



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

VITOR EDUARDO MAMGUÊ

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DA PADRONIZAÇÃO DE
MODELOS EXPERIMENTAIS DE SCAFFOLDS DÉRMICOS CANINOS**

REALEZA

2022

VITOR EDUARDO MAMGUÊ

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DA PADRONIZAÇÃO DE
MODELOS EXPERIMENTAIS DE SCAFFOLDS DÉRMICOS CANINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS),
como requisito para obtenção do título de Médico
Veterinário

Orientador: Patricia Romagnolli

REALEZA

2022

Mamguê, Vitor Eduardo
Caracterização de Biomateriais a Partir da
Padronização de Modelos Experimentais de Scaffolds
Dérmicos Caninos / Vitor Eduardo Mamguê. -- 2022.
22 f.

Orientadora: Patricia Romagnolli

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2022.

1. Biomateriais. 2. Engenharia de Tecidos. 3.
Medicina Regenerativa. I. Romagnolli, Patricia, orient.
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

VITOR EDUARDO MAMGUÊ

**CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DA PADRONIZAÇÃO DE
MODELOS EXPERIMENTAIS DE SCAFFOLDS DÉRMICOS CANINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS),
como requisito para obtenção do título de Médico
Veterinário

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 07/04/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Patricia Romagnolli – UFFS
Orientadora

Prof. Dr. Gentil Ferreira Gonçalves - UFFS
Avaliador

Prof.^a Dr.^a Denise Maria Sousa de Mello - UFFS
Avaliadora

RESUMO

A Medicina Regenerativa consiste em uma área multidisciplinar que tem como objetivo promover a regeneração de tecidos que tenham sofrido injúrias. No caso da pele, quando ocorrem lesões que provocam perdas extensas de tecido, uma das principais formas de tratamento é a utilização de enxerto de pele autólogo, porém não é sempre possível coletar a pele para esse tratamento. Diante disso, a Engenharia de Tecidos, subárea da Medicina Regenerativa, começou a desenvolver diversos métodos para a produção de biomateriais, como os *scaffolds*, que possam substituir a pele nesses enxertos. Para tanto, esse estudo tem como objetivo avaliar a eficácia de um protocolo de descclularização da pele de cães para produção de *scaffolds* dérmicos caninos. O protocolo utilizado foi baseado na imersão de fragmentos de pele canina em diferentes soluções para promover a remoção celular do tecido. Essas amostras foram separadas em três grupos e submetidas à processos de lavagem específicos para cada grupo, que consistiu na sua imersão em PBS, NaCl ou EDTA. Posteriormente, realizou-se um protocolo de descclularização comum a todos os grupos. Essa descclularização baseou-se na imersão das amostras em SDS 1% e Triton X-100 2%. Ao final do processo, às amostras foram submetidas à análise histológica em Hematoxilina-Eosina para sua avaliação e caracterização. Por meio dessa avaliação histológica foi possível notar a ausência de núcleos celulares no tecido. Além disso, não foram evidenciadas alterações na conformação das fibras de colágeno da matriz extracelular. Diante disso, pode-se concluir que o protocolo utilizado no presente estudo promoveu significativa remoção celular, indicando eficiência na descclularização sem provocar alterações estruturais no tecido.

Palavras-chave: Pele. Matriz extracelular. Biomaterial. Engenharia de tecidos. Medicina Regenerativa.

ABSTRACT

Regenerative Medicine consists of a multidisciplinary area that aims to promote the regeneration of tissues that have suffered injuries. In the case of the skin, when lesions occur that cause extensive tissue loss, one of the main forms of treatment is the use of an autologous skin graft, but it is not always possible to collect the skin for this treatment. In view of this, Tissue Engineering, a subarea of Regenerative Medicine, began to develop several methods for the production of biomaterials, such as scaffolds, that can replace the skin in these grafts. Therefore, this study aims to evaluate the effectiveness of a dog skin decellularization protocol for the production of canine dermal scaffolds. The protocol used was based on the immersion of canine skin fragments in different solutions to promote cellular tissue removal. These samples were separated into three groups and subjected to specific washing processes for each group, which consisted of immersion in PBS, NaCl or EDTA. Subsequently, a decellularization protocol common to all groups was performed. This decellularization was based on immersion of the samples in 1% SDS and 2% Triton X-100. At the end of the process, the samples were submitted to histological analysis in Hematoxylin-Eosin for evaluation and characterization. Through this histological evaluation, it was possible to notice the absence of cell nuclei in the tissue. In addition, no changes were observed in the conformation of collagen fibers in the extracellular matrix. Therefore, it can be concluded that the protocol used in the present study promoted significant cell removal, indicating efficiency in decellularization without causing structural changes in the tissue.

