

O USO DA MEMBRANA AMNIÓTICA DESCELULARIZADA COMO SCAFFOLD PARA MEDICINA REGENERATIVA: REVISÃO DE LITERATURA

Gabriela Antonia Tie Calheiro, Isabelle Faria, Thays Fernandes Rezende, Maria Laura Ramos Mancilha, Luciana Barros 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, gabriela.atie@hotmail.com, f.isabellefaria@gmail.com, thaysrezende41@gmail.com, mlauramancilha@gmail.com, lucianabsa@gmail.com.

Resumo

A membrana amniótica descelularizada (MAH-D) é utilizada a fim de eliminar a imunogenicidade das células e melhorar a biocompatibilidade in vivo. O presente trabalho teve como objetivo identificar as principais aplicações da MAH-D na medicina regenerativa até então descritas na literatura. Dentre as aplicações da MAH-D destacam-se a oftalmologia, diferenciação osteogênica e regeneração óssea, regeneração periodontal, queimaduras e tecidos moles, adesão intrauterina e fibrose endometrial, regeneração de tendões, enxertos para fechamento de fístulas faringocutâneas pós-laringectomia, como substituta de tecido pericárdio, e como enxerto vascular. Sendo assim, foi possível definir que a MAH-D é utilizada de forma ampla como *scaffold* na medicina regenerativa. O seu uso é bem estabelecido na oftalmologia, porém vem se expandindo e ganhando destaque para as demais aplicações uma vez que se trata de um *scaffold* biocompatível muito associado a células-tronco semeadas em sua superfície, o que permite o desenvolvimento de enxertos alógenos e autólogos.

Palavras-chave: Membrana Amniótica. Matriz Extracelular Descelularizada. Medicina Regenerativa. Scaffold. Curativos Biológicos.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Introdução

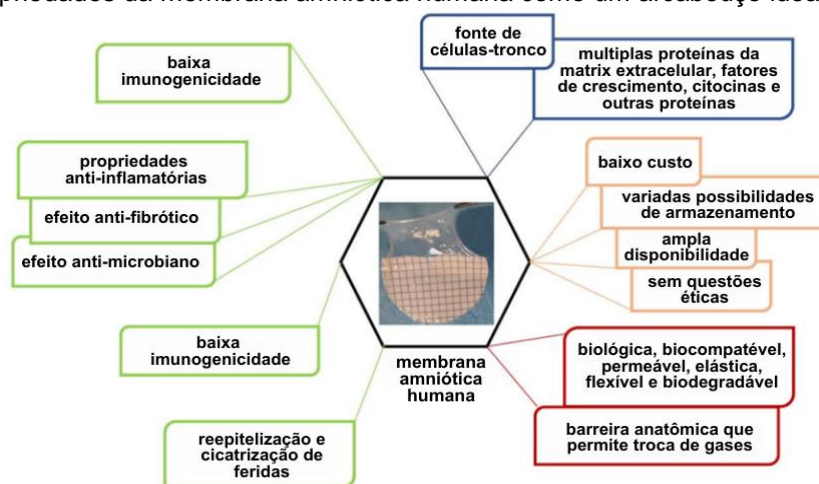
A medicina regenerativa (MR) é o ramo das ciências médicas que lida com a restauração funcional de tecidos e/ou órgãos específicos de pacientes que sofrem de traumas, doenças crônicas cujo o próprio corpo não produz respostas regenerativas suficientes para o combate, defeitos congênitos e condições associados a senescência (Mahla, 2016). A engenharia tecidual ou engenharia de tecidos (ET) é um ramo da MR. O termo foi utilizado pela primeira vez por Langer e Vacanti em 1993, sendo considerado um conceito relativamente novo, cujo foco principal é a regeneração de neotecidos por ferramentas biológicas como os biomateriais e fatores de crescimento. Seu surgimento como meio terapêutico para tratar condições médicas desafiadoras vem da combinação de ramos das ciências biológicas como a biologia celular, ciência dos materiais, química, biologia molecular, engenharia e medicina (Sharma *et al.*, 2019). Embora o transplante de tecido seja uma estratégia para restauração funcional de órgãos, há limitações e desafios associados a sua aplicabilidade como: rejeição imunológica, escassez de doadores adequados e a potencial transmissão de doenças (Xu *et al.*, 2024).

