadas em marrom) nos cortes histológicos das membranas amnióticas dos 3 grupos experimentais em relação a área total da imagem.

Para a análise da área ocupada por cada uma das imunomarcações, a área de 60 campos histológicos (20 campos por cada um dos 3 fragmentos por MA/placenta) foi usada para gerar um único valor para cada MA por placenta, em cada uma das 4 sub-regiões, de cada grupo experimental.

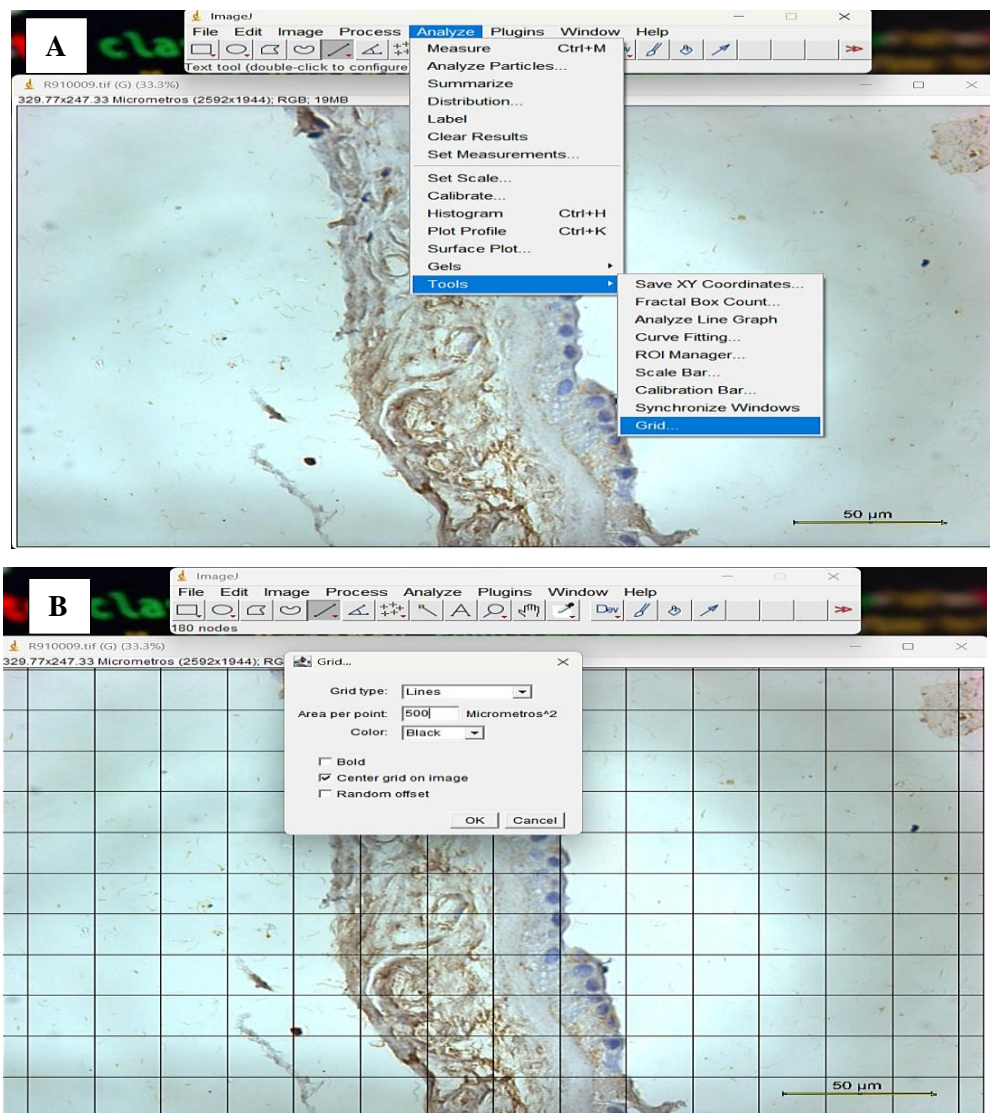
As figuras 10, 11 e 12 representam a sequência para análise das imagens digitais no software Image J. Primeiramente, as imagens foram abertas no software Image J, e a calibração da escala da imagem foi realizada clicando-se na ferramenta “*Straight*” e traçando-se uma linha de mesmo tamanho com a barra de escala em micrometros presente na imagem. Em seguida, clicou-se em “*Analyze*” e escolheu-se a opção “*Set scale*”. Na configuração da escala, no espaço designado “*Know distance*”, foi colocado o valor da barra de escala da imagem, 50 µm, e em “*Unit of length*” foi colocada a unidade de medida da imagem, setada em “micrometros”, e clicou-se “Global” para que todas as imagens analisadas seguissem a mesma configuração, e clicou-se em “Ok” (Figura 10).

Figura 10 - Calibração da escala para análise global das imagens. (A) Ferramenta Straight para mensuração da barra de escala; (B) Set scale para abrir caixa de calibração da escala; (C) Caixa de calibração de escala da imagem.



Com a calibração da escala realizada, clicou-se em “Analyze” e em seguida em “Tools”, e selecionou-se a ferramenta “Grid”. Ao clicar na ferramenta, uma caixa de diálogo com as especificações da grade surgiu. No espaço designado “Grid type” foi selecionado “lines” e em “Area per point” foi estabelecido um valor de  $500 \mu\text{m}^2$ , relacionado a cada quadrado formado pela grade (Figura 11).

Figura 11 - Configuração da Grade para análise Estereológica. (A) Ferramenta Grid; (B) Configuração da Grade.

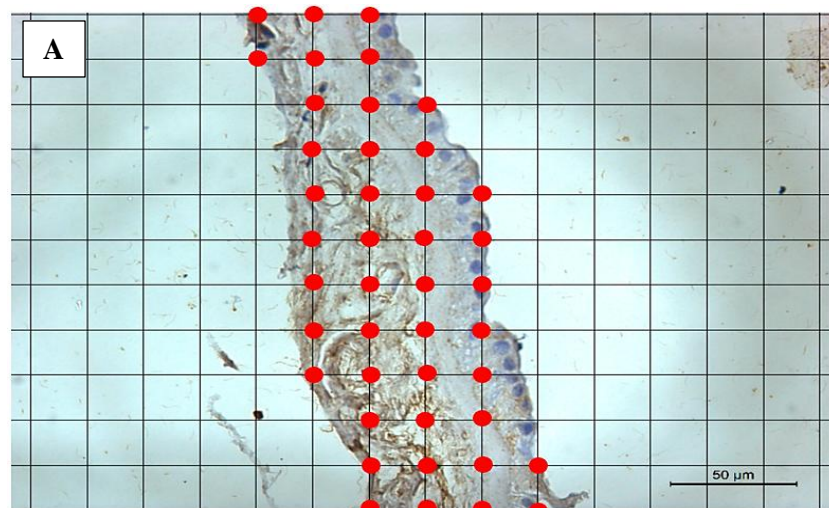


Fonte: Autor

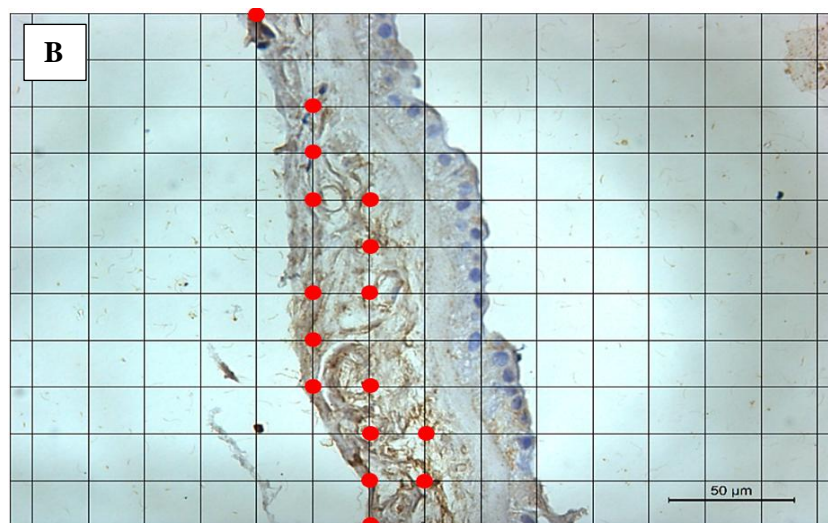
A partir da configuração da grade, foi possível calcular a área total da imagem, por meio do princípio de Cavalieri de contagem de intersecções. A partir da contagem inicial de 15 pontos no eixo horizontal e 12 pontos no vertical, obteve-se um total de 180 pontos de intersecção, que

representam a área total de imagem, formada por 329,77  $\mu\text{m}$  no eixo horizontal e 247,33  $\mu\text{m}$  no eixo vertical, gerando a área total de 81.562  $\mu\text{m}^2$ . Esta medida de área foi adotada como padrão global para todas as imagens analisadas. Com a área total calculada, foi possível calcular a área total de tecido da MA usando o mesmo princípio, onde foram contabilizados apenas os pontos de intersecção que se encontravam acima da membrana. Com isso, foram obtidos os valores de área útil de cada imagem, e pudemos prosseguir com a contagem de intersecções para cálculo da marcação alvo desejada (imunomarcações para CK e Col.1), a fim de estipular o percentual de suas concentrações (Figura 12).

Figura 12 - Calculo de área por contagem de intersecções. (A) Contagem de intersecções para mensuração da área total de tecido da MA; (B) Contagem de intersecções para mensuração da marcação alvo.



Marcações Área Útil (Mau)= 43pts



Marcações Alvo (Malv) = 16pts

Fonte: Autor

Os pontos contabilizados referentes ao tecido da MA foram então divididos pelo número de pontos da área total da imagem para resultar em um valor em  $\mu\text{m}^2$ . O valor encontrado diz respeito à área útil da MA e foi utilizado para, ao ser dividido pelo número de intersecções da marcação alvo desejada, resultar no percentual de marcação obtido naquele fragmento analisado.

$$\text{Área Total} = 180\text{pts} = 81.562 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Mau} = 43\text{pts} = 43/180 \times 81.562 = 19.484 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Malv} = 16\text{pts} = 16/43 \times 19.484 = 7.249 \mu\text{m}^2$$

$$\% \text{ Marcação Alvo} = \text{Malv}/\text{Mau} = 16/43 = 0,37 = \boxed{37\%}$$

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à Análise de Variância paramétrica One-Way (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (\*p). A análise dos dados e a construção dos gráficos foi realizada com o programa EXCEL Data Analysis Toolpak.

## 5 RESULTADOS

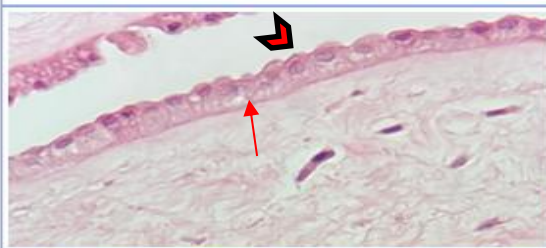

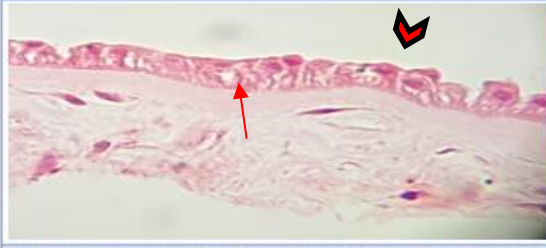
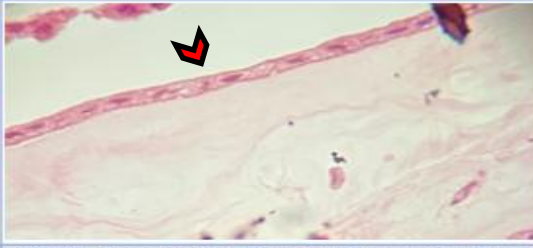
Esta seção descreve os aspectos morfológicos e composicionais de cada sub-região da MA observados a partir das colorações histológicas e marcações imuno-histoquímicas, em cada um dos grupos experimentais.

