

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS REALEZA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO**  
**ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL**

**ANA MARIA ZENCKNER CARDINAL**

**BICOMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE *SCAFFOLDS* PLACENTÁRIOS BOVINOS EM  
CAMUNDONGOS**

**REALEZA**

**2022**

**ANA MARIA ZENCKNER CARDINAL**

**BICOMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE *SCAFFOLDS* PLACENTÁRIOS BOVINOS EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Patricia Romagnolli

**REALEZA**

**2022**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Cardinal, Ana Maria Zenckner  
BICOMPATIBILIDADE IN VIVO DE SCAFFOLDS PLACENTÁRIOS  
BOVINOS EM CAMUNDONGOS / Ana Maria Zenckner Cardinal. --  
2022.  
45 f.:il.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Patricia Romagnolli

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, N, N, 2022.

1. Engenharia de tecidos. 2. Biomateriais. 3. Testes  
in vivo. I. Romagnolli, Patricia, orient. II.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

**ANA MARIA ZENCKNER CARDINAL**

**BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE *SCAFFOLD* DE PLACENTÁRIOS BOVINOS  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em:

**BANCA EXAMINADORA**

PATRICIA

ROMAGNOLLI:01626403902

Assinado de forma digital por  
PATRICIA ROMAGNOLLI:01626403902  
Dados: 2022.11.16 14:25:23 -03'00'

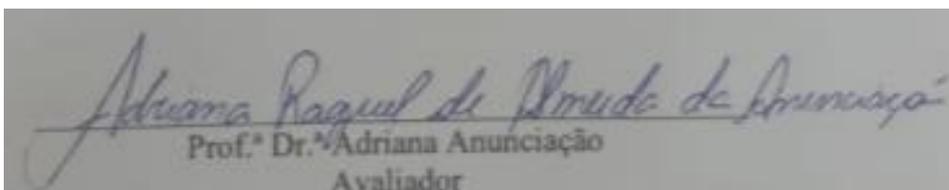
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Romagnolli – UFFS  
Orientadora

*Fabiana Elias*

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Elias  
Avaliador



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>ª</sup> Adriana Anunciação  
Avaliador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força que me deu para persistir nos meus objetivos.

À minha família, pelo apoio, paciência e carinho, durante toda minha trajetória na pós-graduação. À minha mãe, Clarice Zenckner, por sempre estar ao meu lado me incentivando a dar o melhor de mim, me inspirando a ser uma pessoa mais dedicada e melhor a cada dia. Ao meu pai, que mesmo não estando presente fisicamente neste mundo, vive em minha memória, trazendo lembranças de como ser uma pessoa dedicada e fiel aos seus objetivos. Às minhas irmãs, Larissa e Vanessa Cardinal, pelo companheirismo e puxões de orelha, sempre que necessário.

À minha orientadora Dra Patrícia Romagnolli e ao meu Co-orientador Gentil Ferreira Gonçalves por todo apoio, zelo, paciência e pela transmissão de conhecimentos fundamentais para a execução deste trabalho.

À Universidade Federal da Fronteira Sul por conceder suporte para que este projeto pudesse ser realizado.

Ao técnico de laboratório Leonardo Gruchouskei pelo papel fundamental adotado na execução deste projeto, que não mediu esforços para passar seus conhecimentos e me ensinar mais sobre as diferentes técnicas histológicas.

Aos meus colegas do laboratório de Engenharia de Tecidos que se fizeram presente nas diferentes etapas do projeto, me auxiliando em diferentes atividades, sem vocês teria sido muito mais difícil. Um agradecimento especial ao meu colega e amigo Rafael Luan Perin, que não mediu esforços para me auxiliar em tudo o que precisei desde o início da pesquisa, e que de um colega se tornou um grande amigo.

Por fim, obrigada a todos que fizeram parte desta minha trajetória intensa pela ciência.

Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós. Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos, de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram, vivem ou viveram as suas vidas. Toda a nossa mistura de alegria e sofrimento, todas as inúmeras religiões, ideologias e doutrinas econômicas, todos os caçadores e saqueadores, heróis e covardes, criadores e destruidores de civilizações, reis e camponeses, jovens casais apaixonados, pais e mães, todas as crianças, todos os inventores e exploradores, professores de moral, políticos corruptos, “superastros”, “líderes supremos”, todos os santos e pecadores da história da nossa espécie, ali – num grão de poeira suspenso num raio de sol (SAGAN, 1994, não paginado).