Keywords: Skin; Extracellular matrix; Biomaterial; Tissue engineering; Regenerative Medicine

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO E AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA.....	11
2.2	DESCELULARIZAÇÃO.....	11
2.2.1	Coleta e preparação de amostras	11
2.2.2	Lavagens	12
2.2.3	Protocolo de Descelularização	12
2.3	VALIDAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	13
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4	CONCLUSÃO.....	20
	REFERÊNCIAS	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens fotográficas de fragmentos de pele canina nativa (A e B) e fragmentos submetidos à descelularização (C e D) com solução de SDS 1% + ATB 0,5% por cinco dias e solução de Triton X-100 2% + ATB 0,5% por dois dias, sob agitação orbital a 135 rpm e em temperatura ambiente, com poste posterior lavagem em solução de PBS+ ATB 0,5%, para remoção de detergentes residuais. Epiderme nativa (A) e descelularizada (C). Derme nativa (B) e descelularizada (D)..... 15

Figura 2 - Fotomicrografias de secções histológicas (5 µm) de pele canina nativa, coradas em HE. A, Presença de filamentos de ceratina (setas) na camada mais externa da epiderme (estrato córneo), e de ceratinócitos ao longo de toda a epiderme (setas pontilhadas). Magnificação: 4X e 10X, respectivamente. 16

Figura 3 - Fotomicrografia de uma secção histológica (5 µm) de pele canina nativa, corada em HE. EP, Epiderme. DE, Derme. Na derme, presença de fibroblastos entremeados às fibras colágenas da matriz extracelular (setas), além de folículos pilosos (FP), glândulas sebáceas (GS) e vasos sanguíneos (V). Magnificação: 4X. . 16

Figura 4 - Fotomicrografia de secções histológicas (5 µm) de pele canina nativa (A e B) e descelularizadas (C e D), coradas em HE. Ausência de núcleos celulares, com preservação da estrutura da matriz extracelular..... 17

1 INTRODUÇÃO

A Medicina Regenerativa constitui uma área multidisciplinar que, dentre outros, emprega a utilização de células, fatores de crescimento e biomateriais com objetivo de reparar estruturas que, por quaisquer motivos, tenham sofrido injúrias. A Engenharia de Tecidos, subárea da Medicina Regenerativa, desenvolve biomateriais, como os *scaffolds*, aplicáveis à regeneração ou substituição desses tecidos ou órgãos lesionados (HOWARD, 2008; KATARI; PELOSO; ORLANDO, 2014).

Scaffolds, em sua concepção, são estruturas produzidas com o intuito de servir como substrato/arcabouço, em substituição à matriz extracelular (MEC) nativa, sendo capazes de interagir no processo de reparação celular local (HOWARD, 2008). Isoladamente, os *scaffolds* podem ser aplicados diretamente sobre o local em que houve uma lesão tecidual, com a finalidade de estimular a reparação local (SHAFIEE; ATALA, 2017).

Na pele, quando ocorrem lesões graves que não se regeneram facilmente, como feridas muito extensas, profundas e de difícil tratamento, preconiza-se a cobertura da lesão para promover sua recuperação (SINGER; BOYCE, 2017). Normalmente, essa cobertura terapêutica é realizada por meio da utilização de enxertos de pele autólogos, ou seja, provenientes do próprio animal e por conta disso, não provocam rejeição imunológica. Entretanto, esse tratamento é inviável para pacientes em que a lesão resultou em perdas extensas de pele, pois a falta desse tecido pode causar diversas complicações, tais como baixa vascularização tecidual, diminuição da elasticidade e sensibilidade do local, graves contraturas e cicatrizes (FARROKHI, *et al.* 2018; STOJIC, *et al.* 2019).

Diante disso, é indicada a substituição de enxertos autólogos por *scaffolds*, que além de proporcionar a cobertura da lesão, ainda permitem o crescimento de uma nova e funcional camada celular. Tais *scaffolds* podem ter origem natural e/ou sintética. Os *scaffolds* sintéticos podem ser produzidos a partir de diversos polímeros, enquanto os biomateriais naturais são provenientes de fontes biológicas, frequentemente encontradas na MEC (STOJIC, *et al.* 2019).

O uso da MEC para produção de *scaffolds* naturais, aplicáveis na Medicina Regenerativa, apresenta vantagens que sobressaem o uso desse biomaterial biológicos, principalmente devido ao fato de dispensarem os desafios tecnológicos

apresentados pelo processo de produção dos *scaffolds* sintéticos na tentativa de mimetizar as propriedades físicas e bioquímicas já apresentadas pelo tecido natural, como o arranjo estrutural da MEC, porosidade do tecido, composição molecular, propriedades biomecânicas, biocompatibilidade, entre outras (MOGASANU, GRUMEZESCU, 2014; De KEMP, et al. 2015; GHOSAL, et al. 2019).

Por já possuir essas propriedades naturalmente a MEC, após ser descelularizada, pode ser aplicada como uma estrutura indutiva, para promover resposta de remodelação específica para o tecido, pois possui capacidade para sinalizar e regular a migração celular e fornece o suporte físico adequado necessário para a diferenciação e proliferação dessas células, além de estimular a formação de tecido de granulação, reepitelização e angiogênese. Dessa forma, a utilização desses *scaffolds* derivados da MEC possibilita a reconstrução da estrutura fisiológica da pele, visando a regeneração tecidual, sem provocar a ocorrência de rejeição imunológica (BROWN; BADYLAK, 2014; PARK; HWANG; YOON, 2017).

Em consequência da crescente relevância no tratamento de lesões com os *scaffolds* biológicos, diversos métodos de descelularização vem sendo estudados para a melhor produção desses biomateriais, com o objetivo de retirar o conteúdo celular da MEC de maneira eficiente e com mínimas alterações nas atividades biológicas e propriedades biomecânicas dessa matriz (FU et al., 2014). Para tanto, já foram desenvolvidos diferentes protocolos de descelularização, incluindo métodos enzimáticos, físicos, iônicos e/ou químicos (BADYLAK *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2017).