### 5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA: HEMATOXILINA-EOSINA

A fim de avaliar os efeitos dos diferentes métodos de preservação na integridade estrutural, as amostras de MA coradas por HE do GC foram avaliadas quanto a morfologia de cada camada presente (Quadro 1), e posteriormente comparadas as amostras dos demais grupos, GF e GCrio (Figura 13).

Com os padrões definidos (referências – Quadro 1), foi realizada análise descritiva, comparando os grupos experimentais, em cada sub-região da MA, determinando os padrões de normalidade e as variações encontradas em relação às regiões e aos métodos de preservação utilizados.

Quadro 1 - Padronização dos achados morfológicos das sub-regiões da MA por coloração HE obtidos do GC com a descrição do aspecto normal de cada camada. Cabeça de seta: camada epitelial; Seta: vacuolizações citoplasmáticas. Aumento original de 40x.

R1	R2
	
Células epiteliais com formato de “cúpula” (Dome shape) com ápice arredondado, altura intermediária e núcleos centro-apicais; Citoplasma eosinofílico heterogêneo; Presença de vacuolizações citoplasmáticas e “gaps” intercelulares. Camada compacta homogênea e com eosinofilia variada; Camada fibroblástica com numerosas células mesenquimais similares a fibroblastos entre uma trama densa e sinuosa de fibras colágenas; Camada esponjosa apresentou-se densa e contida.	Células epiteliais com formato cubóide, ápice arredondado, altura intermediária e núcleos centro-apicais; Citoplasma eosinofílico heterogêneo; Presença de algumas vacuolizações citoplasmáticas. Camada compacta homogênea e com eosinofilia variada; Camada fibroblástica com numerosas células mesenquimais similares a fibroblastos entre uma trama densa e sinuosa de fibras colágenas; Camada esponjosa apresentou-se densa e contida.
R3	R4
	
Células epiteliais com formato colunar, com alturas variando entre intermediárias e altas, núcleos apicais e citoplasma eosinofílico heterogêneo; Presença de vacuolizações citoplasmáticas e “gaps” intercelulares. Camada compacta homogênea e com eosinofilia variada; Camada fibroblástica com numerosas células mesenquimais similares a fibroblastos entre uma trama densa e sinuosa de fibras colágenas; Camada esponjosa apresentou-se densa e contida.	Células epiteliais com formato pavimentoso, altura baixa e núcleos centralizados; Citoplasma homogêneo, e ausência de vacuolizações. Camada compacta homogênea e com eosinofilia menos evidente; Camada fibroblástica com poucas células mesenquimais similares a fibroblastos entre uma fina fibra de colágeno; Camada esponjosa apresentou-se mais alongada, dispersa e difusa.

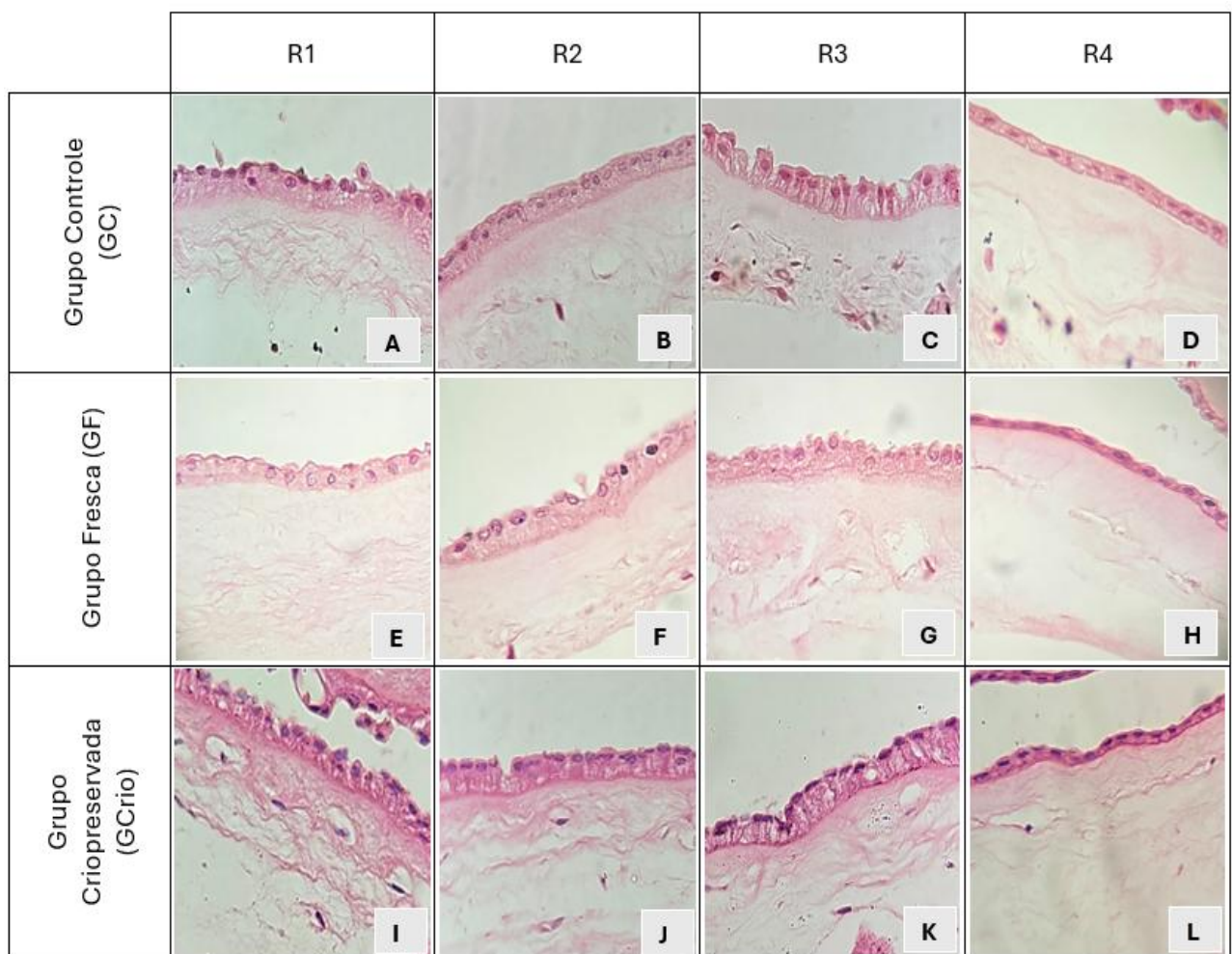
Fonte: Autor

Em todas as sub-regiões anatômicas analisadas (R1, R2, R3 e R4), as MA dos grupos experientais GF e GCrio eram compostas por cinco camadas estruturais (epitélio, membrana basal e as camadas compacta, fibroblástica e esponjosa) com aspectos morfológicos similares aos encontrados nas membranas do GC.

A região PA (R1, R2 e R3) apresentou uma camada de epitélio colunar simples, com células justapostas sobre a camada basal e núcleos na porção apical das células, contrastando com os achados da região RA (R4), a qual evidenciou epitélio com células cuboidais baixas, com núcleos centralizados. Ademais, nas sub-regiões R2 e R3 da região PA, as células mostravam alguns espaços intercelulares levemente mais alargados do que os encontrados em R1. A camada compacta se mostrou homogênea, com eosinofilia variada na região PA e menos evidente na RA. Quanto à camada fibroblástica, na região PA, esta apresentou-se com

células mesenquimais similares a fibroblastos entre uma trama densa e sinuosa de fibras colágenas na região PA, enquanto na região RA estas células estavam menos presentes, e intercaladas entre finas fibras de colágeno. Por fim, a camada esponjosa apresentou-se mais retraída nas regiões da PA, e difusa e dispersa na região de RA. As amostras do GF e GCrio obtiveram resultados semelhantes aos do GC, preservando a morfologia estrutural das camadas da MA e de seus componentes.

Figura 13 - Fotomicrografias da coloração HE da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e GCrio (i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.



Fonte: Autor

## 5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA: ALCIAN BLUE

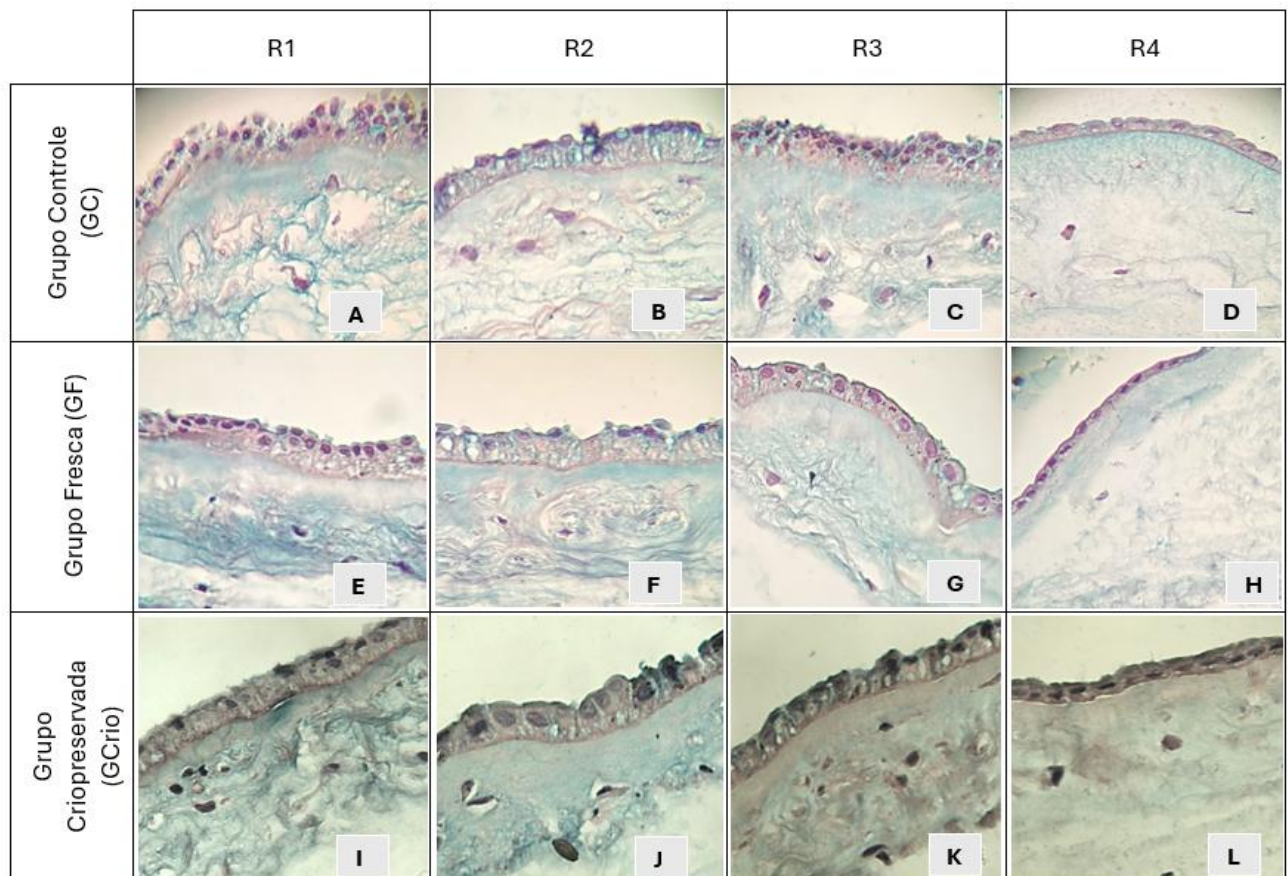
Para a avaliação dos componentes da camada mesenquimal, tais quais as glicosaminoglicanas (GAGs) ácidas (coradas em azul), como o ácido hialurônico, foi

realizada coloração de Alcian Blue. As MA referentes a região PA apresentaram padrão semelhante dos componentes da MEC, com as camadas compacta e fibroblástica apresentando-se heterogêneas, contíguas e mais proeminentes, em comparação à camada esponjosa, que se mostrou menos expressiva, em relação as demais camadas.

