

ESTUDO DA INTEGRIDADE DA CAMADA EPITELIAL DAS REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA CRIOPRESERVADA POR IMUNOHISTOQUÍMICA

João Vitor Alcântara da Costa, Elisa Polifke Trindade, Gabriela Antonia Tie Calheiro, 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, joaovalcosta@gmail.com, elisapolifke@yahoo.com, gabriela.atie@hotmail.com, lucianabsa@gmail.com

Resumo

A membrana amniótica humana (MAH) é a camada mais interna das membranas fetais, que envolve e protege o feto. As propriedades funcionais da MAH são atribuídas às suas características morfológicas e aos fatores biológicos produzidos pelas células epiteliais, o que torna imprescindível a preservação da sua integridade para uso clínico. Este estudo objetivou avaliar a integridade estrutural da MAH nas suas diferentes regiões anatômicas, especificamente no seu lado epitelial, após o método da criopreservação, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ). Foram utilizados 12 cortes histológicos de cada grupo: Controle e Criopreservada, de três placentas distintas, analisados e avaliados qualitativamente por coloração hematoxilina/eosina (HE) e IHQ para Citoqueratina, proteína específica da camada epitelial da membrana. Os resultados obtidos indicaram que o armazenamento da MAH a longo prazo pelo protocolo de criopreservação se mostra eficiente, sobretudo em casos em que se faz necessário um epitélio íntegro e biologicamente ativo.

Palavras-chave: Membrana Amniótica Humana. Imuno-histoquímica. Preservação de Tecido. Citoqueratina.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

A membrana amniótica humana (MAH) é a camada mais interna das membranas fetais, que envolve e protege o feto, e que juntamente com a placenta é descartada após o parto. É composta por uma monocamada de células epiteliais amnióticas humanas, aderidas em uma membrana basal, e o estroma subjacente que envolve as células estromais da MAH. Sendo esta, um material disponível em alta quantidade, com baixos custos de processamento, e ausência de conflitos éticos e/ou religiosos (Arrizabalaga; Nollert, 2018).

Devido a sua estrutura única, em adição às propriedades mecânicas (estabilidade, resistência, flexibilidade, e permeabilidade) e biológicas (anti-inflamatória, antifibrótica, antimicrobiana, pró e anti-angiogênica, antitumorgênica e promotora de epitelização e cicatrização), a MAH é um biomaterial natural, biocompatível e degradável utilizado como *scaffold* em várias aplicações na engenharia tecidual e medicina regenerativa, incluindo reparo de córnea, tratamento de feridas crônicas, reparo de tendão, de nervo, reconstrução genital, microvascular e intraoral (Fénelon *et al.*, 2021). Como *scaffold*, pode ser usada de três diferentes maneiras: com o epitélio amniótico; sem o epitélio amniótico (MAH desnuda) (Niknejad *et al.*, 2008); e com o estroma amniótico (Arrizabalaga; Nollert, 2018). As propriedades funcionais da MAH são atribuídas às suas características morfológicas e aos fatores biológicos solúveis e insolúveis produzidos pelas células epiteliais e presentes em seu estroma, tornando imprescindível a preservação da sua integridade, tanto do lado epitelial, quanto do lado mesenquimal ou estromal, para que exerça seus efeitos terapêuticos (Moraes *et al.* 2021).

A MAH é uma membrana fina, translúcida, avascular, e sem a presença de nervos ou músculo, com espessura entre 20 e 50µm e constituída de cinco camadas diferentes, incluindo uma camada de epitélio, uma membrana basal, uma camada compacta, uma de fibroblastos, e uma camada esponjosa (Leal-Marin *et al.*, 2020). Embora a MAH apresente essas camadas histológicas em toda a sua extensão, e é referida como uma estrutura única e contínua, ela é anatomicamente dividida nas seguintes regiões: 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 (Benirschke *et al.*, 2000). Desta forma, é importante investigar se diferentes métodos de preservação preservam a estrutura da MAH. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a integridade estrutural da MAH nas suas diferentes regiões anatômicas, PA e RA, especificamente no seu lado epitelial, após o método da criopreservação, por meio da técnica de imunohistoquímica.

Metodologia

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo nº 6.537.068). As amostras foram obtidas de três placentas a partir de cesarianas, com tempo de gestação a termo, e exames negativos para HIV 1 e 2, hepatite B/C e sífilis. As placentas foram transportadas ao laboratório, onde em condições estéreis a MAH foi destacada do cório, lavada com PBS, penicilina, estreptomicina e anfotericina B. A seguir seccionada em quatro sub-regiões de acordo com a distância do cordão umbilical, em fragmentos de 3 cm²x 3 cm², separados em dois grupos: o Grupo Controle (GC), armazenado em formol para processamento histológico, e o Grupo Criopreservada (GCrio), armazenado a -80 °C em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)/glicerol por 30 dias antecedendo o processamento histológico. Em seguida, obtiveram-se cortes histológicos (4µm) que foram colocados em lâminas silanizadas para realização da reação imunohistoquímica (IHQ) ou coloração HE.

