EFEITOS DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA IMUNOEXPRESSÃO DO COLÁGENO DAS SUB-REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

Mariana da Costa Magalhães Gonçalves, 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, marimagalhães1505@gmail.com, lucianabarros@gmail.com.

Resumo

A membrana amniótica (MA) é um biomaterial promissor para a medicina regenerativa devido às suas propriedades físico-químicas. Este estudo analisou a integridade dos colágenos tipo I e III nas regiões do âmnio placentário e âmnio refletido, através da técnica de imuno-histoquímica. Três placentas humanas a termo foram processadas e divididas em diferentes regiões anatômicas. Os fragmentos foram distribuídos em três grupos: controle, fresca e criopreservada. Após os respectivos tratamentos, as amostras foram processadas histologicamente e submetidas à técnica de imuno-histoquímica e posteriormente análises quantitativas e para avaliar os efeitos dos métodos de preservação sobre a integridade do colágeno. Após as análises foi possível observar que a imunoexpressão de colágeno I e III não foi estatisticamente significante, demonstrando assim que o método criopreservado e o processo a fresco são igualmente eficazes para a manutenção da integridade estrutural e funcional dessas proteínas.

Palavras-chave: Membrana Amniótica Humana. Imuno-histoquímica. Colágeno. Preservação.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A membrana amniótica humana (MA) é uma das camadas que compõem a placenta, juntamente com a membrana coriônica. Com espessura variando entre 20 e 50 µm, a membrana amniótica é constituída por 3 camadas histológicas: epitélio, constituído por uma monocamada de células, a membrana basal, e o estroma avascular o qual é subdividido em 3 camadas: compacta, fibroblástica e esponjosa. A compacta é composta predominantemente por fibras de colágeno I e III, enquanto a fibroblástica contém os fibroblastos e macrófagos. Já a camada esponjosa permite o deslizamento da MA sobre a membrana coriônica, possibilitando a separação manual entre ambas (Leal-Marin *et al.,* 2020). A composição química e sua organização estrutural conferem à MA propriedades importantes para processos relacionados a regeneração tecidual, o que justifica seu uso como um biomaterial na engenharia de tecidos (Hu *et al.,* 2023; Niknejad *et al.,* 2008)

Além da sua organização histológica, a membrana amniótica humana pode ser dividida em sub-regiões de acordo com sua localização em relação ao cordão umbilical e ao disco placentário. A porção da membrana localizada sobre o disco placentário é denominada âmnio placentário, sendo subdividida em região central, próxima ao cordão umbilical (R1), região intermediária (R2) e região periférica (R3). Já a porção da membrana localizada externamente ao disco placentário corresponde ao âmnio refletido (R4). Estudos têm demonstrado que essas sub-regiões apresentam diferenças estruturais, bioquímicas e funcionais, que podem influenciar na distribuição e na expressão de componentes da matriz extracelular.

Além de sua organização estrutural, a MA apresenta um conjunto único de propriedades biológicas e bioquímicas que contribuem para o seu potencial terapêutico. Essas propriedades são atribuídas principalmente aos fatores de crescimento e moléculas bioativas em seu estroma avascular, os quais participam dos processos de regeneração celular, cicatrização e reepitelização. A MA também apresenta atividade antinflamatória, antimicrobiana, antiangiogênicas e baixa imunogenicidade, características que favorecem seu uso como um biomaterial (Heydari *et al.,* 2024). Em conjunto às

características biológicas a MA também apresenta propriedades mecânicas importantes nesses processos, como elasticidade e resistência à tração, as quais estão relacionadas à composição e matriz celular da MA.

As propriedades mecânicas da MA estão relacionadas à composição e organização da sua matriz extracelular, constituída por diferentes tipos de colágeno, destacando-se os colágenos dos tipos I e III (Guzeldemir-Akcakanat *et. al.,* 2025). Dessa forma, a avaliação da expressão de colágenos nas diferentes sub-regiões da MA é fundamental para a compreensão de como os métodos de preservação podem impactar diretamente na manutenção desses componentes influenciando assim suas propriedades estruturais e funcionais. Dentre esses métodos, a criopreservação destaca-se por prolongar a viabilidade e disponibilidade da MA, uma vez que permite o armazenamento por longos períodos (Riau *et al.,* 2010; Leal-Marin *et al.,* 2020; Jafari *et al.,* 2024) Entretanto, ainda existem controvérsias sobre seu uso, quanto aos efeitos da criopreservação e da utilização de crioprotetores em relação a integridade da MA e seus componentes. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da criopreservação sobre a MA em comparação com a MA fresca, por meio da análise da imunoexpressão dos colágenos I e III nas diferentes sub-regiões da membrana, visando compreender o impacto desses métodos de preservação na manutenção das propriedades da membrana amniótica.