Já nas membranas referentes a região RA, foi encontrado padrão distinto, com as camadas iniciais, compacta e fibroblástica, ainda expressivas porém mais homogêneas, e uma camada esponjosa maior, difusa e dispersa.

Assim, esses resultados da análise por alcian blue se mantiveram semelhantes em todas as sub-regiões dos três grupos experimentais analisados demonstrando uma boa preservação das GAGs na camada mesenquimal ( Figura 14).

Figura 14 - Fotomicrografias da coloração AB da MA. GC (a, c, e , g), GF (e, f, g, h) e Gcrio ( i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.

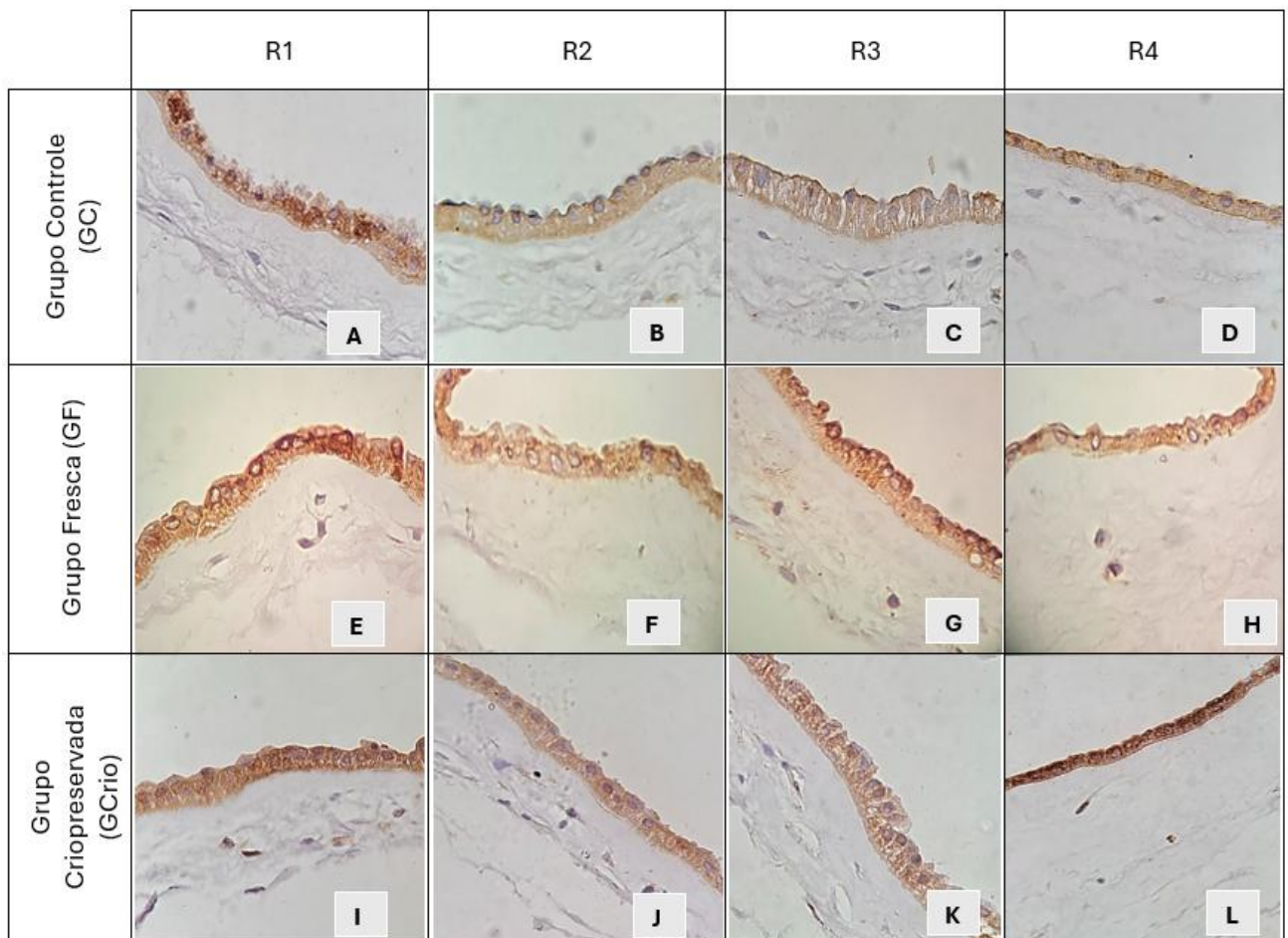


Fonte: Autor

### 5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E QUANTITATIVA DE IMAGEM: CITOQUERATINA (CK) – INTEGRIDADE DA CAMADA EPITELIAL

A análise qualitativa da imunomarcção de CK demonstrou uma marcação de coloração acastanhada no citoplasma celular, distribuída por toda a extensão da camada epitelial, de forma homogênea, sem diferença entre as sub-regiões ou grupos experimentais (Figura 15). Em todo GC, e nas demais membranas do GF e Gcrio, a imunomarcção variou levemente no interior do citoplasma de algumas células mostrando regiões com menor intensidade. Além desse aspecto, em todos os grupos, foi observada a presença de regiões pontuais com maior intensidade de marcação no interior do citoplasma, localizadas próximo ou ao redor dos núcleos.

Figura 15 - Fotomicrografias da imunomarcção de CK da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e Gcrio (i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.

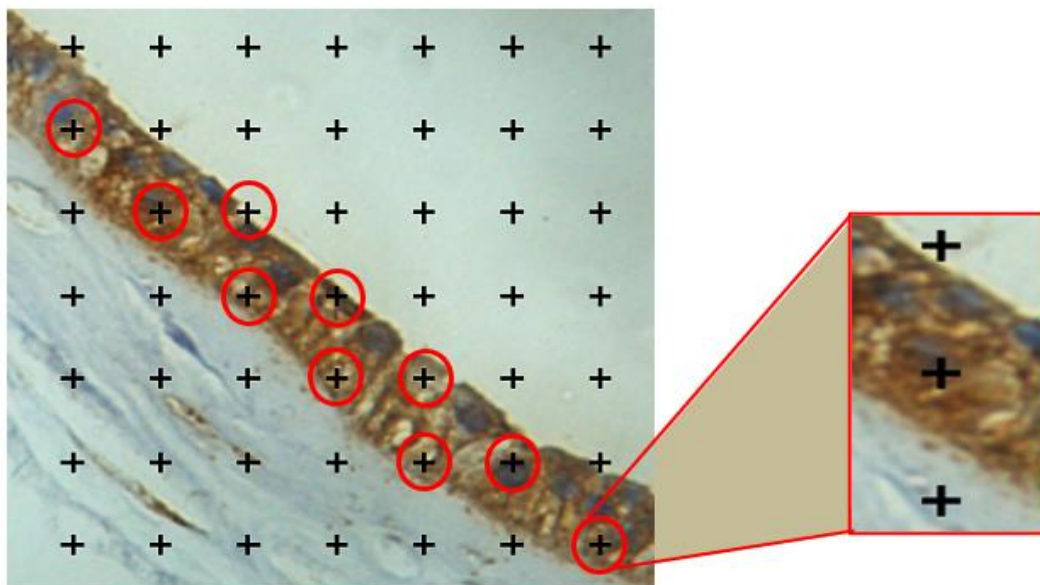


Fonte: Autor

Os cortes histológicos analisados neste estudo apresentaram imunomarcção positiva e homogênea em toda camada epitelial da MA, indicando a presença de filamentos intermediários de CK no interior das células epiteliais do GC, bem como a preservação dessas estruturas nas células do GF e GCrio.

Para a análise quantitativa da imunomarcção de CK, como critério de escolha da intensidade de imunomarcção a ser contabilizada, foi estabelecido um padrão global de coloração adotado para todas as imagens analisadas (Figura 16).

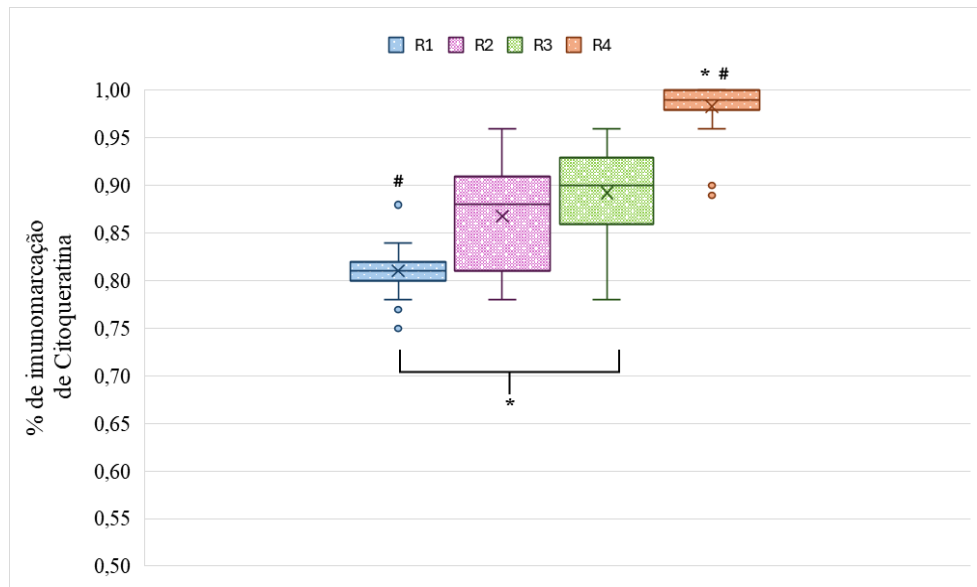
Figura 16 - Padrão global de coloração adotado para contagem da imunomarcção de Citoqueratina.



Fonte: Autor

A análise intragrupos avaliou o percentual de imunomarcção de CK entre as diferentes sub-regiões da MA em todas as placentas avaliadas. A partir das análises, foi possível observar um percentual médio de 81% de marcação em R1; 86% em R2; 89% em R3; e 98% em R4. Os resultados foram analisados pelo teste de Variância paramétrica One-Way (ANOVA), resultando em  $p = 2,90 \times 10^{-16} < 0,05$ , estatisticamente significativo (Figura 17), indicando que houve diferença considerável entre as médias das marcações de CK entre as sub-regiões da MA. Foi realizado teste de comparações múltiplas de Tukey, que evidenciou que há diferença significativa entre as médias de todas as sub-regiões de PA e a de R4 (R1, R2, R3  $\neq$  R4)(\*) e também entre R1 e R4 (#), ao nível 5% de significância.

Figura 17 - Resultado do Teste ANOVA das sub-regiões R1, R2, R3 e R4 avaliados.

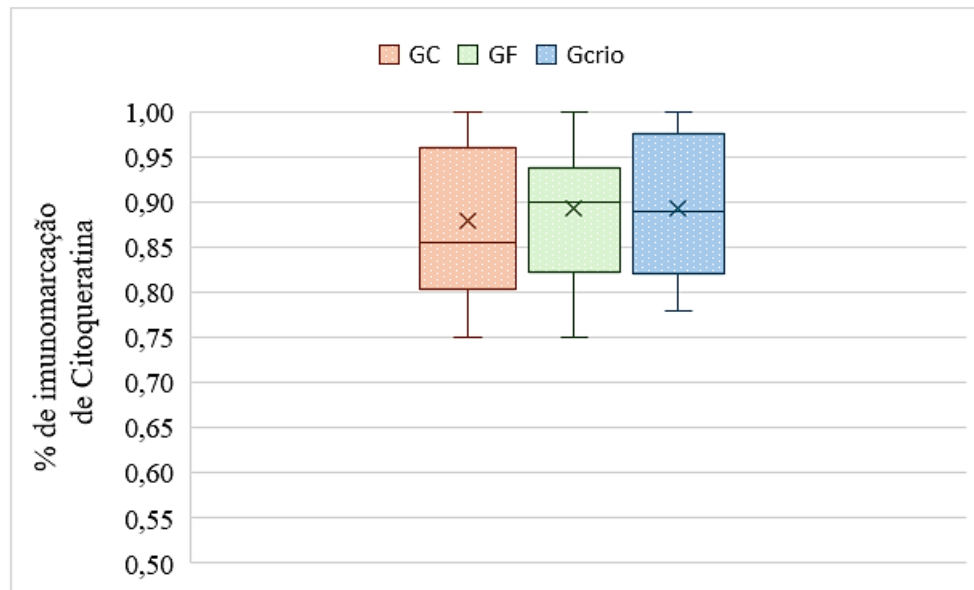


Legenda: Valor  $*p = 2,90 \times 10^{-16} > 0,05$ , estatisticamente significativo (\*).