A descelularização por métodos enzimáticos faz uso de nucleases e proteases, provocando a ruptura das ligações entre os nucleotídeos das células e remoção do conteúdo celular da MEC. Os métodos químicos são realizados por meio da perfusão ou imersão em soluções químicas, categorizadas como substâncias alcalinas, ácidas, detergentes iônicos e não iônicos. Além desses, existe grande variedade de métodos físicos disponíveis para realizar a descelularização, como congelamento, sonicação e agitação (KIM *et al.*, 2017; PREDEINA; DUKHINOVA; VINOGRADOV, 2020).

Diante disso, é de extrema importância o desenvolvimento de um protocolo de descelularização capaz de remover o material celular do tecido, para que o potencial imunogênico do enxerto seja inativado, ao passo que preserve a composição e estrutura da MEC para facilitar a adesão e proliferação de novas células e, conseqüentemente, o crescimento do novo tecido (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; GARRETA, 2017; BLAUDEZ, 2020; OLGA, 2021).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO E AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

As atividades da pesquisa foram realizadas em diferentes laboratórios multidisciplinares do Bloco de Anatomia e Patologia Veterinária da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Realeza – PR, incluindo-se o laboratório de engenharia de tecidos (sala 508), sala de histologia (sala 510) e sala de necropsia (sala 520). As atividades de pesquisa referentes ao projeto foram iniciadas somente após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFFS.

As amostras pele para uso nesta pesquisa foram aproveitadas a partir de cadáveres de cães que vieram a óbito (por causas diversas) e foram doados para uso acadêmico à SUHVU da UFFS, *Campus* Realeza - PR. Para o presente estudo não houve restrição quanto a idade, raça ou sexo, porém, foi descartada para uso a pele de espécimes apresentando afecções ou lesões nas áreas definidas para a coleta de amostras, a fim de que fossem preservadas suas propriedades teciduais, de estrutura e de arquitetura.

2.2 DESCELULARIZAÇÃO

2.2.1 Coleta e preparação de amostras

A coleta das amostras foi realizada por meio da depilação dos animais para remoção dos folículos pilosos presentes na derme e posterior dissecação da pele da região dorsal do tronco de cães, em fragmentos de 2 cm², para comporem três grupos (G1, G2, G3) compostos por 10 fragmentos de pele em cada grupo. Logo após a coleta, esses fragmentos foram lavados em água corrente para remoção de sujidades e em seguida as amostras foram submetidas a lavagem segundo protocolo estabelecido para cada grupo. Ao término da lavagem, os resquícios de epiderme remanescentes nos fragmentos de pele foram removidos mecanicamente e as amostras foram tratadas em protocolo comum de descelularização, para a obtenção

dos *scaffolds*. Para efeitos de controle, amostras de pele nativa foram separadas para comporem um quarto grupo (G4), não sendo submetidas à descelularização.

2.2.2 Lavagens

Para as amostras de G1 a lavagem foi realizada com tampão fosfato-salino [PBS; 80 g de cloreto de sódio (NaCl), 2 g de cloreto de potássio (KCl), 11,5 g de fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 2 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) em 1 L de água ultrapura; pH 7.2], contendo antibiótico (ATB 0,5%; 2 mL de sulfato de amicacina em 13 mL de água destilada), por três repetições de 15 minutos cada, em temperatura ambiente e agitação orbital (135 rpm). Para a lavagem das amostras de G2 foi utilizada solução de cloreto de sódio a 100% (supersatura) (NaCl; 58,44 g de NaCl em 1 L de água destilada; pH 7,4) com adição de ATB 0,5%, por três repetições de 15 minutos cada e posteriormente uma lavagem em PBS com ATB 0,5%, por 10 minutos, em temperatura ambiente e agitação orbital (135 rpm). Para a lavagem de G3 foi utilizada solução de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA; 186,12 g de EDTA em 1 L de água destilada; pH 8,0) com ATB 0,5%, por três repetições de 15 minutos cada e posteriormente uma lavagem em PBS com ATB 0,5%, por 10 minutos, em temperatura ambiente e agitação orbital (135 rpm).

Ao término da lavagem, as amostras foram submetidas a esterilização por luz ultravioleta (UV), com a finalidade de reduzir possíveis contaminações. Para essa etapa, as amostras de pele dos três grupos foram imersas em PBS + ATB 0,5% e submetidas a irradiação com luz UV, em câmara de fluxo laminar, por duas horas em repouso, a temperatura ambiente.

2.2.3 Protocolo de Descelularização

As amostras de pele de G1, G2 e G3 foram imersas em solução de dodecil sulfato de sódio 1% (SDS 1%; 100 g de SDS em 1 L de água destilada) contendo ATB 0,5%, sob agitação orbital (135 rpm) e em temperatura ambiente, por cinco dias. Foram realizadas duas trocas diárias da solução, a cada 12 horas. Ao término desta etapa, as amostras foram imersas em solução de Triton X-100 2% (20 mL de Triton X-100 em 980 mL de água destilada) com ATB 0,5%, sob agitação orbital (135 rpm)

e temperatura ambiente, por dois dias, para remoção do SDS residual e finalização da descelularização. Foram realizadas duas trocas de solução, a cada 12 horas. Em seguida, realizou-se uma lavagem das amostras em solução de PBS + ATB 0,5%, por 10 minutos, em temperatura ambiente e agitação orbital (135 rpm), para remoção de detergentes residuais.