Metodologia

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, foram utilizadas três placentas (idade gestacional ≥ 39 semanas), obtidas a partir de cesarianas eletivas, no Hospital Santa Casa de São José dos Campos, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todas as doadoras apresentaram sorologia negativa para HIV-1 e 2, hepatites B e C e sífilis. Após a coleta, as placentas foram transportadas ao laboratório sob refrigeração. Em condições estéreis, a membrana amniótica foi manualmente separada do córion e lavada com solução fisiológica contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e anfotericina B e fragmentadas em amostras de 3 × 3 cm², conforme as suas sub-regiões. As amostras foram divididas nos grupos: MA controle-os fragmentos foram imediatamente fixados em formalina tamponada a 10%; MA fresca-as amostras foram mantidas em meio DMEM à temperatura ambiente por 18 h e posteriormente fixadas em formalina; e MA criopreservada-os fragmentos foram imersos em solução DMEM/glicerol (1:1, v/v) e armazenados a -80 °C por 30 dias, sendo posteriormente fixados em formalina.

Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas para o processamento histológico e inclusão em paraplast. Foram obtidos cortes histológicos com espessura de 4 µm, para a realização da técnica de imunohistoquímica utilizada para a análise dos colágenos tipos I e III. Após a desparafinização e hidratação dos cortes, realizou-se a recuperação antigênica em tampão citrato a 96 °C por 20 minutos, seguida do bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS+0,05%Tween20 e incubados overnight, em câmara úmida a 4 °C por aproximadamente 13 horas, com os anticorpos primários anti-colágeno tipo I (ab34710, Abcam) e anti-colágeno tipo III (ab7778, Abcam). Utilizou-se o sistema ImmPRESS Universal Reagent Anti-Mouse/Rabbit Ig Polymer Detection Kit (Vector Laboratories) como anticorpo secundário. Após três lavagens em PBS+0,05%Tween20, a reação imunohistoquímica foi revelada com o cromógeno DAB (ImmPACT DAB, Vector Laboratories) por 2 minutos. As lâminas foram então lavadas em água corrente e destilada, contra coradas com hematoxilina de Harris por 50 segundos, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas com Permount.

As imunomarcações foram avaliadas qualitativamente em microscópio de luz, observando-se a distribuição e a intensidade da expressão dos colágenos tipos I e III, e quantitativamente por meio da análise digital das imagens, visando determinar a porcentagem média de imunomarcação em cada sub-região da membrana amniótica. Para isso, as microfotografias foram obtidas em microscópio trinocular Leica DM2500, acoplado a uma câmera digital Leica DFC 425, sendo digitalizadas com resolução de 1024 × 768 pixels e aumento final de 400×.

Em seguida, as imagens foram processadas e analisadas pelo software ImageJ, que permitiu identificar e quantificar a área correspondente às imunomarcações, determinando a porcentagem da área marcada em relação à área total da imagem. Após a obtenção dos dados, foi realizada análise de variância paramétrica one-way (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey,

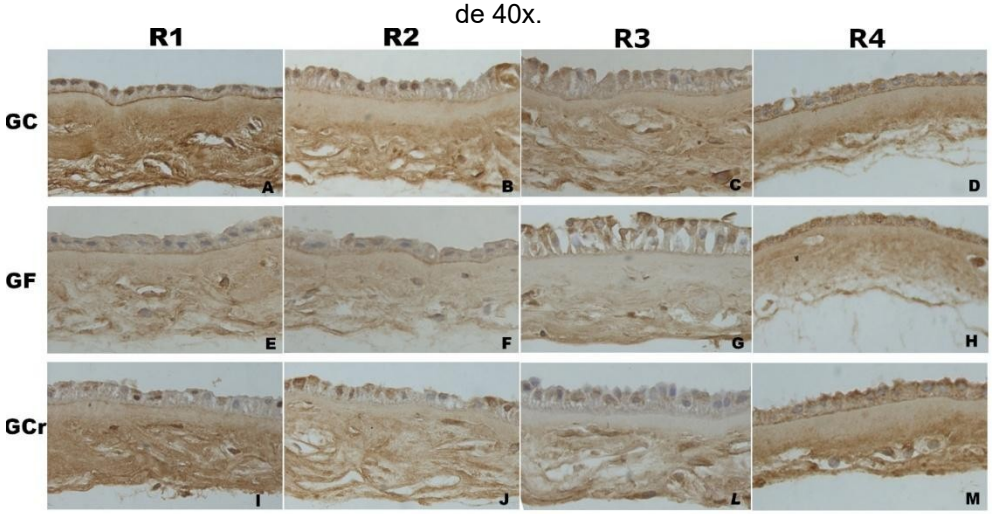
considerando-se valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos. As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism.