Fonte: Autor

Já a análise intergrupos avaliou o percentual de imunomarcção de CK entre os grupos experimentais avaliados. A partir das análises, observou-se um percentual médio de 88% de marcação no GC; 89% no GF; e 89% no GCrio. Os resultados foram analisados pelo teste de Variância paramétrica One-Way (ANOVA), resultando em  $p = 0,18 < 0,05$ , não estatisticamente significativo (Figura 18), indicando que não houve diferença considerável entre as médias das marcações entre os grupos analisados, o que evidencia a preservação da integridade da camada epitelial pelos protocolos de armazenamento utilizados.

Figura 18 - Resultado do Teste ANOVA dos grupos experimentais GC, GF e GCrio avaliados.

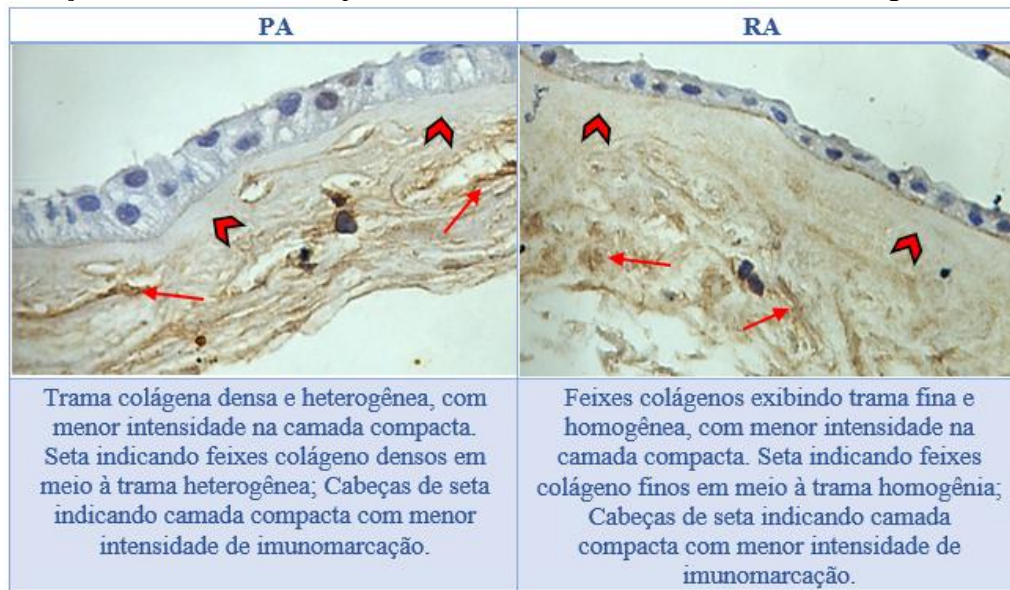


Legenda: Valor  $p = 0,18 < 0,05$ , não estatisticamente significativo.  
Fonte: Autor

#### 5.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E QUANTITATIVA DE IMAGEM: COLÁGENO TIPO I (COL.1)

A imunomarcagem de Colágeno tipo I foi encontrada em feixes e fibras em toda extensão da camada mesenquimal da MA, com menor intensidade na camada compacta. A análise qualitativa evidenciou uma trama colágena densa e heterogênea nas regiões do âmnio placentário (R1, R2 e R3), diferente do padrão encontrado no amnion refletido (R4), com os feixes colágenos exibindo trama fina e homogênea (Quadro 2).

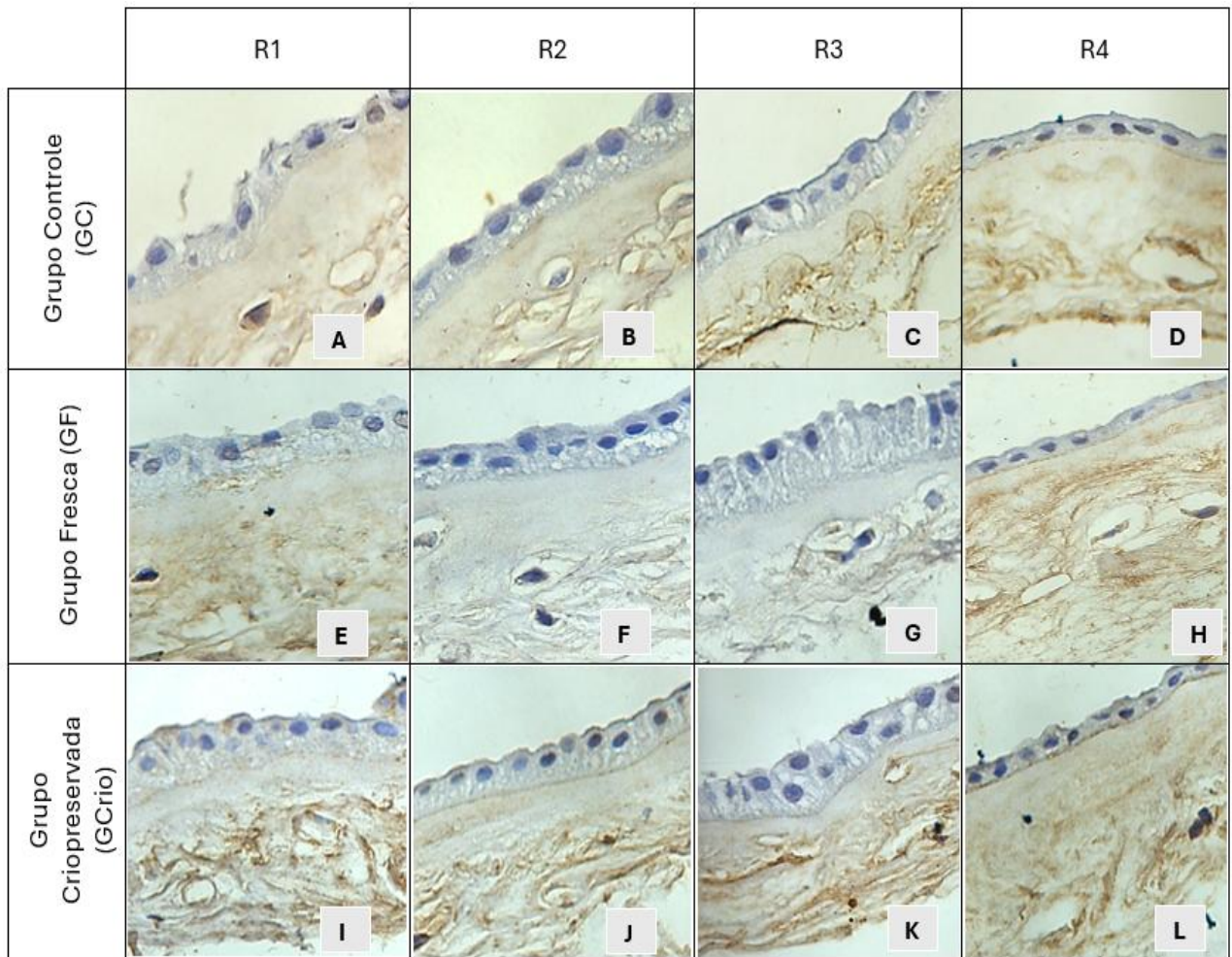
Quadro 2 – Relação das imunomarcações de Colágeno I da MA entre as regiões de PA e RA. Cabeça de seta: camada compacta; seta: camada fibroblástica. Aumento original de 40x.



Fonte: Autor

O Grupo Controle exibiu imunomarcação em trama colágena heterogênea, com feixes ligeiramente ondulados apresentando regiões de marcações mais e menos intensas. No grupo fresca, a trama se apresentou bem homogênea, densa e com discreta perda de definição. No grupo criopreservada, a trama se apresentou semelhante à descrita para o grupo controle, porém com maior densidade e definição entre as imunomarcações dos feixes de fibras da trama colágena (Figura 19).

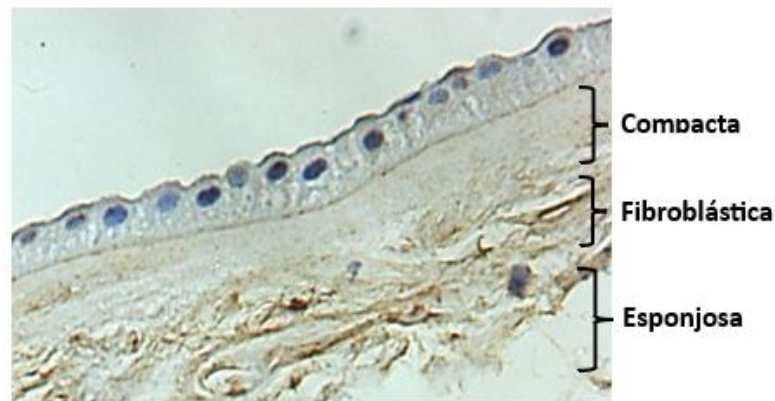
Figura 19 - Fotomicrografias da imunomarcção de Colágeno I da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e Grio ( i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.



Fonte: Autor

A imunomarcção de Colágeno I demonstrou que os feixes de fibras colágenas da camada mesenquimal da MA se distribuíram majoritariamente nas camadas fibroblástica e esponjosa, e em menor intensidade em porções da camada compacta, em todos os grupos experimentais analisados (Figura 20).

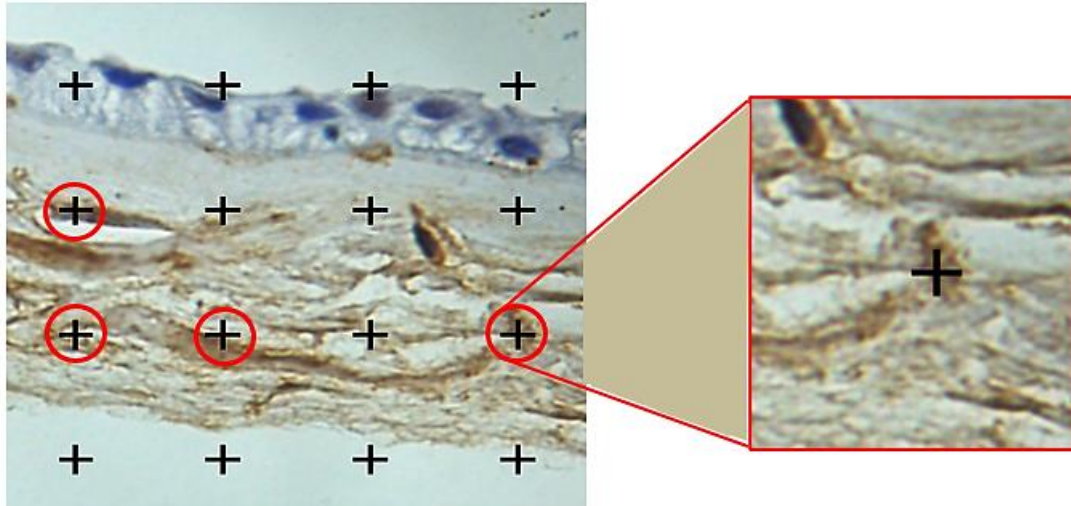
Figura 20 - Distribuição da imunomarcação de Colágeno I da MA.