A reação de IHQ foi realizada para a marcação da citoqueratina (CK) na camada epitelial da MAH, e se iniciou com a desparafinação dos cortes histológicos em xilol, totalizando 2 trocas de 10 minutos (min) cada. Em seguida, para o processo de hidratação, os cortes foram imersos em álcool em concentrações decrescentes (100%, 95% e 70%, de 3 min/cada). A seguir, foram colocados 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 primário policlonal anti-wide spectrum cytokeratins (WSCK) (ab9377, ABCAM) na diluição 1/300, em câmara úmida a 4°C durante 14 horas. Após 3 lavagens de 3 min/cada, com tampão PBST, foi adicionado o anticorpo 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 contra coloração com hematoxilina de Harris, desidratação em álcool 95% e 100%, diafanização em xilol e montagem com Permount.

A imunomarcação da CK foi avaliada em 12 cortes histológicos de cada grupo experimental pela análise qualitativa ao microscópio de luz observando a sua distribuição e/ou intensidade na camada epitelial da MAH. As imagens microscópicas foram capturadas por uma câmera digital (LEICA DFC 425) acoplada ao microscópio Trinocular Leica DM2500 com ampliação global de 40x.

Resultados

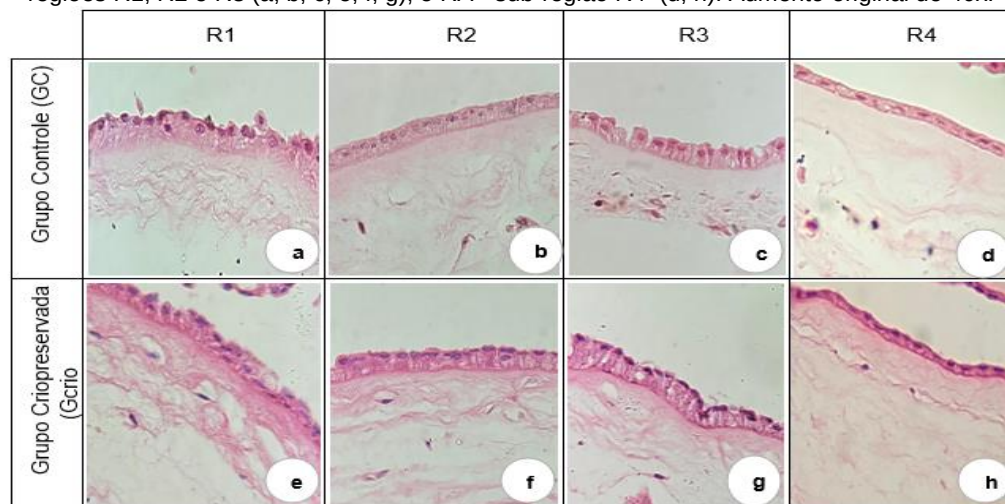
Análise da morfologia da MAH por coloração HE

A fim de avaliar os efeitos dos diferentes métodos de preservação na integridade estrutural, as amostras de MAH coradas por HE do GC foram comparadas as amostras criopreservadas (Figura 1). Em todas as sub-regiões anatômicas analisadas, as MAH do GCrio eram compostas por cinco camadas estruturais com aspectos microscópicos similares aos encontrados nas membranas do GC.

A região PA 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, 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 alargados. 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 densa e contida nas regiões da PA, e difusa e dispersa na região de RA. As amostras do GCrio obtiveram resultados substancialmente semelhantes aos do GC, preservando a morfologia estrutural das camadas da MAH e de seus componentes.

Figura 1 – Fotomicrografias da coloração HE da MAH. GC (a, b, c, d) e GCrio (e, f, g, h), obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g); e RA - sub-região R4 (d, h). Aumento original de 40x.