Resultados

A análise qualitativa da imunohistoquímica do colágeno tipo I (Figura 1) demonstrou que a imunomarcação foi distribuída na matriz extracelular em toda extensão da camada mesenquimal, sendo a camada fibroblástica com maior intensidade e a compacta com menor intensidade. As sub-regiões R1, R2, R3 exibiram uma trama colágena densa e heterogênea, com feixes colágenos ligeiramente ondulados, diferente do padrão encontrado em R4, uma trama colágena mais fina.

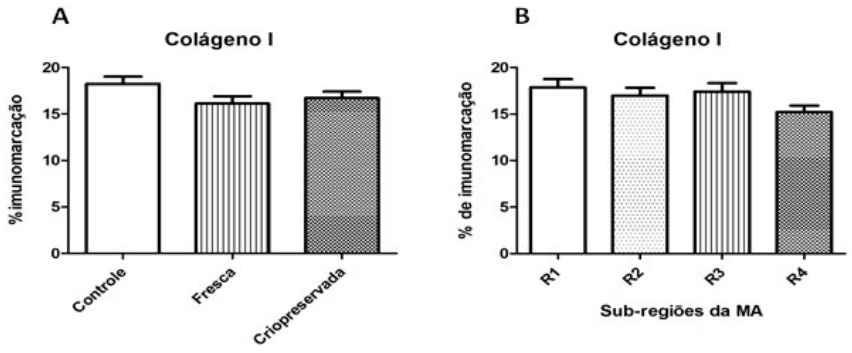
Ao comparar os grupos experimentais (MA controle, fresca e criopreservada) a distribuição da imunomarcação do colágeno tipo I foi semelhante, indicando que os métodos de preservação foram eficientes em manter a integridade do colágeno tipo I, confirmado também na análise quantitativa (Figura 2).

Figura 1 - Fotomicrografias da imunomarcação de colágeno tipo I da MA. GC-Grupo controle (a, b, c, d), GF-Grupo fresca (e, f, g, h) e GCr-Grupo criopreservada (i, j, k, l) obtidos da região PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e da região RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.



Fonte: A autora, 2026

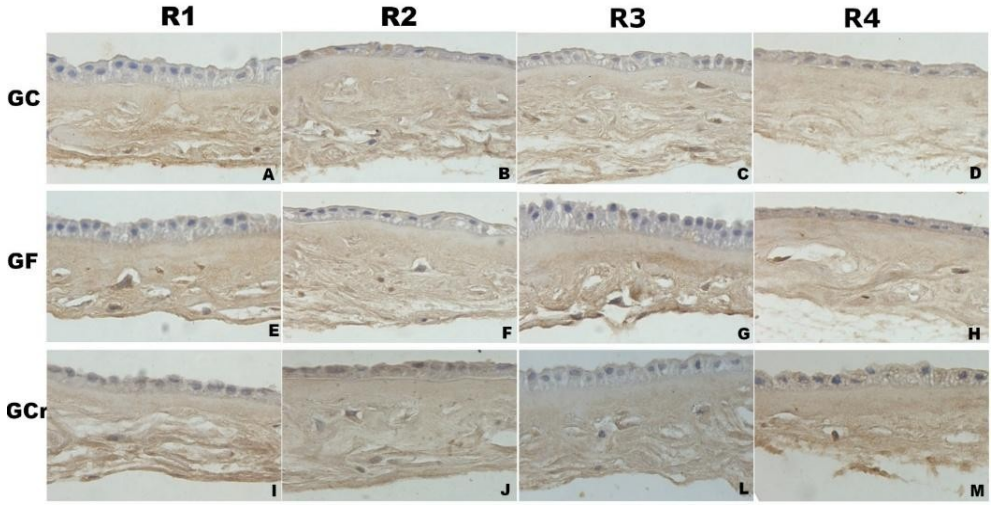
Figura 2 - Avaliação quantitativa da imunomarcação de colágeno tipo I. A) Análise intergrupo-entre os grupos controle, fresca e criopreservada; B) Análise intragrupo – entre as diferentes sub-regiões da MA, R1, R2, R3 e R4. $p > 0.05$, não estatisticamente significante.