Legenda: Aumento original de 40x.  
Fonte: Autor

Para a análise quantitativa da imunomarcação de Colágeno I, como critério de escolha da intensidade de imunomarcação a ser contabilizada, foi estabelecido um padrão global de coloração adotado para todas as imagens analisadas (Figura 21).

Figura 21 - Padrão global de coloração adotado para contagem da imunomarcação de Colágeno I.

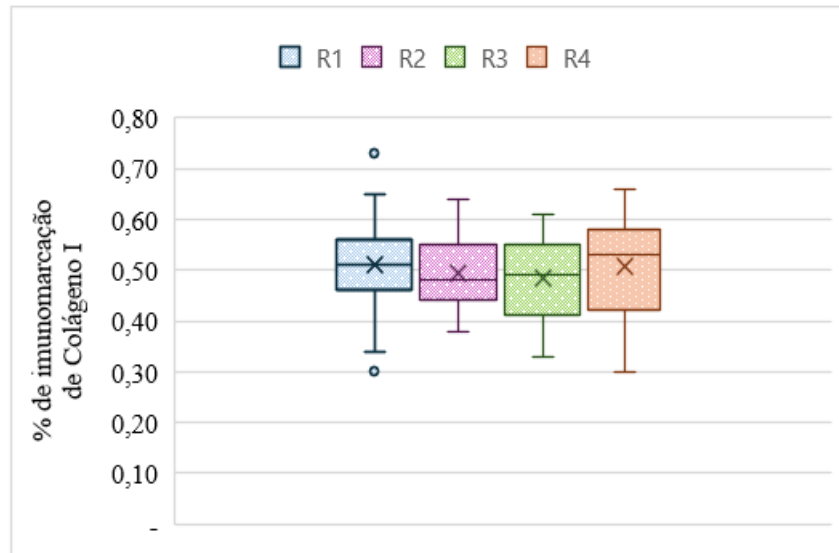


Fonte: Autor

A análise intragrupos avaliou o percentual de imunomarcação de Col.1 entre as diferentes sub-regiões da MA em ambas as placentas avaliadas. A partir das análises, foi possível observar um percentual médio de 51% de marcação em R1; 49% em R2; 48% em R3; e 50% em R4, sendo que as imunomarcações foram encontradas em feixes mais densos e expressivos na região PA (R1, R2, R3) e mais homogêneos em RA (R4). Os resultados foram analisados pelo teste de Variância paramétrica One-Way (ANOVA), resultando em  $p= 0,30 >$

0,05, não estatisticamente significativo (Figura 22), indicando que não houve diferença considerável entre as médias das marcações de Col.1 entre as quatro sub-regiões da MA.

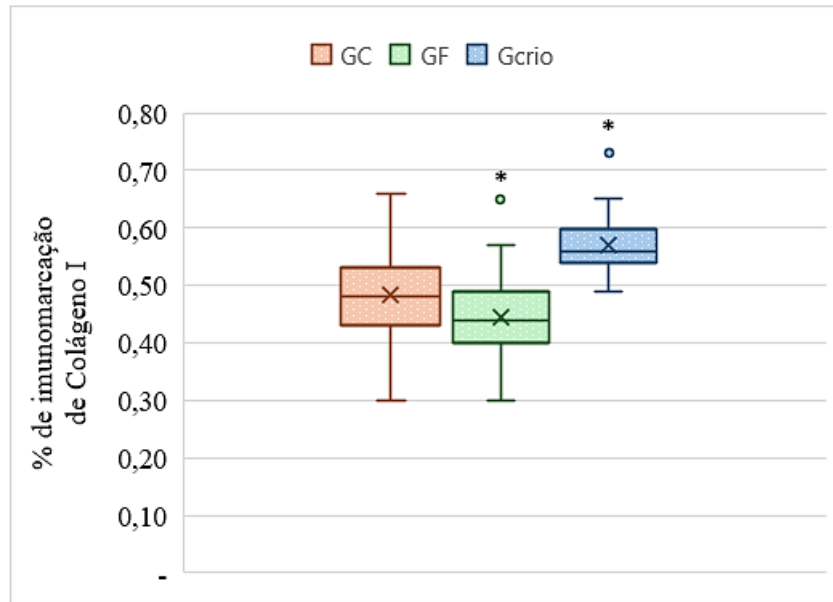
Figura 22 - Resultado do Teste ANOVA das sub-regiões R1, R2, R3 e R4 avaliados.



Legenda: Valor  $p = 0,30 > 0,05$ , não estatisticamente significativo.  
Fonte: Autor

Já a análise intergrupos avaliou o percentual de imunomarcção de Col.1 entre os grupos experimentais avaliados. A partir das análises, observou-se um percentual médio de 48% de marcação no GC; 44% no GF; e 57% no GCrio. Os resultados foram analisados pelo teste de Variância paramétrica One-Way (ANOVA), resultando em  $p = 6,66 \times 10^{-27} < 0,05$ , estatisticamente significativo (Figura 23), indicando que houve diferença considerável entre as médias das marcações entre os grupos analisados. Foi realizado teste de comparações múltiplas de Tukey, que evidenciou que a diferença significativa se encontrou entre as médias de GF e GCrio, ao nível 5% de significância.

Figura 23 – Resultado do Teste ANOVA dos grupos experimentais GC, GF e Gcrio avaliados.

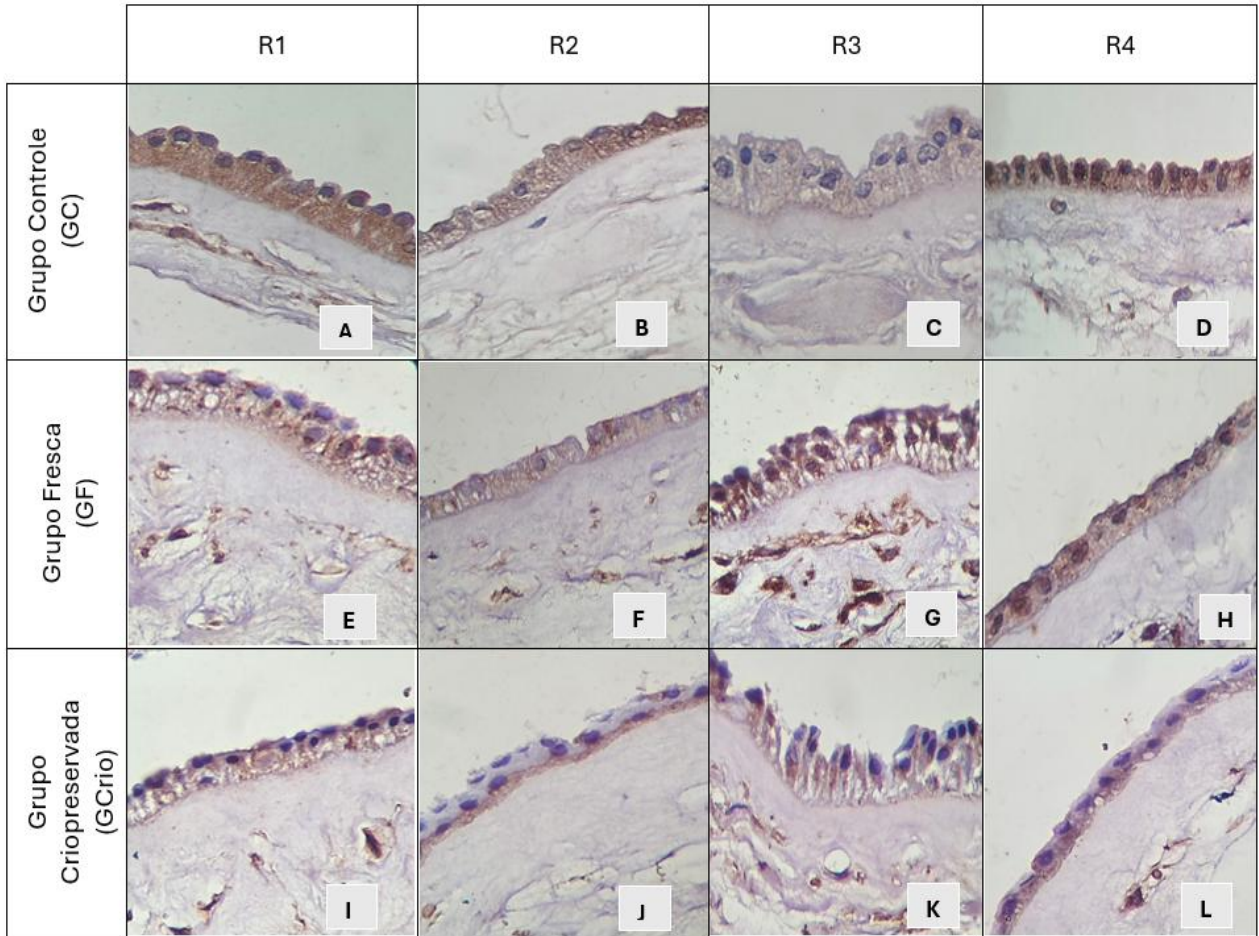


Legenda: Valor  $p^* = 6,66 \times 10^{-27} < 0,05$ , estatisticamente significativo (\*).  
Fonte: Autor

### 5.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA: LAMININA (LAM) – INTEGRIDADE DA MEMBRANA BASAL

A análise qualitativa da imunomarcagem de Laminina evidenciou uma marcação delicada de coloração acastanhada, distribuída como uma linha contínua abaixo do epitélio, bem como no interior do citoplasma celular, de forma homogênea, sem diferença entre as sub-regiões ou grupos experimentais (Figura 24). Em todo GC, e nas demais membranas do GF e Gcrio, houve presença da imunomarcagem no interior do citoplasma de algumas células, além da esperada marcação abaixo do epitélio, bem como foram observadas regiões pontuais de marcação próximas aos núcleos das células mesenquimais na camada fibroblástica.

Figura 24 - Fotomicrografias da imunomarcção de Laminina da MA. GC (a, b, c, d), GF (e, f, g, h) e Gcrio ( i, j, k, l) obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.



Fonte: Autor

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho a IHQ foi aplicada para descrever as diferenças na morfologia e composição da MA em suas sub-regiões, incluindo as regiões central, intermediária e periférica do âmnio placentário, e o âmnio refletido. Em seguida a IHQ 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 Imuno-histoquímica. Outros estudos foram realizados, considerando apenas os temas separados ou 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). Com esta pesquisa, foi possível, também, otimizar o método de imuno-histoquímica para o estudo da MA, bem como, foi padronizado um protocolo laboratorial eficiente, para as etapas de recuperação antigênica e bloqueio das peroxidases endógenas, acarretando em melhor imunomarcção.