Sendo assim, novas abordagens terapêuticas e estratégias vem sendo desenvolvidas para suprir os desafios da MR e ET. Para isso, o desenvolvimento de biomateriais é cada vez mais constante. Os biomateriais atuam como substitutos biológicos ou reparadores teciduais capazes de fornecer suporte estrutural para o crescimento de células, regular o comportamento celular e imitar as propriedades físicas e bioquímicas do tecido natural (Rai *et al.*, 2017). Os *scaffolds* são biomateriais de composição variável (poliméricos sintéticos ou orgânicos, tecidos nativos ou biomateriais híbridos) confeccionados ou processados para simular o microambiente e microestrutura tecidual, com necessidade de suprir a função regenerativa do tecido no órgão a ser implantado, além de simular a reorganização característica da matriz extracelular (MEC) natural (Xu *et al.*, 2024).

A membrana amniótica humana (MAH) é um biomaterial provindo da placenta humana considerado resíduo cirúrgico após o parto. É um tecido biológico abundante, prontamente disponível, econômico e ético (Fénelon *et al.*, 2021). A MAH é pouco espessa (0,02 mm–0,05 mm), elástica e forma a camada

mais interna da placenta (Jirsova; Jones, 2017). Sua estrutura consiste em um epitélio simples, uma membrana basal espessa e um estroma avascular. Ela tem sido usada em uma variedade de procedimentos cirúrgicos como enxerto de pele, cirurgia reconstrutiva vaginal, porém sua principal aplicação tem sido na oftalmologia (Liang *et al.*, 2009). A MAH é conhecida por suas propriedades na regeneração de feridas e seu amplo potencial para a MR e ET (Figura 1). Desde a introdução do método de descelularização por Poel em 1948, o uso de *scaffolds* naturais advindos de tecidos nativos descelularizados para obtenção de MEC descelularizada se torna cada vez mais promissor na MR e ET.

Figura 1 - Propriedades da membrana amniótica humana como um arcabouço ideal para MR e ET.



Fonte: Fénelon *et al.*, 2021 (Adaptado).

Recentemente, foram feitas tentativas para modificar a MAH por vários métodos, incluindo a reticulação química e física, a fim de remover todos os componentes celulares e realizar a exposição da MEC, obtendo assim, a MAH em sua forma descelularizada (MAH-D) (Liang *et al.*, 2009). A MAH-D é utilizada com objetivo de eliminar a imunogenicidade proveniente de células epiteliais e estromais e para melhor biocompatibilidade *in vivo*. A MAH descelularizada/acelular é mais fina do que a nativa, porém há a manutenção da resistência à tração e de suas propriedades elásticas. (Jahanafrooz *et al.*, 2023). Visando isso, o presente trabalho teve como objetivo identificar as principais aplicações da membrana amniótica humana descelularizada na medicina regenerativa até então descritas na literatura.

Metodologia

O presente estudo se trata de uma revisão de literatura nas bases de dados PubMed, Elsevier, Scielo e Google Acadêmico, durante o período entre 2003 a 2024, considerando as palavras chaves: âmnio, membrana amniótica, matriz extracelular, medicina regenerativa, engenharia de tecido, *scaffolds* descelularizados, terapia regenerativa (TR). Foram considerados 16 estudos, tendo como critério de inclusão estudos experimentais que utilizaram da MAH-D como *scaffold*, não sendo consideradas as revisões de literatura e estudos que utilizaram a MAH-D associada a outros biomateriais.