Fonte: A autora, 2026

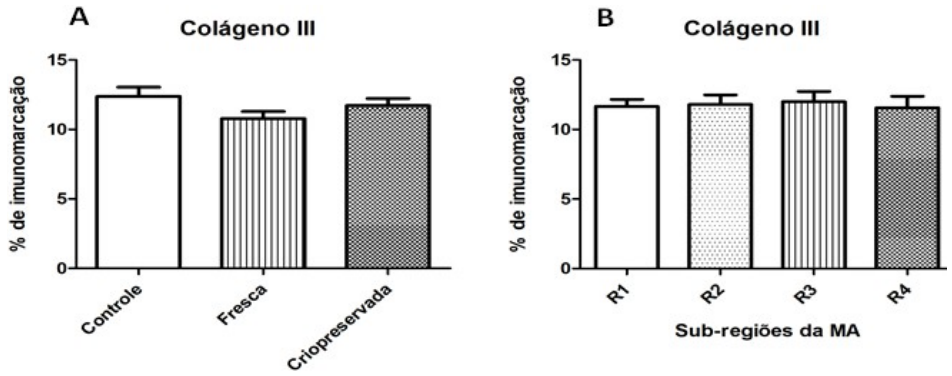
A análise qualitativa da imunohistoquímica do colágeno tipo III (Figura 3) demonstrou que a imunomarcação foi distribuída na matriz extracelular em toda camada mesenquimal da MA de forma homogênea, quando comparado à imunomarcação do colágeno tipo I. Em todas as sub-regiões a marcação foi mais evidente na camada fibroblástica evidenciando a trama reticular de colágeno. Entretanto, é uma trama colágena mais fina, menos densa. Ao comparar os grupos experimentais (MA controle, fresca e criopreservada) a distribuição da imunomarcação do colágeno tipo III foi semelhante, resultado este confirmado também na análise quantitativa (Figura 4).

Figura 3 – Fotomicrografias da imunomarcação de colágeno tipo III da MA. GC-Grupo controle (a, b, c, d), GF-Grupo fresca (e, f, g, h) e GCr-Grupo criopreservada (i, j, k, l) obtidos da região PA - sub-regiões R1, R2 e R3 (a, b, c; e, f, g; i, j, k); e da região RA - sub-região R4 (d, h, l). Aumento original de 40x.



Fonte: A autora, 2026

Figura 4 – Avaliação quantitativa da imunomarcação de colágeno tipo III. A) Análise intergrupo- entre os grupos controle, fresca e criopreservada; B) Análise intragrupo – entre as diferentes sub-regiões da MA, R1, R2, R3 e R4. $p > 0.05$, não estatisticamente significante.



Fonte: A autora, 2026

Discussão

A MA tem sido amplamente empregada como um biomaterial em aplicações na medicina regenerativa, devido às suas propriedades biológica, bioquímicas e mecânicas (Fénelon *et al.,* 2021; Kopaczka *et al.,* 2016; Tehrani *et al.,* 2021). Entretanto, para a sua utilização clínica, nem sempre é viável a utilização do tecido de forma fresca, tornando necessário a utilização de métodos de preservação para seu uso posterior, a fim de manter sua integridade estrutural e funcional. Assim, este

estudo avaliou o impacto dos métodos de preservação (fresca e criopreservada) na matriz extracelular da MA, por meio da análise da imunoexpressão dos colágenos tipos I e III em suas diferentes sub-regiões.

Os principais achados das análises qualitativas e quantitativas demonstram que a integridade estrutural e o percentual médio de imunomarcação de ambas as proteínas foram preservadas após os métodos de criopreservação e processo a fresco, quando comparadas ao grupo controle, mantendo uma equivalência entre os três grupos experimentais, sem diferenças estatisticamente significativas. Assim também a análise intragrupo, mostrou a manutenção da integridade estrutural dos colágenos também ao longo de cada sub-região, independentemente do método de criopreservação. Os estudos de Riau *et al*. (2020) e Jafari *et al.* (2024) corroboram com essa afirmação, pois a utilização de protocolos adequados para a criopreservação do tecido preserva as propriedades estruturais e os componentes da matriz extracelular sem causar danos severos às fibras de colágeno, além de viabilizar o armazenamento prolongado da MA. O processo a fresco, também bastante citado na literatura, auxilia na preservação da matriz extracelular, sendo muito utilizada como scaffold nas terapias regenerativas. (Jafari *et al.,* 2024).