A morfologia das camadas estruturais presentes na MA do GCrio foi eficientemente preservada, tendo em vista a arquitetura celular e os achados histológicos observados por meio da coloração HE, em comparação ao encontrado no GC. Especificamente, as células da camada epitelial presentes nas sub-regiões da PA mantiveram formato majoritariamente cuboide, sendo que as da sub-região central (R1) apresentaram formato com ápice arredondado e altura intermediária, enquanto que as da sub-região periférica (R3) eram colunares altas e com núcleos apicais. Já as células da sub-região intermediária (R2) apresentaram aspecto microscópico mais próximo ao de R3. Ainda nestas sub-regiões, R2 e R3, as células apresentaram contorno irregular com aspecto de estreitamento do corpo celular, tornando visível o espaço intercelular, porém mantendo a conexão entre as células. Este aspecto microscópico pode estar relacionado aos numerosos “gaps” e aos microvilos encontrados na borda lateral das células quando visualizadas na microscopia eletrônica de transmissão, os quais fazem parte da comunicação e transporte intra e transcelular no epitélio secretório da MA (Basile *et al.*, 2023). Por sua vez, as células da região RA (R4), apresentavam formato cuboidal baixo ou pavimentoso e núcleos centralizados. Estes

resultados encontrados em nosso estudo estão alinhados com os achados de Basile *et al.* (2023) e Al-Yahya e Makhlof (2013), que definiram o epitélio amniótico como morfológicamente heterogêneo. Ademais, Al-Yahya e Makhlof (2013) concluíram que a heterogeneidade da camada epitelial da MA está relacionada às suas múltiplas e especializadas funções. Em adição à sua função de proteção ou cobertura, o epitélio amniótico possui células tronco e células com grande atividade secretória. Basile *et al.* (2023) investigaram a ultraestrutura da camada epitelial da MA, verificando que as suas células diferem tanto no formato, quanto no conteúdo citoplasmático. Nas sub-regiões R1 e R4 as células são principalmente cuboidais, enquanto que em R2 as células apresentam formato em “cúpula” (dome shape), e em R3 as células são predominantemente colunares altas. Portanto, Com relação às diferenças morfológicas das sub-regiões na camada epitelial concluiu-se que a região central (R1) apresentou células epiteliais em formato de “cúpula”, com ápice arredondado, altura intermediária e núcleos centro-apicais. As regiões intermediária (R2) e periférica (R3), apresentaram células em formato cuboide e colunar, com alturas intermediárias a altas em maior parte de sua extensão, diferindo principalmente pela posição de seus núcleos no interior das células, centro-apicais em R2 e apicais em R3. Quanto a região do âmnio refletido (R4), evidenciou-se o padrão de células achatadas baixas, núcleos centralizados com citoplasma de eosinofilia homogênea, e ausência de vacuolizações encontradas nas demais sub-regiões.

Além da preservação da camada epitelial, o presente estudo também demonstrou que a criopreservação em DMEM e glicerol (1:1 v/v) preservou a membrana basal, assim como a camada mesenquimal, estando de acordo com os estudos experimentais de Fénelon *et al.* (2021), os quais demonstraram que a MA criopreservada se mantém com cinco camadas íntegras e semelhantes morfológicamente às encontradas nas MA frescas.

Em relação aos meios de preservação, o método MA fresca induziu diminuição na concentração de fibras colágenas, especialmente nas sub-regiões R2 e R3, e obteve percentual de marcação deste componente inferior aos demais métodos utilizados. Quanto a integridade da camada epitelial, todos os três protocolos abordados foram eficientes e mativeram a continuidade da camada, bem como sua morfologia e conformação das células epiteliais. Para a preservação de todos os componentes analisados neste estudo, de forma majoritária, o método que se mostrou mais consistente e equiparado aos resultados encontrados no tecido não preservado, GC, foi o protocolo de criopreservação.

Com relação à preservação das camadas estruturais da membrana, ainda existem opiniões diversas entre qual é o melhor crioprotetor: glicerol ou dimetilsulfóxido (DMSO). O glicerol tem a vantagem de ser antiviral, mas parece comprometer a viabilidade celular quando

utilizado sem o DMEM, por ser particularmente citotóxico às células da camada epitelial da MA. No presente trabalho, a arquitetura tecidual e celular foi mantida, porém algumas células apresentaram pequenos pontos brancos no citoplasma semelhantes ao que podem ser considerados vacúolos citoplasmáticos. Estudos relataram que este aspecto poderia relacionar-se ao processo de congelamento/descongelamento da criopreservação, gerando artefatos no interior do citoplasma celular, ou por processos degenerativos devido à exposição ao crioprotetor utilizado. Adicionalmente, foi relatado que a criopreservação induz a perda de viabilidade celular devido a alterações nas moléculas intracelulares causadas pela baixa temperatura, podendo interferir no seu uso clínico (Horvath *et al.*, 2023).

Entretanto, neste trabalho não foram visualizadas células em degeneração ou em apoptose, apenas pequenos “vacúolos”, que estavam no citoplasma de algumas células, tanto no grupo controle, quanto no grupo MA criopreservada, o que sugere um processo fisiológico do epitélio amniótico e não um dano causado pelo método da criopreservação. Assim também, Al-Yahya e Makhlouf (2013) demonstraram que o citoplasma das células epiteliais da MAH comumente se apresenta eosinófilico e vacuolizado. Ademais, em estudo prévio, Moraes *et al.*, (2021), relataram que a criopreservação utilizando DMEM/glicerol, embora tenha reduzido a viabilidade celular, tanto na região PA, quanto na RA, foi ideal para preservação da integridade estrutural da camada epitelial e, principalmente do conteúdo de proteínas solúveis presentes no estroma amniótico.

A matriz extracelular da MA, segundo Mcquilling *et al.*, (2019), é composta por fibras colágenas, fibras elásticas, glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas, e majoritariamente por GAGs carboxiladas, grupo que contém apenas o ácido hialurônico, ou hialuronana. Os resultados do presente estudo, obtidos a partir da coloração de Alcian Blue apresentaram-se semelhantes entre as diferentes sub-regiões da MA analisadas, apresentando distribuição relativamente homogênea no interior da MEC, e se mantiveram íntegras e preservadas no tecido após armazenamento à fresca e criopreservação, estando de acordo com os achados de Lopes *et al.*, (2008) e Departamento de Patologia, (c2024). As diferenças encontradas na camada mesenquimal entre as sub-regiões ocorre principalmente pela intensa atividade celular do âmnio placentário, observado a partir das maiores concentrações de células mesenquimais na camada fibroblástica em R1, R2 e R3, bem como na heterogeneidade das concentrações dos demais componentes da MEC. Em R4, pudemos observar morfologia mais homogênea, com poucas mudanças no padrão das concentrações dos componentes como GAGs e fibras de colágeno, devido à baixa atividade celular encontrada nesta sub-região.

Iranpour *et al.*, (2017) observaram uma maior concentração dos componentes da MEC,

tais como as GAGs e fibras colágeno e elásticas, são responsáveis por garantir maior resistência mecânica da MA. Estes achados condizem com os resultados encontrados em nosso estudo, onde a região do âmnio refletido (RA – R4), responsável por recobrir e sustentar o feto em desenvolvimento e sujeita a grande tensão mecânica, obteve maior percentual de marcação de GAGs pela coloração AB, em relação as demais sub-regiões. Por outro lado, Grémare *et al.*, (2019), estudando sobre as propriedades mecânicas da MA humana, por meio de testes de Força máxima antes da ruptura (Fmax), Deformação na falha (Smax) e Tensão máxima de tração (UTS), que para todas as MAs analisadas, a MA placentária (PA) foi significativamente mais forte que a MA periférica (RA), e também eram substancialmente mais extensíveis que seus equivalentes periféricos, demonstrando, com estes resultados, que a região de PA é um tecido isotrópico mais forte e mais extensível que a RA, cuja isotropia nem sempre é garantida.

A metodologia utilizada para as análises das imagens para quantificação dos componentes avaliados foi a análise estereológica, por meio do princípio de Cavalieri. Esta metodologia, segundo Amenábar *et al.*, (2003), quando bem indicada, é uma ferramenta que proporciona excelentes resultados. Sua utilização, quando respeitados os critérios para determinação do número de pontos amostrais para avaliação de estruturas e tecidos, permite a obtenção de dados passíveis de análise estatística segura, quando se planeja uma abordagem quantitativa de material de origem histológica. Com os padrões de calibração de escala das imagens e configuração das grades estimadas com os valores adequados de pontos de intersecção, os resultados obtidos a partir da análise estereológica se tornam altamente reproduzíveis, estando de acordo com Pierre *et al.* (2016), que afirmaram que a análise estereológica de cortes histológicos tem sido utilizada há várias décadas para obter estimativas da fração volumétrica de fases ou materiais em tecidos biológicos e meios inorgânicos com viés mínimo. A reprodutibilidade do método estereológico é superior ao desempenho relatado anteriormente de avaliação da esteatose hepática por histopatologistas e é um padrão de referência adequado para validação de métodos não invasivos de medição de tecidos biológicos. Portanto, desenvolveu-se, neste estudo, protocolo para análise de imagem eficiente para quantificação da MA, utilizando-se de princípios matemáticos bem fundamentados, para se contornar a problemática da falta de ferramentas digitais adequadas para mensuração automática da área ocupada pelo tecido multi-camadas da MA.

A análise da integridade da camada epitelial foi realizada a partir da quantificação dos filamentos intermediários que compõem o citoesqueleto das células epiteliais da MA, compostos por Citoqueratina. A partir da imuno-histoquímica, observou-se em todos os grupos

a presença de regiões pontuais com maior intensidade de marcação no interior do citoplasma, localizadas próximo ou ao redor dos núcleos, sendo estes achados normais, uma vez que os filamentos intermediários têm a função de ancorar o núcleo e outras organelas, principalmente os filamentos de citoqueratina, os quais entram na formação da lâmina nuclear, estando de acordo com os estudos de Kuburich *et al.* (2022), os quais afirmaram que a rede de filamentos intermediários de CK é necessária para a adesão célula-célula, resistência a estresses em nível celular e ancoragem nuclear durante processos de divisão celular. No presente trabalho, foi encontrada variação na intensidade da imunomarcação no interior do citoplasma de algumas células, mostrando-se com maior intensidade. Estes achados corroboram com o estudo de Regauer *et al.* (1985), que apontaram que a expressão dessas proteínas nas células epiteliais da MA ocorre de forma semelhante às encontradas nas células da derme na pele, estando presentes no citoplasma celular, garantindo a sustentação e rigidez do citoesqueleto, além de atuar como arcabouço, resistente, mas flexível, que permite às células epiteliais suportarem tensões mecânicas e não-mecânicas. Outro resultado obtido a partir de nosso estudo foi que a imunomarcação também variou levemente no interior do citoplasma celular de algumas células mostrando-se com menor intensidade. Este achado pode estar relacionado às regiões de vacuolização evidenciadas no citoplasma pela coloração HE, bem como, estar associado a fatores fisiológicos maternos, o que corrobora com os resultados obtidos a partir da análise quantitativa das imunomarcações, relacionados às sub-regiões da MA, onde a maior diferença de imunomarcação foi encontrada entre R1 e R4, os dois extremos da membrana, sendo estas as regiões mais e menos biologicamente ativas, respectivamente, o que pode indicar as vacuolizações como vesículas secretoras presentes no epitélio ativo das sub-regiões de PA, e sua ausência em RA. Ricci *et al.* (2013) também avaliaram a integridade da camada epitelial na MA fresca e criopreservada, e observaram que tanto na MA fresca como na criopreservada, os anticorpos anti-citoqueratina de amplo espectro (WSCK) marcaram a totalidade das células epiteliais, com apenas algumas células positivas detectadas na camada estromal, indicando que ambas as metodologias de preservação aplicadas se mostravam eficazes na preservação da integridade da camada epitelial.

A fim de avaliar a integridade da membrana basal, foi realizada a análise de Laminina, uma glicoproteína que tem como função ancorar as células epiteliais à matriz extracelular, sendo a principal estrutura não colágena dessa membrana. A partir da imuno-histoquímica, foi observada em todos os grupos experimentais a presença das imunomarcações como uma linha plana contínua abaixo da camada epitelial, estando de acordo com os achados de Niknejad *et al.*, (2011) e Lamon *et al.*, (2022), que atestaram a eficiência da criopreservação na manutenção

da integridade da membrana basal da MA.