## RESUMO

Os *scaffolds* de matriz descelularizada podem ser utilizados em Medicina Regenerativa como estratégia terapêutica de regeneração ou substituição de tecidos e órgãos. A utilização destes biomateriais têm alcançado resultados positivos, dada as vantagens biológicas intrínsecas à sua origem. Um dos principais desafios é a limitação de fontes para sua produção, o que em certa medida inviabiliza sua utilização em larga escala. Nesse sentido, pesquisadores têm buscado alternativas com maior disponibilidade, como os anexos fetais. Entre estes, destacam-se os *scaffolds* derivados de cotilédones bovinos, que após a descelularização mantém a integridade estrutural e grandes concentrações de matriz extracelular. Apesar de apresentarem-se como alternativas promissoras aos propósitos da engenharia de tecidos, ainda são necessários estudos mais detalhados de sua aplicação *in vivo* e da interação com o hospedeiro. Sendo assim, o presente projeto testou pré-clinicamente, em camundongos (*Mus musculus*), linhagem *swiss*, a reação inflamatória tecidual e a deposição de colágeno na interface entre tela subcutânea e biomaterial. As análises foram dadas através da avaliação macroscópica do local de implantação nos dias pré-determinados de eutanásia e de avaliação. Após avaliação geral da estrutura macroscópica e da reação inflamatória, foi possível observar com este estudo que o *scaffold* de placenta bovina é uma alternativa promissora para a engenharia de tecidos, visto que não ocasionou rejeição tecidual, podendo ser utilizado como biomaterial para reconstrução de tecidos.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos. Biomateriais. Testes *in vivo*.

## ABSTRACT

Decellularized matrix scaffolds can be used in Regenerative Medicine as a therapeutic strategy for tissue and organ regeneration or replacement. The use of these biomaterials has achieved positive results, given the biological advantages inherent to their origin. One of the main challenges is the limitation of sources for its production, which to a certain extent makes its use on a large scale unfeasible. In this sense, researchers have sought alternatives with greater availability, such as fetal attachments. Among these, scaffolds derived from bovine cotyledons stand out, which after decellularization maintain structural integrity and high concentrations of extracellular matrix. Despite presenting themselves as promising alternatives for tissue engineering purposes, more detailed studies of their *in vivo* application and interaction with the host are still needed. Therefore, the present project pre-clinically tested, in mice (*Mus musculus*), Swiss strain, the tissue inflammatory reaction and collagen deposition at the interface between subcutaneous tissue and biomaterial. Analyzes were performed through macroscopic assessment of the implantation site on predetermined euthanasia and assessment days. After a general evaluation of the macroscopic structure and the inflammatory reaction, it was possible to observe with this study that the bovine placenta scaffold is a promising alternative for tissue engineering, since it did not cause tissue rejection, and can be used as a biomaterial for tissue reconstruction.

Keywords: Tissue engineering. Biomaterials. *In vivo* tests.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Aplicação de medicação pré-anestésica via intraperitoneal em camundongo. .... 18
- Figura 2. Sistema de indução anestésica modificado para camundongos. .... 19
- Figura 3. Fotografia da região de implantação do biomaterial. A letra (A) refere-se ao momento antes da implantação do biomaterial, observando-se nesta imagem a pele do animal íntegra. A letra (B) remete o terceiro dia pós implantação, na qual pode ser observada a lesão causada pela incisão no início da cicatrização. Letra (C), sete dias pós implantação, observa-se gradual diminuição da ferida. Letra (D), quinze dias pós implantação, ainda há presença de pequena ferida. Letra (E), trinta dias pós implantação, na qual observa-se ausência de ferida. Letra (F), sessenta dias pós implantação, mostrando completa cicatrização. .... 24
- Figura 4. Imagens fotográficas de peças de pele e tela subcutânea, após remoção em bloco dos animais (camundongos Swiss). As imagens das letras (A, B, C, D e E) indicam o grupo de implantação dos biomateriais placentários bovinos. As imagens de número (1, 2, 3, 4 e 5) indicam o grupo controle. .... 25
- Figura 5. Fotomicrografia da pele e tela subcutânea de camundongos coradas em H&E(A, C, D e E) e *Tricromo de Masson* (B e F), do terceiro ao décimo quinto dia de implantação de biomateriais placentários bovinos, na região cervico-escapular do antímero direito (A, C e E). No antímero esquerdo, grupo controle, sem biomaterial (B, D e F) referem-se ao lado esquerdo. Em A, B e F, a epiderme (EP), derme (DE) e tela subcutânea (TS) bem demarcadas, com evidência de folículos pilosos na tela subcutânea (TS) em B. Em C, células inflamatórias circundando as fibras colágenas (FC) do implante. Em D, glândulas sudoríparas (GS), glândulas sebáceas (GSE) na derme, e em E presença de células inflamatórias na tela subcutânea. A e B = 4x; C e D = 10x; E e F = 40x. .... 43
- Figura 6. Fotomicrografia da pele e tela subcutânea de camundongos coradas em H& E (A, B, D e E) e *Tricromo de Masson* (C, F), do terceiro ao décimo quinto dia de implantação de biomateriais placentários bovinos, na região cervico-escapular do antímero direito (A, C e E). No antímero esquerdo, grupo controle, sem biomaterial (B, D e F) referem-se ao lado esquerdo.