Resultados

Os estudos encontrados abordam aplicações *in vitro/ex vivo* ou *in vivo* (pré-clínicas e clínicas) dentre as aplicações da MAH-D podemos citar seu uso como substrato para a expansão de células epiteliais límbicas para aplicação na oftalmologia (Sangwan *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Shortt *et al.*, 2009), na diferenciação osteogênica e regeneração óssea (Chen *et al.*, 2012; Akazawa *et al.*, 2016; Akhlaghi *et al.*, 2019), regeneração periodontal (Iwasaki *et al.*, 2014), em queimaduras e tecidos moles (Gholipourmalekabadi *et al.*, 2016), em casos de adesão intrauterina e

fibrose endometrial (Chen *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021), regeneração de tendões (Mao *et al.*, 2023), enxertos para fechamento de fístulas faringocutâneas pós-laringectomia (Kakabadze *et al.*, 2016), como substituto de tecido pericárdio (Francisco *et al.*, 2016), e por fim, como enxerto vascular (Amensag *et al.*, 2012; Amensag; McFetridge, 2012; Swim *et al.*, 2018).

Discussão

A aplicação da MAH-D como substrato para a expansão ex vivo de células epiteliais límbicas (LECs) para tratamento de deficiências da córnea em humanos foi descrita pela primeira vez por Schwab em 1999, sendo essa, a primeira aplicação para a MAH em sua forma descelularizada. Desde então, o uso para tal finalidade vem se aprimorando, tendo como enfoque o estudo dos métodos preparo, preservação e sua aplicação em diferentes patologias da córnea (Sangwan *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Shortt *et al.*, 2009).

Os efeitos da MAH-D na diferenciação osteogênica e na sinalização ERK1/2 em células da papila apical dentária (APCs) humana foram relatados por Chen *et al.* (2011). A avaliação da diferenciação osteogênica das APCs quando cultivadas na MEC da MAH-D indicou que o *scaffold* demonstra potencial promissor na osteogênese, facilitando a diferenciação, modulando o ambiente, potencializando o efeito e indução de suplementos osteogênicos, além de induzir a ativação da via ERK1/2 – um dos efeitos da diferenciação e mineralização de APCs humana. Sendo assim, fornece potenciais aplicações ET ósseos e dentários. O uso da MAH-D na regeneração óssea se deu também no estudo de Akhalaghi *et al.* (2019), o qual associou a MAH-D a células-tronco derivadas da gordura bucal (BFSCs) semeadas em sua superfície para avaliação clínica do potencial osteogênico no aumento de maxilares com deficiências extensas de 9 pacientes. Após o enxerto da MAH-D associada as BFSCs, foi verificada a cicatrização óssea bem sucedida, sem evidências de inflamação, deiscência, formação de abscesso ou reação de corpo estranho nos indivíduos, comprovando a sua eficácia.

A MAH-D ao ser utilizada juntamente a células-tronco mesenquimais de ligamentos periodontais (PDLSC) e osteoblastos, permitiu a transferência de células em bicamadas sobrepostas sobre sua superfície. O *scaffold* possibilitou a preservação da topologia celular e a manutenção da estabilidade mesmo após deformações (dobramento e corte), além de melhorar a formação óssea quando comparado ao transplante de PDLSC isoladas, evidenciando seu potencial terapêutico para aplicação em defeitos ósseos (Akazawa *et al.*, 2016). O uso de um *scaffold* de mesma composição (PDLSC e MAH-D) por Iwasaki *et al.* (2014) demonstrou potencial na terapia periodontal regenerativa baseada em células quando aplicada em um modelo de defeitos periodontais criados cirurgicamente em molares maxilares de ratos. O enxerto de PDLSC/MAH-D provou ser um método eficaz para transferência de células com aumento na formação de tecidos periodontais in vivo.

Ao ser avaliado o potencial da MAH-D associada a células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hADSC) como um suporte viável para proliferação e entrega de células-tronco para terapia celular na regeneração de queimaduras e ET moles, concluiu-se que a MAH-D possui propriedades de fixação favoráveis para as hADSC, com ausência de atividade citotóxica e pode ser considerada uma escolha promissora na regeneração de queimaduras na clínica e um potencial transportador de hADSC para aplicações na ET moles (Gholipourmalekabadi *et al.*, 2016).