Os resultados encontrados a partir da análise das fibras colágenas evidenciou que a distribuição dos feixes de colágeno I na camada mesenquimal da MA foi encontrada majoritariamente nas camadas fibroblástica e esponjosa, e em menor intensidade em porções da camada compacta. Estes resultados estão de acordo com os achados de Niknejad *et al.* (2011), que evidenciaram a presença de feixes colágeno tipo III e IV próximos à camada epitelial da MA, formando uma linha plana contínua ao longo da membrana basal e permeando a camada compacta, seguidos pelas camadas subsequentes formadas por feixes densos de colágeno I e delicadas fibras de colágeno III, tendo sido descritos como mais finos e interrompidos nos grupos MA criopreservada e liofilizada, em comparação ao grupo fresca. A presença de fibras e feixes colágeno tipo I, observada após os métodos de preservação utilizados em concentrações similares ao grupo controle, condizem com os resultados encontrados por Fénelon *et al.* (2019), que tanto com o protocolo de MA fresca (F-HAM) quanto de MA criopreservada (C-HAM), observaram que os componentes da matriz extracelular e as proteínas da membrana basal permaneceram inalteradas, atestando a eficácia de ambos os métodos. Em contraste com os resultados encontrados por este estudo, Moraes e colaboradores, em 2021, ao analisarem os efeitos dos métodos de preservação na composição das diferentes regiões da MA, observaram, por meio da coloração de Picrosirius Red, alta concentração de colágeno tipo I birrefringente ao longo da camada compacta da MA em ambas as regiões PA e RA. Esta divergência de achados referentes à camada compacta pode estar relacionada às interações bioquímicas existentes entre os reagentes utilizados, específicos para marcação de aminoácidos básicos encontrados na estrutura das fibras colágenas, e o tecido da região, bem como podem ter ligação com os sítios de ligação Ag-Ac encontrados na camada, específicos para os anticorpos utilizados para a imunohistoquímica em nosso estudo. A análise quantitativa das fibras de colágeno tipo I evidenciou concentrações estatisticamente distintas entre as imunomarcações dos grupos avaliados, em especial entre o GF e GCrio, que obtiveram médias com diferenças consideráveis, resultado este também encontrado por Moraes *et al.*, (2021), indicando a maior eficácia do protocolo de criopreservação sobre o de armazenamento à fresca, para preservação das fibras colágenas.

## CONCLUSÃO

Para a preservação de todos os componentes analisados neste estudo, o método que se mostrou mais consistente e equiparado aos resultados encontrados no tecido não preservado, Grupo Controle, foi o protocolo de criopreservação.

Desta forma, o método de criopreservação da MA em DMEM/glicerol 1:1 (v/v), armazenado a -80°C por 30 dias, foi adequado para preservar a integridade morfológica da MA em todas as suas sub-regiões, mantendo constante a concentração dos componentes da MEC tanto nas sub-regiões PA quanto RA da MA humana, indicando a viabilidade deste método na preservação deste biomaterial para uso em medicina regenerativa.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR *et al.* Amniotic membrane: Alternative transplantation therapy. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. e52111226279, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i12.26279.
- AMENÁBAR, J. M. *et al.* Uso da Estereologia como Metodo na Pesquisa Histologica. **Revista da faculdade de odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 44, n.1, p. 62 -65, 2003.
- AMORIM, F. C. M. *et al.* Amniotic membrane applied to burns healing: Pre-clinical study. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 38110414286, 15 abr. 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14286>. Acesso em: 26 maio 2025.
- 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.
- AVILLA-ROYO, E. *et al.* Comprehensive quantitative characterization of the human term amnion proteome. **Matrix Biology Plus**. v.12, p. 100084. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2021.100084>
- 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.
- BANERJEE, A. *et al.* Cellular and Site-Specific mitochondrial characterization of vital human amniotic membrane. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 1, p. 3-11, 2018.
- BASILE, M. *et al.* Mapping of the Human Amniotic Membrane: In Situ Detection of Microvesicles Secreted by Amniotic Epithelial Cells. **Cell Transplantation**, v.32, p.11-11, 2023.
- 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-year Amniotic Membrane Bank experience. **Cell Tissue Banking**, v. 17, n. 2, p. 261-268, 2016.
- 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.

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA, Faculdade de Medicina, Universidade Fereal do Rio de Janeiro (UFRJ). **Matriz Extracelular**. c2024. Disponível em: <http://patologia.medicina.ufrj.br/index.php/metodos-de-estudo/414-matriz-extracelular> Acesso em: 08 abr. 2024.

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.

ELKHENANY *et al.* Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. **Stem cell research & therapy**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02684-0>

FARHADIHOSSEINABADI, Behrouz; FARAHANI, Mehrdad; TAYEBI, Tahereh; JAFARI, Ameneh; BINIAZAN, Felor; MODARESIFAR, Khashayar; MORAVVEJ, Hamideh; BAHRAMI, Soheyl; REDL, Heinz; TAYEBI, Lobat; NIKNEJAD, Hassan. Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [s. l.], v. 46, n. sup2, p. 431–440, 5 nov. 2018. DOI [10.1080/21691401.2018.1458730](https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1458730). Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2018.1458730>. Acesso em: 26 maio 2025.

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.* Comparison of the impact of preservation methods on amniotic membrane properties for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v.104, p.109903, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109903>

FÉNELON, M. *et al.* Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. **Membranes**, v.11, n. 6, p. 387, 2021. <https://doi.org/10.3390/membranes11060387>

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. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 79, p. 71-80, 2020.

GARCÍA-LÓPEZ, G. *et al.* Pluripotency markers in tissue and cultivated cells *in vitro* of different regions of human amniotic epithelium. **Experimental Cell Research**. v.375, p.31-41, 2019.

GINDRAUX, Florelle; HOFMANN, Nicola; AGUDO-BARRIUSO, Marta;

ANTICA, Mariastefania; COUTO, Pedro Silva; DUBUS, Marie; FOROSTYAK, Serhiy; GIRANDON, Lenart; GRAMIGNOLI, Roberto; JURGA, Marcin; LIARTE, Sergio; NAVAKAUSKIENE, Ruta; SHABLII, Volodymyr; LAFARGE, Xavier; NICOLÁS, Francisco J. Perinatal derivatives application: Identifying possibilities for clinical use. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, p. 977590, 11 out. 2022. DOI 10.3389/fbioe.2022.977590. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.977590/full>. Acesso em: 26 maio 2025.

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.

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.

HORVATH, V. *et al.* Inter-placental variability is not a major factor affecting the healing efficiency of amniotic membrane when used for treating chronic non-healing wounds. **Cell Tissue Bank**, V.24, p.779-788, 2023.

HU, Z. *et al.* Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Today Bio**, v. 22, p. 100790, 2023.

IRANPOUR, J. *et al.* Supportive properties of basement membrane layer of human amniotic membrane enable development of tissue engineering applications. **Cell and tissue banking**, v. 19, p. 357-371, 2018.

IRAVANI, K. *et al.* Effect of amniotic membrane/collagen scaffolds on laryngeal cartilage repair. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v. 9, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.1002/lio2.1222>

JAFARI, A. *et al.* Comparison of the effects of preservation methods on structural, biological, and mechanical properties of the human amniotic membrane for medical applications. **Cell Tissue Bank**. v.25, p.305–323, 2024.

JAHANAFROOZ, Zohreh *et al.* Human amniotic membrane as a multifunctional biomaterial: recent advances and applications. **Journal of biomaterials applications**, v. 37, n. 8, p. 1341-1354, 2023.

KIM, Jae Chan; TSENG, Scheffer C. G. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. **Korean Journal of Ophthalmology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 32, 1995. DOI [10.3341/kjo.1995.9.1.32](https://doi.org/10.3341/kjo.1995.9.1.32). Disponível em: <http://ekjo.org/journal/view.php?doi=10.3341/kjo.1995.9.1.32>. Acesso em: 26 maio 2025.

KOPACZKA, K. *et al.* The relationship between amniotic epithelial cells and their microenvironment. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.10.004>.

- KUBURICH, N. A. *et al.* Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. **Seminars in Cancer Biology**, v. 86, p. 816-826, 2022.
- LAMON, M. *et al.* Cryopreservation of human amniotic membrane for ocular surface reconstruction: a comparison between protocols. **Cell Tissue Bank**, v.23, p.851–861, 2022.
- LEE, S. H.; TSENG, S. C. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **American journal of ophthalmology**, v. 123, n. 3, p. 303-312, 1997.
- LEAL-MARIN, S. *et al.* Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, p. 8, p. 1198-1215, 2020. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34782>.
- 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.
- 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. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190220>
- MCQUILLING, J. P. *et al.* Characterization of dehydrated amnion chorion membranes and evaluation of fibroblast and keratinocyte responses in vitro. **International Wound Journal**, v. 16, n. 3, p. 827-840, 2019 <https://doi.org/10.1111/iwj.13103>.
- MOHAMMAD-POUR, N. *et al.* Comparing the Effects of Two Cryoprotectant Protocols, Dimethyl-Sulfoxide (DMSO) and Glycerol, on the Recovery Rate of Cultured Keratinocytes on Amniotic Membrane. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, 2023. <https://doi.org/10.1177/15347346231155751>
- MORAES, Jéssica Tereza Guedes De Oliveira; COSTA, Maíra Maftoum; ALVES, Paula Cristina Santos; SANT'ANNA, Luciana Barros. Effects of Preservation Methods in the Composition of the Placental and Reflected Regions of the Human Amniotic Membrane. **Cells Tissues Organs**, [s. l.], v. 210, n. 1, p. 66–76, 2021. DOI [10.1159/000515448](https://doi.org/10.1159/000515448). Disponível em: <https://karger.com/article/doi/10.1159/000515448>. Acesso em: 26 maio 2025.
- 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, 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.

- PIERRE, T. G. S. *et al.* Stereological Analysis of Liver Biopsy Histology Sections as a Reference Standard for Validating Non-Invasive Liver Fat Fraction Measurements by MRI. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160789, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160789>.
- PRAKASH, S.; KALRA, P.; DHAL, A. Flexor tendon repair with amniotic membrane. **International Orthopaedics**, v. 44, n. 10, p. 2037-2045, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00264-020-04752-1>
- PUYANA, S. *et al.* Using Dehydrated Amniotic Membrane Skin Substitute in Facial Burns: Is There a Outcome Difference Between Adult and Pediatric Patients? **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 31, n. 2, p. e145-e147, 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, p. 554530, 2020.
- REGAUER, S.; FRANKE, W. W.; VIRTANEN, I. Intermediate filament cytoskeleton of amnion epithelium and cultured amnion epithelial cells: expression of epidermal cytokeratins in cells of a simple epithelium. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 100, n. 4, p. 997–1009, 1 abr. 1985. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/100/4/997/807/Intermediate-filament-cytoskeleton-of-amnion>. Acesso em: 26 maio 2025.
- 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.
- RUIZ-CAÑADA, C. *et al.* Chronic Wound Healing by Amniotic Membrane: TGF- $\beta$  and EGF Signaling Modulation in Re-epithelialization. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 689328, 2021.
- 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 *et al.* Perinatal derivatives: where do we stand? A roadmap of the human placenta and consensus for tissue and cell nomenclature. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 610544, 2020.
- SVOBODOVA, Alzbeta; HORVATH, Vojtech; BALOGH, Lukas; ZEMLICKOVA, Martina; FIALA, Radovan; BURKERT, Jan; BRABEC, Marek; STADLER, Petr; LINDNER, Jaroslav; BEDNAR, Jan; JIRSOVA, Katerina. Outcome of Application of Cryopreserved Amniotic Membrane Grafts in the Treatment of Chronic Nonhealing Wounds of Different Origins in Polymorbid Patients: A Prospective Multicenter Study. **Bioengineering**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 900, 29 jul. 2023. DOI 10.3390/bioengineering10080900. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5354/10/8/900>. Acesso em: 26 maio 2025.
- SWIM *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.

VARGHESE, F. *et al.* IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. e96801, 6 maio 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0096801>. Acesso em: 26 maio 2025.

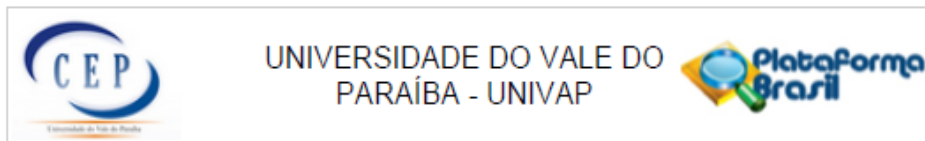
VON VERSEN-HÖYNCK, Frauke; SYRING, C.; BACHMANN, S.; MÖLLER, D.E. The Influence of Different Preservation and Sterilisation Steps on the Histological Properties of Amnion Allografts – Light and Scanning Electron Microscopic Studies. **Cell and Tissue Banking**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 45–56, 2004. DOI [10.1023/B:CATB.0000022276.47180.96](https://doi.org/10.1023/B:CATB.0000022276.47180.96). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1023/B:CATB.0000022276.47180.96>. Acesso em: 26 maio 2025.