A avaliação qualitativa da imunoexpressão do colágeno I, por meio da comparação entre as sub-regiões R1, R2, R3 e R4, evidenciou que a MA possui variações morfológicas distintas ao longo da extensão do tecido (Connon *et al.,* 2010). As sub-regiões R1, R2 e R3, apresentaram uma trama colágena mais densa, composta por feixes ligeiramente sinuosos e com uma imunoexpressão heterogênea. Por outro lado, a sub-região R4 apresentou uma trama colágena visualmente mais fina e com feixes menos densos quando comparado às demais sub-regiões, característica estas encontradas normalmente em R4, devido possuir uma camada fibroblástica menos espessa (Mamede *et al.,* 2012). Apesar das variações microscópicas as análises quantitativas revelaram que o percentual de imunoexpressão do colágeno I nas sub regiões não possui uma variação estatisticamente significativa, sugerindo que a densidade de distribuição dessa proteína ao longo do tecido se mantém proporcional em toda a sua extensão.

Em relação a avaliação qualitativa do colágeno III na camada mesenquimal da MA, a imunoexpressão foi mais homogênea e menos intensa quando comparada ao colágeno I. O colágeno III se apresentou com uma intensidade menor em relação ao colágeno I devido às características físico-químicas dessas proteínas, onde o colágeno I é formado por feixes mais espessos e altamente resistentes, enquanto o colágeno III é responsável por sintetizar fibrilas finas e com arranjo mais frouxo, o que confere a MA flexibilidade e elasticidade (Gelse *et al.,* 2003). Em todas as sub-regiões, quando se observa as subdivisões da camada mesenquimal, a imunomarcação do colágeno III foi mais evidente na camada fibroblástica, com feixes colágenos arranjados em uma rede tecidual reticular. Quantitativamente o colágeno III não evidenciou variações estatisticamente significativas no percentual de imunoexpressão tanto nas análises intergrupos quanto intragrupos.

Conclusão

Os métodos de preservação criopreservada e fresca que foram empregados na membrana amniótica foram igualmente eficazes para a manutenção da integridade estrutural dos colágenos I e III. Além disso, a MA demostrou variações morfológicas qualitativas em suas sub-regiões, diferenciando o âmnio placentário do âmnio refletido, mas também com a integridade preservada. Portanto, ambos os métodos foram eficientes em preservar a matriz extracelular viabilizando o uso da membrana amniótica como um *scaffold* para a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa.

Referências

CONNON, C. J.; DOUTCH, J.; CHEN, B.; HOPKINSON, A.; MEHTA, J. S.; NAKAMURA, T.; KINOSHITA, S.; MEEK, K. M. The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 94, n. 8, p. 1057-1061, 2010. DOI: 10.1136/bjo.2008.153064.

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

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens structure, function, and biosynthesis. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 55, n. 12, p. 1531-1546, 2003. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.

GUZELDEMIR-AKCAKANAT, E.; KAN-KARABIYIK, D.; YIGIT, D. A membrana amniótica humana e suas aplicações na odontologia regenerativa: uma visão geral. **Curr. Oral Health Rep.**, v. 12, p. 17, 2025.

HEYDARI, P.; MOJAHEDI, M.; JAVAHERCHI, P.; SHARIFI, M.; KHARAZI, A. Z. Advances and impact of human amniotic membrane and human amniotic-based materials in wound healing application. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 281, pt. 4, p. 136596, 2024. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.

HU, Z.; LUO, Y.; NI, R. et al. Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. **Mater. Today Bio**, v. 22, p. 100790, 2023.

JAFARI, A.; MIRZAEI, Y.; MER, A. H.; REZAEI-TAVIRANI, M.; JAFARI, Z.; NIKNEJAD, H. Comparison of the effects of preservation methods on structural, biological, and mechanical properties of the human amniotic membrane for medical applications. **Cell Tissue Bank.**, 2024.

KOPACZKA, K. et al. The relationship between amniotic epithelial cells and their microenvironment. **J. Appl. Biomed.**, v. 14, p. 1-17, 2016.

LEAL-MARIN, S. et al. Human amniotic membrane: a review on tissue engineering, application, and storage. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 109, p. 1198-1215, 2020.

MAMEDE, A. C.; CARVALHO, M. J.; ABRANTES, A. M.; LARANJO, M.; MAIA, C. J.; BOTELHO, M. F. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell Tissue Res.**, v. 349, n. 2, p. 447-458, 2012. DOI: 10.1007/s00441-012-1424-6.

NIKNEJAD, H. et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur. Cells Mater.**, v. 15, p. 88-99, 2008.

TEHRANI, F. D. et al. A review on modifications of amniotic membrane for biomedical applications. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 8, p. 1444, 2021.