A aplicação da MAH-D liofilizada para prevenção da adesão intrauterina (AIU) demonstrou que o transplante da MAH-D previne o desenvolvimento de AIU pela supressão do fator de crescimento transformador $\beta 1$ e aumento da produção de metaloproteinase de matriz-9 em modelo animal (rato) (Chen *et al.*, 2019). A avaliação do efeito da MAH-D liofilizada contra a AIU também foi realizada por Chen *et al.* em 2021, utilizando-se um modelo de AIU em 12 ratos Sprague Dawley. Os resultados obtidos indicaram que o transplante da MAH-D preveniu a fibrose endometrial pela supressão do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), regulou positivamente a expressão de metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2), facilitou a degradação da MEC e inibiu o desenvolvimento de fibrose no modelo utilizado. Porém, não houveram evidências de regeneração do epitélio endometrial e restauração da cavidade uterina. Sendo assim, a MAH-D demonstrou um potencial de prevenir a formação de fibrose e pode se apresentar como uma estratégia alternativa para o gerenciamento da AIU.

A avaliação do comportamento de tenócitos humanos (células residentes no tecido de tendões) semeados na superfície da MAH-D dispostas em três camadas ou em uma única camada demonstrou que o *scaffold* triplo não alterou a atividade biológica dos tenócitos in vitro, e ambas as estruturas suportaram similarmente sua função celular. O crescimento e migração celular dos tenócitos foi

significativamente maior, ao mesmo tempo foi verificada a atenuação da desdiferenciação dos tenócitos e a resposta inflamatória quando semeado sobre a MAH-D em comparação a cultura de tenócitos isolada, demonstrando assim, o potencial da MAH-D como *scaffold* para reconstrução de tendões independentemente da quantidade de camadas utilizadas (Mao *et al.*, 2023).

O uso das membranas amnióticas (ânio/cório) descelularizadas e liofilizadas para enxerto em fístulas faringocutâneas (FFC) pós laringectomia foi avaliado clinicamente em 8 pacientes com carcinoma espinocelular de laringe, após realização de quimioterapia pré-operatória, radioterapia e laringectomia total ou estendida. As fístulas foram reconstruídas por enxertos de membrana ânio/cório descelularizada e a cicatrização completa foi relatada após um tempo médio de 18 dias. O uso dos enxertos da membrana ânio/cório ofereceu vantagens em relação a outros métodos de tratamento da FFC pelo seu caráter não invasivo, por prevenir a morbidade do doador e apresentar eficácia no fechamento da fístula sem intervenção cirúrgica adicional (Kakabadze *et al.*, 2016).

O potencial da MAH-D como *scaffold* acelular para reparo de tecido do pericárdio foi avaliado com o objetivo de obter uma matriz adequada, econômica e ética. O uso da MAH-D enxertada após excisão do pericárdio de 10 ratos Wistar provou que o *scaffold* se trata de um substituto ideal para o pericárdio, podendo ser útil para melhorar o desenvolvimento de terapias regenerativas, pois é bem incorporado pelo tecido devido à sua baixa imunogenicidade e sua capacidade de diminuir a ocorrência de aderências e cicatrizes, aumentando a espessura do pericárdio (Francisco *et al.*, 2016).

Tendo em vista que a doença cardiovascular aterosclerótica é uma das principais causas de mortalidade no mundo, a cirurgia de revascularização arterial representa uma importante intervenção terapêutica (Amensag *et al.*, 2017) e a disponibilidade limitada de vasos de transplante autólogos adequados para cirurgias de by-pass coronário e periférico é um problema clínico significativo (Amensag; McFetridge, 2012), a ET por automontagem para construção vascular, utilizada com sucesso em procedimentos não urgentes inspirou o uso da MAH-D como um biomaterial para enxerto vascular. O uso de um *scaffold* de MAH-D fabricado por rolamento multilaminado para gerar uma construção tubular para regeneração de vasos sanguíneos foi proposto por Amensag e McFetridge em 2012. A biocompatibilidade e potencial inicial de adesão do biomaterial foi testada utilizando-se células endoteliais da veia umbilical humana e células musculares lisas vasculares humanas. Os resultados mostraram adesão positiva das células endoteliais e uma repopulação progressiva por células musculares lisas. A técnica evidenciou a capacidade de produzir um construto denso em células, com uma MEC semelhante em arquitetura e composição aos vasos naturais. O estudo confirmou que a técnica de rolamento concêntrico usando a MAH-D é uma estratégia para desenvolver *scaffolds* vasculares densos, reforçando o potencial da MAH-D para a engenharia e reconstrução de vasos sanguíneos danificados, possibilitando a fabricação de vasos com diferentes diâmetros, espessuras de parede, forma e comprimento para corresponder à conformidade do vaso, adaptando as especificações para locais distintos e viabilizando moldar estruturas mais complexas, como bifurcações.