Após a descelularização, realizou-se a segunda etapa de esterilização (final) das amostras, que foram novamente submetidas a imersão em PBS + ATB 0,5% e submetidas a irradiação com luz UV por duas horas em repouso, a temperatura ambiente.

2.3 VALIDAÇÃO DOS SCAFFOLDS

Após a descelularização, os *scaffolds* foram submetidos à análise histológica para observação de sua estrutura e composição, e ainda para sua validação como biomaterial acelular. O critério utilizado no trabalho para validação da descelularização foi a ausência de núcleos celulares visíveis presentes no tecido. Essa avaliação histológica foi realizada por meio da coloração em Hematoxilina-Eosina (HE).

A preparação das amostras para histologia incluiu sua fixação em paraformaldeído 4% (PFA 4%), por 72 horas, seguida de desidratação em etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 100% e 100%, 50 minutos cada), e diafanização em xilol, por 1 hora, em duas repetições. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina histológica (I), por 12 horas em estufa a 55 - 60° C. Ao término deste período, foram reincluídas em parafina (II), por mais 2 horas em estufa, para então serem incluídas em blocos de parafina (III). Os cortes histológicos (5 µm) foram confeccionados em micrótomo, e aderidos a lâminas de vidro, para posterior coloração específica e visualização/documentação fotográfica em microscopia de luz.

Para avaliação histológica dos *scaffolds* foi empregada a técnica de coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) para visualização de núcleos e avaliação estrutural geral da MEC.

Para coloração em HE, os tecidos aderidos às lâminas foram diafanizados em xilol por 5 minutos, em duas repetições. Em seguida, hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 100%, 95%, 70%, 5 minutos cada), corados em Hematoxilina por 5 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos.

Posteriormente, as amostras foram contra-coradas em Eosina por 15 segundos, lavados em água corrente, e desidratados em etanol 95% e 100% um banho e 100% por 2 minutos. Para finalizar, as lâminas foram diafanizadas em xilol por 5 minutos e lamínulas foram aplicadas sobre as lâminas para posterior análise em microscopia óptica de luz.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Macroscopicamente pode-se notar algumas mudanças na conformação morfológica das amostras após o processo de descelularização, destacando-se leve diminuição em sua consistência quando comparada com as amostras de pele nativa, além de mudanças em sua coloração, tornando-se mais claras e esbranquiçadas (Figura 1). Essas alterações são esperadas após a remoção do conteúdo celular da pele. Segundo Martins (2019), essas mudanças no tecido podem ocorrer devido à desnaturação de algumas proteínas da MEC. Resultados semelhantes foram relatados após diversos protocolos de descelularização (JANK *et al*, 2017; MARTINS, 2019; INCI, 2021).