Em A, B, C e D observar a epiderme bem demarcada (EP), derme (DE) e a tela subcutânea (TS). Em B, derme (DE) com glândula sudorípara (GS) evidente. Em C, na tela subcutânea (TS), presença de células inflamatórias circundando as fibras colágenas (FC) do implante. Em D, derme (DE) com folículos pilosos (FP) e glândulas sudoríparas (GS). Em E, na tela subcutânea (TS) há presença de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular. Em F, epiderme (EP) e derme (DE) bem demarcadas. A e B = 4x; C e D = 10x; E e F = 40x. ....44

Figura 7 Fotomicrografia da pele e tela subcutânea de camundongos coradas em H&E(A, B, C, D e E) e *Tricromo de Masson* (F), do terceiro ao décimo quinto dia de implantação de biomateriais placentários bovinos, na região cervico-escapular do antímero direito (A, C e E). No antímero esquerdo, grupo controle, sem biomaterial (B, D e F) referem-se ao lado esquerdo. Em A, B e D observar epiderme (EP), derme (DE) e a tela subcutânea (TS) bem demarcadas. Em C, ausência de células inflamatórias na tela subcutânea (TS), a presença de glândula sudorípara (GS) e glândula sebácea (GSE) na derme (DE), epiderme (EP) bem demarcada. Em E, na tela subcutânea (TS) há predominância de fibroblastos auxiliando na deposição de matriz extracelular e ausência de células inflamatórias. Em F, epiderme (EP) e derme (DE) evidenciadas. A e B = 4x; C e D = 10x; E e F = 40x. ....45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intensidade da inflamação com avaliação de polimorfonucleares e mononucleares observados no processo de reparação tecidual no local de implantação do biomaterial, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós implantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de células inflamatórias; o escore “1” para quantidade discreta de células e sem formação de grandes aglomerados; o escore “2” para moderada quantidade de células formando agregados pouco concentrados; o escore “3” para acentuada quantidade de células formando agregados muito concentrados e coalescentes em grande parte do tecido avaliado.....26

Tabela 2. Intensidade da inflamação com avaliação de polimorfonucleares e mononucleares observados no processo de reparação tecidual no grupo controle, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós impantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de células inflamatórias; o escore “1” para quantidade discreta de células e sem formação de grandes aglomerados; o escore “2” para moderada quantidade de células formando agregados pouco concentrados; o escore “3” para acentuada quantidade de células formando agregados muito concentrados e coalescentes em grande parte do tecido avaliado.....27

Tabela 3. Deposição de colágeno observada na transição da derme e tela subcutânea no local de implantação do biomaterial, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com *Tricromo de Masson*. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós implantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de fibroblastos; o escore “1” para quantidade discreta de células; o escore “2” para moderada quantidade de células; o escore “3” para acentuada quantidade de células do tecido avaliado. ....29

Tabela 4. Deposição de colágeno observada na transição da derme e tela subcutânea no local do grupo controle, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com *Tricromo de Masson*. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós impantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de fibroblastos; o escore “1” para quantidade discreta de células; o escore “2” para moderada quantidade de células; o escore “3” para acentuada quantidade de células do tecido avaliado.....30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAM	Concentração alveolar mínima
CR	<i>Crown-rump</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EtO	Óxido de etileno
GAGs	Glicosaminoglicanos
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genômico
HE	Hematoxilina Eosina
MN	Mononuclear
MEC	Matriz extracelular
PAA	Ácido peracético
PBS	Solução tampão fosfato
PFA	Parafomaldeído gDNA
PM	Polimorfonuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SUHVU	Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária
TCA	Tecido conjuntivo adjacente
TE	Engenharia de Tecidos
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Engenharia de tecidos e medicina regenerativa.....	7
2.2 Resposta inflamatória e cicatrização .....	8
2.3 Pele e matriz extracelular .....	10
2.4 <i>Scaffold</i> .....	11
2.5 Biomateriais e biocompatibilidade .....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 <i>Scaffold</i> .....	17
3.2 Animais.....	17
3.3 Procedimento de implantação.....	18
3.4 Eutanásia.....	19
3.5 Coleta e preparo histológico .....	20
3.6 Análise macroscópica .....	21
3.7 Análise histológica .....	21
3.8 Análise estatística .....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>33</b>
<b>6. APÊNDICE .....</b>	<b>43</b>
APÊNDICE 1 .....	43
APÊNDICE 2 .....	44
APÊNDICE 3 .....	45
ANEXO 1 CERTIFICADO CEUA.....	46

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a abordagem terapêutica para reparar, regenerar ou substituir tecidos ou órgãos danificados por doenças ou lesões evoluíram, desenvolvendo um campo biomédico denominado de engenharia de tecidos em que células, *scaffolds* e outras moléculas biologicamente ativas são combinadas a tecidos e órgãos funcionais (KATARI *et al.*, 2015).