Nesse contexto, Amensag *et al.* (2017) utilizou a MAH-D como enxerto vascular baseado em MEC humana aplicada em um modelo experimental de coelho. A MAH-D foi associada a fibrina e liofilizada, em seguida, semeada com células musculares lisas humanas e cultivadas sob condições hemodinâmicas arteriais controladas *in vitro*. Os *scaffolds* foram implantados cirurgicamente como enxertos de interposição arterial nas artérias carótidas de coelhos imunocompetentes. Os resultados obtidos confirmaram a capacidade de criar um enxerto vascular de geometria diversificada, com potencial de crescimento *in situ* viabilizado pelos componentes biológicos endógenos da MAH-D. Além de oferecer integridade mecânica adequada, tolerância imunológica pós-operatória com duração de ao menos 4 semanas e uma remodelação celular que se aproxima da arquitetura vascular nativa. Os sinais de remodelação construtiva confirmaram o potencial promissor do biomaterial para reconstrução de tecido vascular alogênico.

Ainda visando a aplicação da MAH-D em enxertos de substituição vascular, Swim *et al.* (2018) desenvolveu um modelo de MAH-D organizado em multicamadas. As propriedades de proliferação e sobrevivência celular foram iguais em ambas estruturas, em contrapartida a MAH-D em multicamadas resultou em maior resistência mecânica que a MAH-D de camada única. A construção multicamadas mostrou biocompatibilidade *in vitro* com células endoteliais, células musculares lisas, miócitos cardíacos e células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas do timo e do sangue do cordão umbilical. Ao ser implantada em um modelo de enxerto de artéria pulmonar esquerda em leito, a MAH-D multicamadas foi eficaz para reparo vascular, visto pelo desenvolvimento de endotélio recém-formado na íntima, uma camada medial rica em células musculares lisas e uma adventícia contendo novos vasa

vasorum. Sendo assim, a MAH-D liofilizada em multicamadas demonstrou-se uma estrutura biocompatível pronta para uso, que viabiliza a produção de um enxerto vascular autólogo utilizando-se das próprias MSCs do paciente sobre sua superfície.

Conclusão

Após a análise da literatura, foi possível definir que a MAH-D é utilizada de forma ampla como *scaffold* na MR. O seu uso é bem estabelecido na oftalmologia, porém vem se expandindo e ganhando destaque para as demais aplicações uma vez que se trata de um *scaffold* biocompatível muito associado a células-tronco semeadas em sua superfície, o que permite o desenvolvimento de enxertos alógenos e autólogos.