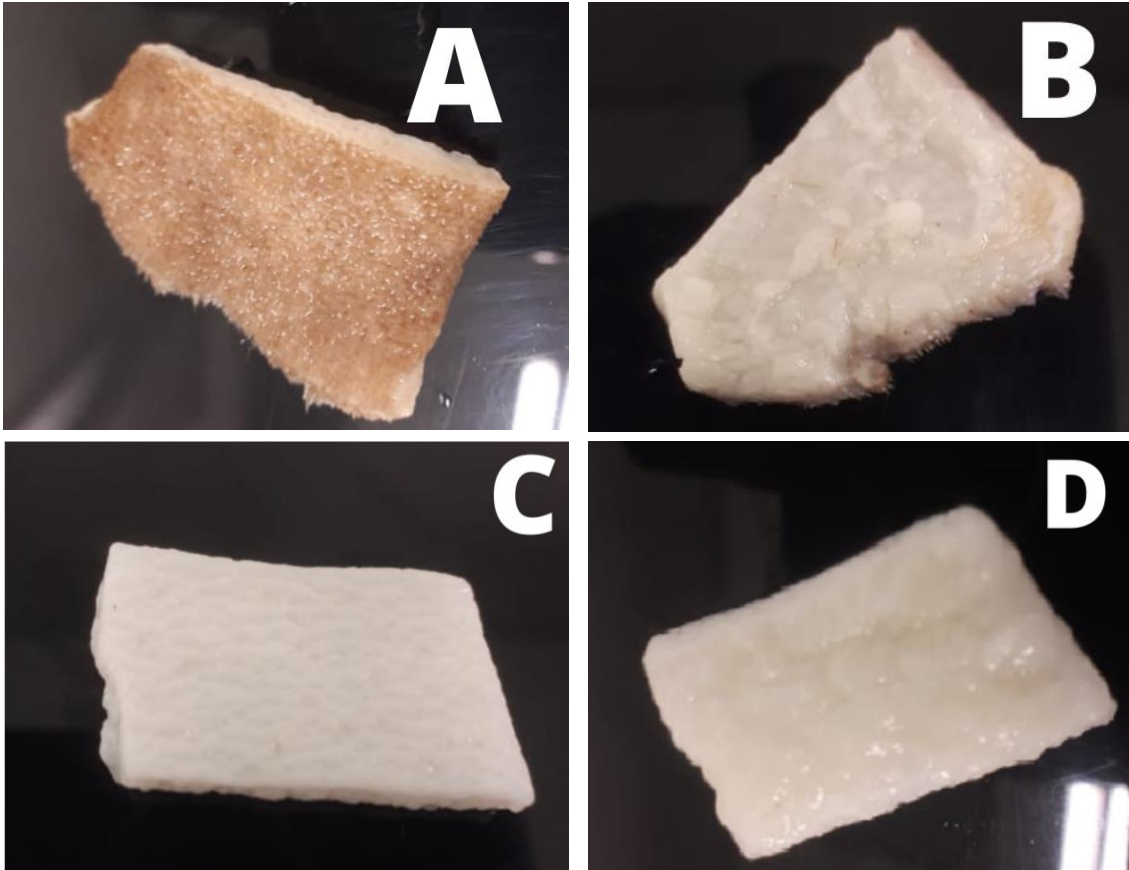


Figura 1 - Imagens fotográficas de fragmentos de pele canina nativa (A e B) e fragmentos submetidos à descelularização (C e D) com solução de SDS 1% + ATB 0,5% por cinco dias e solução de Triton X-100 2% + ATB 0,5% por dois dias, sob agitação orbital a 135 rpm e em temperatura ambiente, com poste posterior lavagem em solução de PBS+ ATB 0,5%, para remoção de detergentes residuais. Epiderme nativa (A) e descelularizada (C). Derme nativa (B) e descelularizada (D).

A avaliação histológica é de extrema importância para analisar a efetividade do processo de descelularização da pele, permitindo a avaliação da composição e arquitetura ultraestrutural do tecido. Na análise histológica da pele nativa, referente ao grupo controle, não foram observadas alterações morfológicas na sua conformação estrutural. Nota-se a presença da epiderme, composta principalmente por ceratinócitos, bem como a presença de filamentos de ceratina que compõem o estrato córneo, camada mais externa da epiderme (Figura 2). Abaixo dela encontra-se a derme, composta por tecido conjuntivo na forma de fibras de colágeno, onde estão localizados seus elementos celulares, em especial os fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Na porção dérmica também estão presentes os apêndices epidérmicos como folículos pilosos, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, além da presença dos vasos sanguíneos (Figura 3) (SOUZA *et al*, 2009).

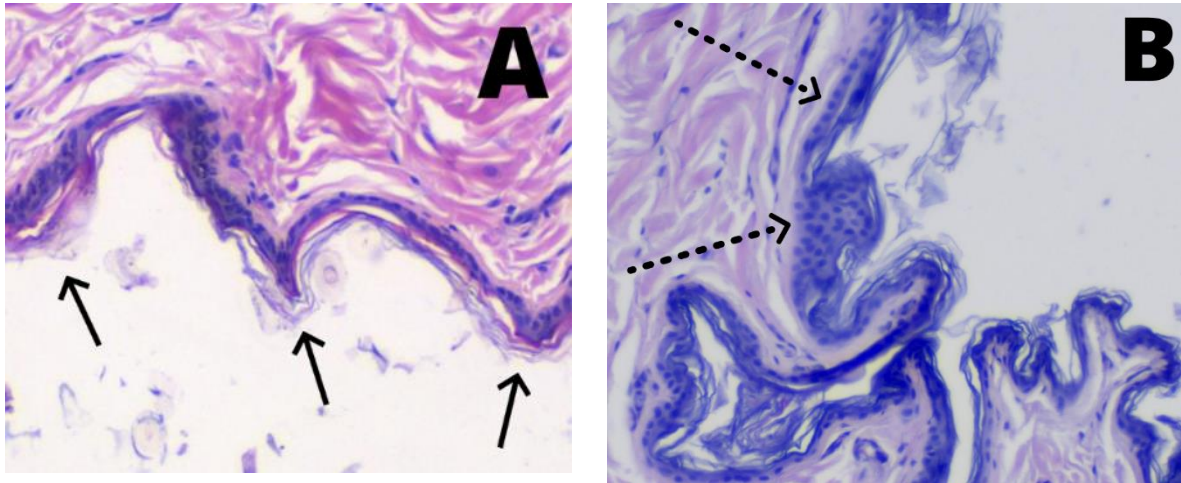


Figura 2 - Fotomicrografias de secções histológicas (5 μ m) de pele canina nativa, coradas em HE. A, Presença de filamentos de ceratina (setas) na camada mais externa da epiderme (estrato córneo), e de ceratinócitos ao longo de toda a epiderme (setas pontilhadas). Magnificação: 4X e 10X, respectivamente.