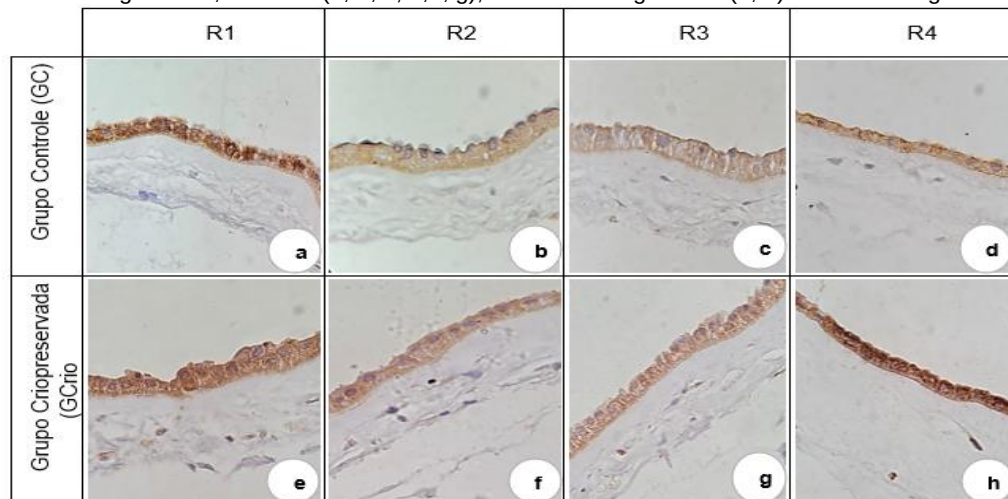


Fonte: O autor (2024).

Análise da integridade da camada epitelial da MAH por Imunohistoquímica

A análise qualitativa da imunomarcagem 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 2). Em todo GC, e em 3 membranas do GCrio, a imunomarcagem variou levemente no interior do citoplasma de algumas células mostrando regiões com menor intensidade. Além desse aspecto, em ambos os grupos, foi observada a presença de regiões pontuais com maior intensidade de marcação no interior do citoplasma, porém localizadas próximo ou ao redor dos núcleos.

Figura 2 – Fotomicrografias da imunomarcagem da MAH para CK. GC (a, b, c, d) e GCrio (e, f, g, h), obtidos de PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g); e RA - sub-região R4 (d, h). Aumento original de 40x.



Fonte: O autor (2024).

Discussão

Os resultados obtidos permitiram verificar, por coloração HE e IHQ, a eficácia da preservação da MAH, em especial a integridade da camada epitelial, pelo protocolo de criopreservação. Observou-se que as amostras do GCrio apresentaram morfologia estrutural semelhante as do GC, e uma camada epitelial íntegra, indicando preservação dos potenciais biológicos destas células.

A morfologia das camadas estruturais presentes na MAH 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 um formato majoritariamente cuboide, sendo que as da sub-região central (R1) apresentaram um 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 à R3. Ainda nestas sub-regiões, R2 e R3, as células apresentaram um contorno irregular dando um aspecto de estreitamento do corpo celular, assim 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 MAH (Basile *et al.*, 2023). Já as células da região RA (R4), se encontravam em 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 por Al-Yahya e Makhoulf (2013), que definiram o epitélio amniótico como morfológicamente heterogêneo. Ademais, Al-Yahya e Makhoulf (2013) concluíram que a heterogeneidade da camada epitelial da MAH 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) investigou a ultraestrutura da camada epitelial da MAH, e verificou 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 têm um formato em “célula” (dome shape), e em R3 as células são predominantemente colunares altas.

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 Thomasen *et al.* (2011), os quais demonstraram que a MAH criopreservada se mantém com cinco camadas integras e semelhantes morfológicamente às encontradas nas MAH frescas.

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 junto, por ser particularmente citotóxico às células da camada epitelial da MAH. 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. Alguns 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 (Riau *et al.*, 2010).

Entretanto, neste trabalho não foram visualizadas células em degeneração ou em apoptose, e os pequenos “vacúolos” estavam no citoplasma de algumas células, tanto no grupo controle, quanto no grupo MAH criopreservada, o que sugere um processo fisiológico do epitélio amniótico e não um dano causado pelo método da criopreservação. Assim também, Al-Yahya e Makhoulf (2013) demonstraram que o citoplasma das células epiteliais da MAH comumente se apresenta eosinófilico e vacuolizado. Ademais, em um 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.

As citoqueratinas são as principais proteínas estruturais das células epiteliais (Coulombe; Omary, 2002), e apresentam associação específica com o tipo e a diferenciação celular. Diferentes tipos de queratinas são expressas durante a diferenciação das células epiteliais, em diferentes estágios de desenvolvimento e em tecidos epiteliais distintos, bem como em estados patológicos e alterações no ambiente celular (Dias *et al.*, 2006).