WASSMER, C.-H.; BERISHVILI, E. Immunomodulatory Properties of Amniotic Membrane Derivatives and Their Potential in Regenerative Medicine. **Current Diabetes Reports**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 31, ago. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11892-020-01316-w>. Acesso em: 26 maio 2025.

WAGNER, M. *et al.* Cryopreservation of amniotic membrane with and without glycerol additive. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, 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, p. 613804, 2021.

## 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 IMUNO-

**Pesquisador:** João Vitor Alcântara da Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 75337323.0.0000.5503

**Instituição Proponente:** Fundação Valeparaibana de Ensino

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

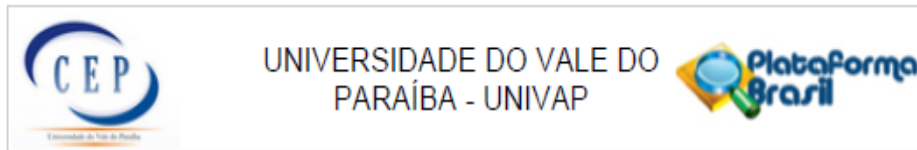
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.537.068

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa de estudo, quantitativa, básica, explicativa e experimental. A amostra consistirá em 7 placentas humanas, as quais serão utilizadas para obtenção da membrana amniótica humana (MAH), a qual será processada e fragmentada em dimensões adequadas relacionadas aos métodos de conservação fresca e criopreservada. Para a imunohistoquímica, 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 (1x1cm<sup>2</sup>). 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 fixados imediatamente em formalina para a análise de imunohistoquímica; Grupo Fresca: os fragmentos de membrana após serem processados, serão imersos em meio DMEM a temperatura ambiente (24°C) por 18h. Em seguida, estes serão fixados imediatamente em formalina para a análise de imunohistoquímica; 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 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), e o grupo MA criopreservada foi armazenado em DMEM e

**Endereço:** Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13  
**Bairro:** Urbanova **CEP:** 12.244-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS  
**Telefone:** (12)3947-1111 **E-mail:** cep@univap.br



Continuação do Parecer: 6.537.068

glicerol 1:1 (v/v) a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 30 dias. Após esse período, os fragmentos serão descongelados em temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos deste grupo então serão fixados imediatamente em formalina para a análise de imuno-histoquímica.

As informações elencadas nos campos apresentação do projeto, objetivo de pesquisa e avaliação dos riscos e benefícios foram retiradas do arquivo Informações Básicas do Projeto (formulário online da Plataforma Brasil).

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a integridade estrutural e química da MA nas suas diferentes regiões anatômicas, PA e RA, e em seus lados epitelial e mesenquimal, após diferentes métodos de preservação, por meio da técnica de imuno-histoquímica.

**Objetivo Secundário:**

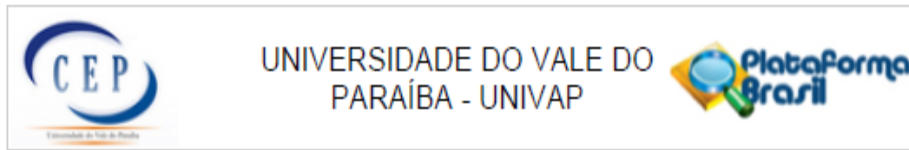
Avaliar, por imuno-histoquímica, a expressão e distribuição dos colágenos tipos I e III, e da proteína laminina entre as camadas do estroma da MA, e as citoqueratinas, as quais são proteínas específicas da camada epitelial da membrana. Também serão avaliados peptídeos antimicrobianos, incluindo a elafina e as -defensinas. Esta avaliação ocorrerá na região PA, nas suas diferentes porções (central, intermediária e periférica), e na região RA: 1) imediatamente após seu processamento, sem nenhum método de preservação; 2) após preservação em meio DMEM e armazenamento à temperatura ambiente por 18h; e 3) após preservação em meio DMEM/glicerol 1:1 (v/v) e armazenamento à  $-80^{\circ}\text{C}$  por um período de 30 dias.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A colheita da placenta é um procedimento seguro. 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, pela abordagem da gestante em um momento delicado 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.

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13  
 Bairro: Urbanova CEP: 12.244-000  
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS  
 Telefone: (12)3947-1111 E-mail: cep@univap.br



Continuação do Parecer: 6.537.068

**Benefícios:**

Esperamos com esta pesquisa, a caracterização da morfologia de cada região da membrana, uma vez que ela possui uma grande área e principalmente se o método usado para seu armazenamento e preservação mantem 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. Assim, será ampliado o conhecimento do uso da membrana amniótica como biomaterial, a fim de fundamentar o uso deste em terapias regenerativas e transplantes, de forma menos onerosa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

No desfecho primário, espera-se otimizar a técnica de Imunohistoquímica para o estudo da MA; Espera-se que a integridade da MA, nas suas diferentes regiões anatômicas, seja diferente dentre os diferentes métodos de preservação; Espera-se que sejam categorizados os melhores métodos para preservar a integridade estrutural e química da MA, nas suas diferentes regiões e para diferentes objetivos do uso da membrana amniótica.

Na hipótese, este trabalho considera que a análise da membrana amniótica por imunohistoquímica permitirá descrever as diferenças em sua composição nas 4 regiões anatômicas, considerando os métodos de preservação fresca e criopreservada. Os resultados da análise morfológica poderão auxiliar na criação de um padrão de uso da membrana, redirecionando cada região adequada ao uso proposto.

Ver item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Ver item Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Em parecer anterior, este CEP requereu ajustes no TCLE e no formulário online da PB, agora atendidos. No TCLE, a paginação do foi refeita e foi indicada a sala 13 como a sala do CEP-Univap; as informações do cronograma foram uniformizadas entre os arquivos submetidos na PB; no formulário online foi indicado a retenção de amostras (biorrepositório de placenta). Este CEP considera o projeto de pesquisa aprovado.

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13  
 Bairro: Urbanova CEP: 12.244-000  
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS  
 Telefone: (12)3947-1111 E-mail: cep@univap.br



UNIVERSIDADE DO VALE DO  
PARAÍBA - UNIVAP



Continuação do Parecer: 6.537.068

**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".  
VER MODELOS DISPONÍVEIS NO SITE DO CEP-UNIVAP.

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.

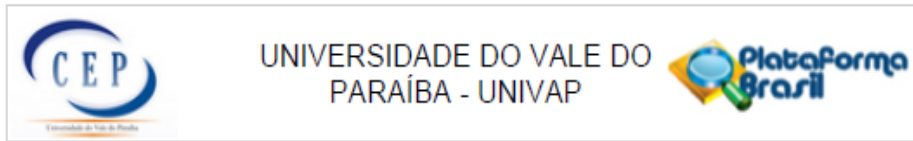
CEP-Univap - (12) 3947-1111

[www.univap.br/cep](http://www.univap.br/cep)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2235770.pdf	21/11/2023 15:31:00		Aceito
Outros	TermoConfidencialidadeEquipe_projetoJoao.pdf	21/11/2023 15:29:41	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito
Outros	TermoAutorizacao_hospital.pdf	21/11/2023 15:27:06	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito
Outros	termoEquipeEnfermeiras_ProjetoJoao.pdf	21/11/2023 15:24:15	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_JoaoVitor_Respondido.docx	21/11/2023 15:18:50	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP.pdf	17/11/2023 14:05:41	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoBrochura_Joao_Respondido.docx	17/11/2023 14:03:42	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13  
 Bairro: Urbanova CEP: 12.244-000  
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS  
 Telefone: (12)3947-1111 E-mail: [cep@univap.br](mailto:cep@univap.br)



Continuação do Parecer: 6.537.068

Investigador	ProjetoBrochura_Joao_Respondido.doc x	17/11/2023 14:03:42	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_Assinada.pdf	25/10/2023 17:48:29	João Vitor Alcântara da Costa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Novembro de 2023

---

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

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13  
 Bairro: Urbanova CEP: 12.244-000  
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS  
 Telefone: (12)3047-1111 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 imuno-histoquímica.

**Pesquisador Responsável:** João Vitor Alcântara da Costa (CPF: 364.950.638-65 / e-mail: joaovalcosta@gmail.com)

**Equipe Executora:** João Vitor Alcântara da Costa (CPF: 364.950.638-65 / e-mail: joaovalcosta@gmail.com); Gabriela Antonia Tje Calheiro (CPF: 418.130.928-26 e e-mail: gabriela.atie@hotmail.com), Elisa Polifke Trindade (CPF: 45685772840 e e-mail: elisapolifke@yahoo.com; 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: (12) 98133-1709 / (12) 3947-1169;

Nome do participante: \_\_\_\_\_ R.G.: \_\_\_\_\_  
Idade: \_\_\_\_ anos CÓDIGO: \_\_\_\_\_

A Sr.<sup>a</sup> 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 IMUNO-HISTOQUÍMICA”, de responsabilidade do pesquisador João Vitor Alcântara da Costa. O objetivo deste estudo será avaliar a integridade estrutural e química 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 técnica de imuno-histoquímica. 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. Assim, será ampliado o conhecimento do uso da membrana amniótica como biomaterial, a fim de fundamentar o uso deste em terapias regenerativas e transplantes, de forma menos onerosa.

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.

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 Sr.<sup>a</sup> também está sendo convidada a autorizar o acesso à sua carteirinha pré-natal para verificar se nela estão marcados os exames sorológicos de rotina e a idade gestacional. Somete após que a sua placenta será colhida.

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 autorização para o acesso e 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 o pesquisador responsável ou equipe executora pelo telefone (12) 99634-1605 e e-mail joaovalcosta@gmail.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 – Bloco11 – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento II, sala 13, 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



### ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENO DA MATRIZ EXTRACELULAR DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA: ESTUDO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

João V. A. Costa, Elisa Polifke Trindade, Luciana B. Sant'Anna.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, joaovcosta@gmail.com; elisapolifke@yahoo.com; lucianabsa@gmail.com

**Introdução.** A membrana amniótica humana (MAH) vem sendo utilizada como biomaterial na medicina regenerativa devido às suas propriedades biomecânicas. Um dos componentes mais expressivos na matriz extracelular (MEC), o colágeno, tem sido amplamente utilizado na clínica médica. **Objetivos.** Quantificar a concentração de fibras colágenas presentes na MEC, comparando-a entre as sub-regiões da MAH, a fim de evidenciar a distribuição dessas fibras e embasar o melhor uso de cada região de acordo com a necessidade clínica. **Metodologia.** Após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (nº 6.537.068), foram obtidas as amostras de duas placentas. A MAH foi fragmentada em Âmnio Placentário (R1) e Âmnio Refletido (R4) e armazenadas em formol para processamento histológico. Foi realizada a análise histomorfométrica quantitativa de 02 fragmentos por placenta, por meio de 30 campos/fragmento. A média percentual de 60 campos histológicos foi usada para gerar um único valor para cada sub-região/placenta, para marcação de Colágeno tipo I por Imuno-histoquímica. **Resultados.** A análise demonstrou imunomarcagem de colágeno em ambas as regiões (R1 e R4), majoritariamente na MEC das camadas fibroblástica e esponjosa, com feixes mais densos e expressivos na região R1 e mais homogêneos em R4. A análise histomorfométrica evidenciou um percentual de imunomarcagem de 53% em R4, e 45% em R1. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico t Student, resultando em  $p = 0,0000000409 < 0,05$ , estatisticamente significativo. **Conclusão.** Os resultados apontaram uma concentração de colágeno maior em R4, em comparação à R1, o que indica o âmnio refletido como uma melhor fonte deste componente para o uso clínico.

**Palavras-chave:** Matriz extracelular; membrana amniótica; fibras colágenas

**Área de Concentração:** Biomateriais e Materiais Biocompatíveis.