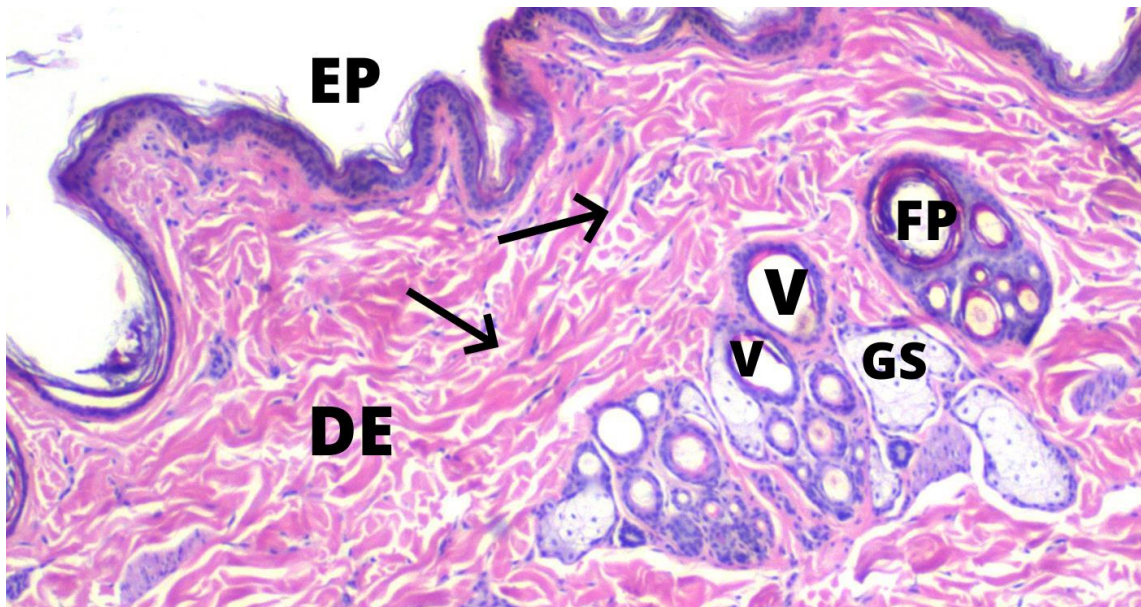


Figura 3 - Fotomicrografia de uma secção histológica (5 μ m) de pele canina nativa, corada em HE. EP, Epiderme. DE, Derme. Na derme, presença de fibroblastos entremeados às fibras colágenas da matriz extracelular (setas), além de folículos pilosos (FP), glândulas sebáceas (GS) e vasos sanguíneos (V). Magnificação: 4X.

Ao comparar a histologia da pele *in natura* com o tecido descelularizado, evidenciam-se alterações teciduais provocadas pelo processo. Não é possível observar a presença da epiderme, visto que após as lavagens parte dela se desprende do restante do tecido e seus resquícios remanescentes foram removidos

mecanicamente, antes do início do processamento. A eliminação da epiderme anterior ao processo é de grande importância para melhorar a eficácia da descelularização, uma vez que a epiderme pode atuar como barreira mecânica, dificultando a passagem dos reagentes para o tecido (CHEN, *et al.* 2004; VENTURA, *et al.* 2019). A análise histológica das amostras indicou eficiência na descelularização, uma vez que não é possível a visualização de núcleos celulares no tecido, indicando a remoção das células após o processo (MARTINS, 2019). Além disso, também é possível perceber a manutenção na conformação das fibras de colágeno da MEC, sugerindo a preservação de componentes estruturais da MEC (Figura 4).

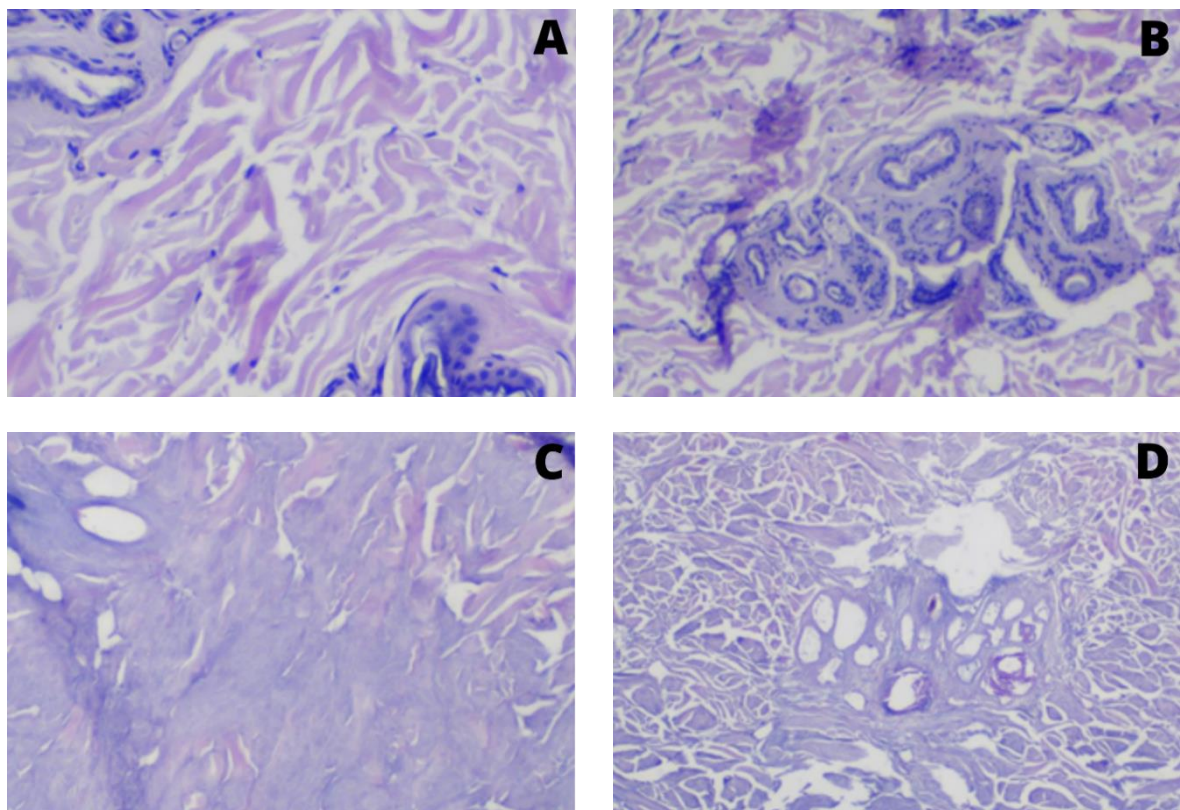


Figura 4 - Fotomicrografia de secções histológicas (5 μm) de pele canina nativa (A e B) e descelularizadas (C e D), coradas em HE. Ausência de núcleos celulares, com preservação da estrutura da matriz extracelular.