Os cortes histológicos analisados neste estudo apresentaram imunomarcagem positiva e homogênea em toda camada epitelial da MAH, indicando a presença de filamentos intermediários de CK no interior das células epiteliais do GC, bem como a preservação dessas estruturas nas células do GCrio. Estes achados corroboram com o estudo de Regauer *et al.* (1985), que apontam que a expressão dessas proteínas nas células epiteliais da MAH 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 um arcabouço, resistente, mas flexível, que permite às células epiteliais suportarem tensões mecânicas e não-mecânicas. No presente trabalho a imunomarcagem 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, ou ainda, estar associado a fatores fisiológicos maternos. Ricci *et al.* (2013) avaliaram a integridade da MAH fresca e criopreservada com DMEM/glicerol antes de ser aplicada experimentalmente no tratamento da fibrose hepática em ratos. Com relação à marcação da CK, a IHQ demonstrou marcação na totalidade das células epiteliais, resultado igual ao encontrado no presente trabalho, confirmando a integridade do epitélio. A integridade da camada epitelial da MAH possui importância clínica pois a preservação das células amnióticas, torna possível a utilização das mesmas para promoção da liberação constante das proteínas solúveis e insolúveis, as quais são responsáveis pelos potenciais de regeneração e reepitelização desempenhados pela MAH (Thomassen *et al.*, 2009), bem como, na produção de neurotransmissores (Sakuragawa *et al.*, 2001), neuropeptídeos (Uchida *et al.*, 2000), fatores neurotróficos (Touhami; Grueterich; Tseng, 2002), e fatores de crescimento derivados de pigmento (PEDF) (Shao *et al.*, 2004).

Finalmente, os resultados encontrados no presente estudo corroboram com a literatura científica, indicando que o armazenamento da MAH pelo protocolo de criopreservação se mostra eficiente, sobretudo em casos em que se faz necessário um epitélio íntegro e biologicamente ativo, como na reconstrução de superfície ocular, tratamento de úlceras de córnea e no tratamento de fibrose hepática (Sant'Anna *et al.*, 2016).

Conclusão

O método de criopreservação usando DMEM/glicerol foi eficiente para a preservação da integridade estrutural da MAH, especificamente da camada epitelial, em todas as sub-regiões da PA e RA, indicando sua utilização para o armazenamento da MAH, sobretudo em casos em que se faz necessário um epitélio íntegro e biologicamente ativo.

Referências

- DIAS, A.T. *et al.* Histopathological Findings and Immunohistochemical Expression of Vimentin, Cytokeratin 8 and Cytokeratin 18 in Freeze-Dried and Fresh-Frozen Preserved Human Amniotic Membranes. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 47, n. 13, p. 5049, 2006.
- ARRIZABALAGA, J. H.; NOLLERT, M. U. Human Amniotic Membrane: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 7, p. 2226-2236, 2018.
- BASILE, M. *et al.* Mapping of the Human Amniotic Membrane: In Situ Detection of Microvesicles Secreted by Amniotic Epithelial Cells. **Cell Transplantation**, v. 2, p. 1-11, 2023.
- BENIRSCHKE, K. *et al.* Anatomy and Pathology of the Placental Membranes. In: Pathology of the Human Placenta. **Springer**, v. 6, p. 249-307, 2012.
- COULOMBE, P. A.; OMARY, M. B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, p. 110-22, 2002.

FÉNELON M. *et al.* Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. **Membranes**, v. 11, n. 6, p. 387, 2021.

LEAL-MARIN, S. *et al.* Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **J Biomed Mater Res**, v. 109, p. 1198–1215, 2021.

NIKNEJAD, H. *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **EUR CELLS MATER**, v. 15, p. 88 – 99, 2008.

MORAES, J. *et al.* Effects of Preservation Methods in the Composition of the Placental and Reflected Regions of the Human Amniotic Membrane. **Cells Tissues Organs**, v. 210, n. 1, p. 66–76, 2021.

REGAUER, S. *et al.* 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**, v.100, n.4, p. 997-1009, 1985.

RIAU, K. *et al.* Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v.31, p.216–225, 2010.

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

SAKURAGAWA, N. *et al.* non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. **Jpn J Pharmacol**, v.85, p.20–3, 2001.

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.

SHAO, C. *et al.* Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.45, p.1758–62, 2004.

THOMASEN, H. *et al.* 'The Effect of Long-Term Storage on the Biological and Histological Properties of Cryopreserved Amniotic Membrane', **Current Eye Research**, v.36, n.3, p. 247–255, 2011.

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

TOUHAMI, A.; GRUETERICH, M.; TSENG, S. C. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.43, p.987–94, 2002.

UCHIDA, S. *et al.* Neurothopic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. **J Neurosci Res**, v.62, p.585–90, 2000.