Referências

- AKAZAWA, K. *et al.* Double-layered cell transfer technology for bone regeneration. **Scientific reports**, v. 6, n.33286, 2016.
- AKHLAGHI, F. *et al.* Improved bone regeneration through amniotic membrane loaded with buccal fat pad-derived MSCs as an adjuvant in maxillomandibular reconstruction. **Journal of cranio-maxillo-facial surgery**, v.47, n.8, p.1266–1273, 2019.
- AMENSAG, S.; MCFETRIDGE, P. S. Rolling the Human Amnion to Engineer Laminated Vascular Tissues. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v.18, n.11, p.903–912, 2012.
- AMENSAG, S. *et al.* Pilot assessment of a human extracellular matrix-based vascular graft in a rabbit model. **Journal of Vascular Surgery**, v.65, n.3, p. 839-847, 2017.
- CHEN, Y. J. *et al.* The effects of acellular amniotic membrane matrix on osteogenic differentiation and ERK1/2 signaling in human dental apical papilla cells. **Biomaterials**, v.33, n.2, p. 455–463, 2011.
- CHEN, X. *et al.* Antifibrotic Effects of Decellularized and Lyophilized Human Amniotic Membrane Transplant on the Formation of Intrauterine Adhesion. **Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, v.17, n.2, p.236–242, 2019.
- CHEN, X. *et al.* Transplantation of decellularized and lyophilized amniotic membrane inhibits endometrial fibrosis by regulating connective tissue growth factor and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. **Experimental and therapeutic medicine**, v.22, n.3:968, 2021.
- FÉNELON, M. *et al.* Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. **Membranes**, v.11, n.387, p.1-27, 2021.
- GHOLIPOURMALEKABADI, M. *et al.* Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells?. **Cell proliferation**, v.49, n.1, p.115–121, 2016.
- JAHANAFROOZ, Z. Human amniotic membrane as a multifunctional biomaterial: recent advances and applications. **J. Biomaterials Appl**, v.37, n.8, p.1341–1354, 2023.
- JIRSOVA, K.; JONES, G. L. A. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting—a review. **Cell Tissue Bank**, v.18, p.93–204, 2017.
- IWASAKI, K. *et al.* Periodontal Regeneration Using Periodontal Ligament Stem Cell-Transferred Amnion. **Tissue Engineering Part A**, v.20, n.3 e 4, 2014.

KAKABADZE, Z. *et al.* Clinical application of decellularized and lyophilized human amnion/chorion membrane grafts for closing post-laryngectomy pharyngocutaneous fistulas. **J. Surg. Oncol.**, v.113, n.5, p. 538–543, 2016.

KOIZUMI, N. *et al.* Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. **Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 245, p.123–134, 2007.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920–926, 1993.

LIANG, H. S. *et al.* Denuded human amniotic membrane seeding bone marrow stromal cells as an effective composite matrix stimulates axonal outgrowth of rat neural cortical cells in vitro. **Acta Neurochir**, v.151, p.1113–1120, 2009.

MAHLA, R. S. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. **Int J Cell Biol**, 2016.

MAO, Y. *et al.* A tri-layer decellularized, dehydrated human amniotic membrane scaffold supports the cellular functions of human tenocytes in vitro. *Journal of materials science*. **Materials in medicine**, v.34, n.7:37, 2023.

NAKAMURA, T. *et al.* Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. **Cornea**, v.22, n.1, p.70–1, 2003.

NAKAMURA, T. *et al.* Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. **Acta Ophthalmol Scand**, v.82, n.4, p.468–71, 2004.

POEL, W. E. Preparation of Acellular Homogenates From Muscle Samples. **Science** (New York, N.Y.), v.108, n.2806, p.390–391, 1948.

RAI, V. *et al.* Recent strategies in cartilage repair: a systemic review of the scaffold development and tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, v.105, n.8, p.2343–2354, 2017.

SANGWAN, V. S. *et al.* Use of autologous cultured limbal and conjunctival epithelium in a patient with severe bilateral ocular surface disease induced by acid injury: a case report of unique application. **Cornea**, v. 22, n.5, p.478–81, 2003.

SHARMA, P. *et al.* Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. **J Med Life**, v.12, n.3, p.225–229, 2019.

SHORTT, A. J. *et al.* The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. **Biomaterials**, v.30, n.6, p.1056–1065, 2009.

SCHWAB, I. R. Epitélios corneanos cultivados para doença da superfície ocular. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 97, p. 891, 1999.

SWIM, M. M. *et al.* Amnion-based scaffold with enhanced strength and biocompatibility for in vivo vascular repair. **Tissue Engineering Part A**, 2018.

XU, P. *et al.* Decellularized extracellular matrix-based composite scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Regenerative Biomaterials**, v.11, p.11-29, 2024.