O protocolo utilizado no presente trabalho baseou-se na utilização de diferentes reagentes, principalmente detergentes iônicos e não iônicos, para obter a remoção celular da pele de cães. É amplamente relatado que a utilização de detergentes para descelularização tecidual causa menores alterações na composição da MEC em comparação com protocolos que utilizam métodos enzimáticos, sendo um método mais seguro para a preservação da MEC, porém ainda eficiente para promover remoção celular (MILAN, *et al.* 2019; INCI, 2021).

Para a realização das lavagens, foram empregadas diferentes técnicas, com a finalidade de averiguar se a inclusão de NaCl e/ou EDTA anterior à descelularização produz efeitos positivos sobre a remoção celular, quando comparado ao uso inócuo do PBS nesta fase. Entretanto, a avaliação histológica não evidenciou diferenças significativas entre a descelularização dos três grupos.

A escolha dos reagentes utilizados nessas lavagens foi baseada em soluções que poderiam auxiliar na remoção celular do processo. A utilização de NaCl, como solução hipertônica pode causar a ruptura das membranas celulares ao induzir o choque osmótico e promover a lise celular (MCCRARY, *et al.* 2020). Além disso, é relatado que soluções hipertônicas podem dissociar o DNA das proteínas (GUPTA; MISHRA, 2017). Quanto ao EDTA, sua utilização como agente quelante permite o sequestro de íons metálicos divalentes do sítio de ligação da célula, promovendo a quebra dessa adesão celular (CHAKRABORTY; ROY; GHOSH, 2020; BRANCATO, *et al.* 2020).

Entre os diversos agentes que podem ser aplicados na descelularização, os surfactantes estão entre os mais utilizados, provocando alterações na membrana fosfolipídica e, conseqüentemente, provocando a destruição celular (CUI; CHAI; YU, 2019; BRANCATO, *et al.* 2020). O SDS, caracterizado como um detergente iônico, tem sua utilização amplamente relatada por diversos autores, sendo um dos agentes químicos mais empregados em processos de descelularização para diferentes tipos de tecido (GUPTA; MISHRA, 2017; CUI; CHAI; YU, 2019, FEDONIUK, *et al.* 2021).

Foi provado que esse surfactante apresenta grande efetividade na eliminação do material genético e resíduos celulares dos tecidos, entretanto também é relatado que a utilização de altas concentrações de SDS pode danificar as proteínas estruturais e de sinalização presentes na MEC. Esse efeito deletério sobre a estrutura da matriz ocorre devido à capacidade do SDS em romper as interações entre proteínas (MCCRARY, *et al.* 2020), mecanismo responsável por quebrar as ligações entre as proteínas citoplasmáticas e as membranas celulares para promover a remoção dos resíduos celulares após a destruição das células, entretanto essa característica acaba afetando outras proteínas presentes na MEC (CHAKRABORTY; ROY; GHOSH, 2020). Portanto se faz necessária a escolha cuidadosa da concentração de SDS

utilizada, visando a obtenção da remoção celular adequada sem inviabilizar estruturalmente o scaffold (CUI; CHAI; YU, 2019).

Após a utilização de SDS, optou-se por utilizar o Triton X-100 para dar continuidade à remoção celular, além de também auxiliar na remoção de SDS residual presente nas amostras. O Triton X-100 é um detergente não-iônico, também sendo um dos agentes mais utilizados na descclularização de diversos tecidos (FARROKHI, *et al.* 2018). Detergentes não iônicos são capazes de romper as ligações entre lipídios e as ligações entre lipídios e proteínas, mantendo as ligações entre proteínas intactas e preservando a composição estrutural da MEC (GUPTA; MISHRA, 2017; CHAKRABORTY; ROY; GHOSH, 2020).

Outra vantagem se sua utilização é sua capacidade de auxiliar na remoção de outros agentes utilizados anteriormente no processo, especialmente o SDS (CHAKRABORTY; ROY; GHOSH, 2020). Apesar de relatado por diversos autores que o Triton X-100 provoca menos danos estruturais à matriz extracelular, os resultados encontrados em literatura ainda não chegam à um consenso, visto que diferentes estudos podem apresentar resultados variados com relação à efetividade de remoção celular e seus efeitos na MEC. Deve-se considerar que essas diferenças encontradas podem ser explicadas por diversos fatores que diferem entre os protocolos como o tecido a ser descclularizado, a concentração utilizada do agente, tempo de incubação e outras substâncias também utilizadas no processo (FARROKHI, *et al.* 2018).

Diante disso, ao considerar a implantação de *scaffolds*, como biomateriais para regeneração tecidual, deve-se ressaltar a importância de um protocolo de descclularização adequado, que permita a completa remoção das células do tecido, pois a permanência desses resíduos celulares no tecido pode resultar em uma resposta inflamatória exacerbada e conseqüente rejeição imunológica do transplante (JANK, *et al.* 2017). Com relação à importância da preservação da conformação estrutural e composição da MEC, é ressaltado que os componentes presentes nessa matriz, como proteínas e fatores de crescimento, realizam sinalizações moleculares para migração, adesão e proliferação celular, além de agirem como modulares do comportamento celular. Portanto, a permanência desses componentes no tecido é importante para que esses biomateriais possam ser utilizados em cultivos celulares *in*

vitro, além de permitirem adequada proliferação celular e regeneração tecidual após seu implante *in vivo* (VENTURA, *et al.* 2019).

4 CONCLUSÃO

Constatou-se, por meio de análise histológica, que o protocolo utilizado promoveu significativa remoção celular do tecido, sem evidenciar consideráveis alterações estruturais consideráveis na matriz extracelular. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento apresentaram-se promissores. Diante disso, novas análises laboratoriais, como a quantificação do DNA presente nas amostras e avaliação de sua biocompatibilidade, devem ser realizadas para que se possa validar os *scaffolds* produzidos como biomateriais acelulares e permitir sua posterior utilização em demais estudos *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- BADYLAK, S. F. *et al.* Engineered whole organs and complex tissues. **The Lancet**, v. 379, n. 9819, p. 943–952, 2012.
- BLAUDEZ, F. *et al.* An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration. **Methods**, v. 171, p. 28-40, 2020.
- BRANCATO, V. *et al.* Decellularized matrices for tumor cell modeling. **Cell-Derived Matrices - Part B**, [S.L.], p. 169-183, 2020.
- BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. **Translational Research**, v. 163, n. 4, p. 268–285, 2014.
- CHAKRABORTY, J.; ROY, S.; GHOSH, S. Regulation of decellularized matrix mediated immune response. **Biomaterials Science**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 1194-1215, 2020.
- CHEN, R. *et al.* Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 25, n. 13, p. 2679-2686, 2004.
- CUI, H.; CHAI, Y.; YU, Y. Progress in developing decellularized bioscaffolds for enhancing skin construction. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [S.L.], v. 107, p. 1849-1859, 22 abr. 2019.
- De KEMP, V. *et al.* Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2015.
- FARROKHI, A. *et al.* Evaluation of detergent-free and detergent-based methods for decellularization of murine skin. **Tissue Engineering Part A**, v. 24, n. 604, p. 955–967, 2018.
- FEDONIUK, L. Y. *et al.* MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ACELLULAR DERMAL MATRIX MANUFACTURING. **Wiadomości Lekarskie**, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 418-422, 2021.
- FU, R. *et al.* Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 2, p. 621–630, 2014.
- GARRETA, E. *et al.* Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. **Materials Today**, v. 20, n. 4, p. 166-178, 2017

GILBERT, T.; SELLARO, T.; BADYLAK, S. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, [S.L.], v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

GHOSAL, K. *et al.* Eletrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposite, **Chemical Engineering Journal**, v. 358, p. 1.262-1.278. 2019.

GUPTA, S. K.; MISHRA, N. C. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 1-10, 2017.

HOWARD, D. Tissue engineering: strategies, stem cells and *scaffolds*. **Journal of Anatomy**, Hoboken, v. 213, n. 1, p. 66-72, 2008.

INCI, I. Preparation and characterization of decellularized rooster comb as a scaffold for tissue engineering applications. **Tissue And Cell**, [S.L.], v. 73, p. 101614, 2021

JANK, B. J. *et al.* Creation of a Bioengineered Skin Flap Scaffold with a Perfusable Vascular Pedicle. **Tissue Engineering Part A**, [S.L.], v. 23, n. 13-14, p. 696-707, 2017.

KATARI, R. S.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue engineering. **Advances in Surgery**, Amsterdam, v. 48, p. 137-154, 2014.

KIM, B. S. *et al.* Decellularized extracellular matrix: A step towards the next generation source for bioink manufacturing. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, 2017.

MARTINS, A. R. **Recelularização de derme de rato Wistar**. 2019. 49 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

MCCRARY, M. W. *et al.* Decellularized tissues as platforms for in vitro modeling of healthy and diseased tissues. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 111, p. 1-19, 2020

MILAN, P. B. *et al.* Decellularization and preservation of human skin: a platform for tissue engineering and reconstructive surgery. **Methods**, [S.L.], v. 171, p. 62-67, 2020.

MOGASANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 463, p. 127-136. 2014.

OLGA, M. *et al.* Comparative analysis of the skin decellularization methods. **The Moldovan Medical Journal**, v. 64, n. 2, p. 79-86, 2021.

PARK, J.; HWANG, S.; YOON, I. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. **Molecules**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 1259, 27 jul. 2017

PREDEINA, A. L.; DUKHINOVA, M. S.; VINOGRADOV, V. V. Bioreactivity of decellularized animal, plant, and fungal scaffolds: perspectives for medical applications. **Journal Of Materials Chemistry B**, [S.L.], v. 8, n. 44, p. 10010-10022, 2020.

SHAFIEE, A.; ATALA, A. Tissue engineering: toward a new era of medicine. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 68, p. 29-40, 2017.

SINGER, A. J.; BOYCE, S. T. Burn wound healing and tissue engineering. **Journal of Burn Care and Research**, Chicago, v. 38, n. 3, p. 605–613, 2017.

SOUZA, T. M. *et al.* Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 177-190, 2009.

STOJIC, M. *et al.* Skin tissue engineering. **Biomaterials for Skin Repair and Regeneration**, [S.L.], p. 59-99, 2019.

VENTURA, R. D. *et al.* Enhanced decellularization technique of porcine dermal ECM for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, [S.L.], v. 104, p. 109841, 2019.