A engenharia de tecidos com *scaffolds* oferece novas perspectivas para a cicatrização de feridas. Esses suportes biológicos produzidos a partir de matriz extracelular (MEC) de diferentes tecidos, têm sido utilizados para auxiliar no reparo de feridas (FREYTES *et al.*, 2008). São preparados a partir da descclularização de tecidos como o musculoesquelético (BADYLAK *et al.*, 1999), miocárdico, (WANG *et al.*, 2016), pulmonar (POULIOT *et al.*, 2016), tecido do cordão umbilical (KOČÍ *et al.*, 2017), das vias urinárias (FREYTES *et al.*, 2008), nervos periféricos (NAGAO *et al.*, 2011), dura-máter e derme (WOLF *et al.*, 2012), placenta (BADYLAK *et al.*, 2011; REING *et al.*, 2009), entre outros.

A área de engenharia de tecidos fornece uma estratégia terapêutica que pode ser utilizada em medicina regenerativa (RODRIGUEZ-VASQUEZ *et al.*, 2015). Suas abordagens envolvem uma combinação de células, *scaffolds* e fatores de crescimento, utilizados individualmente ou em conjunto. Entre estes, destacam-se os *scaffolds*, que possuem papel vital nos processos de adesão, proliferação e crescimento celular (SARA *et al.*, 2018; RIBEIRO, 2019). A obtenção de matriz extracelular (MEC) por meio da descclularização de tecidos e órgãos é uma tecnologia recente para a produção de biomateriais (TEODORI *et al.*, 2014). A utilização destes tem obtido resultados satisfatórios (SYED *et al.*, 2014) isto porque, *scaffolds* que são derivados de tecidos naturais (SCHNEIDER *et al.*, 2016), têm demonstrado potencial de auxiliar na construção de diversos e complexos tecidos, em estudos pré-clínicos e clínicos (XU *et al.*, 2015).

Os materiais biológicos, como os *scaffolds*, podem ser derivados de matriz extracelular. A MEC é referida como componente não celular que está presente em todos os tecidos e órgãos, possui diferentes proteínas e polissacarídeos que fornecem estruturas físicas essenciais para os constituintes celulares, inicia pistas bioquímicas e biomecânicas necessárias para a morfogênese, diferenciação e homeostase dos tecidos (KULAR; BASU; SHARMA, 2014). A MEC, independentemente da espécie, é composta principalmente de proteínas colágenas, não colágenas e glicosaminoglicanos. A sua composição microestrutural difere de acordo com alguns fatores como, o tipo de tecido, espécie em que o mesmo foi coletado e a idade do animal

(CORNWELL et al., 2009). A MEC estabelece uma relação dinâmica entre suas macromoléculas e a população celular do tecido (BADYLAK et al., 2011).

Diferentemente dos materiais da engenharia de tecidos que são projetados artificialmente e não refletem totalmente uma estrutura complexa e a química do microambiente celular visto *in vivo*, os materiais biológicos a partir de MEC representam estruturas muito semelhantes às do tecido hospedeiro não lesionado. Apresentando muitas vantagens, como uma estrutura tridimensional (3D), composição natural complexa, retenção de fatores de crescimento e propriedades bioativas, incluindo estimulação da formação de novos vasos, modulação de resposta imune, migração de células progenitoras endógenas (BUWALDA et al., 2014; WOLF et al., 2012). Essas propriedades garantem a remodelação funcional do tecido lesionado, fazendo com que haja formação de tecido cicatricial, que é o que normalmente ocorre durante uma cicatrização sem o uso de implantes (WOLF et al., 2012).

O desafio mais atual é que os *scaffolds* tenham propriedades de “imitar” física, química e biologicamente o tecido “hospedeiro”. (VIJAYAN et al., 2019; GHOSAL et al., 2019). Exemplos dessas propriedades são o arranjo estrutural da matriz extracelular, interconectividade de poros, composição química, funcionalidade mecânica e estabilidade estrutural, assim como biocompatibilidade e vascularização (MOGASANU; GRUMEZESCU, 2014; CHAUDHARI et al., 2016; GHOSAL et al., 2019). Um *scaffold* produzido a partir de cotilédones placentários de bovinos demonstrou manutenção estrutural das fibras colágenas, indicando que pode-se constituir em suporte celular adequado em implantes (BARRETO et al., 2017).

Pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de se conseguir um material totalmente compatível com os tecidos orgânicos. O estudo da interação implante-hospedeiro permitirá identificar respostas imunes do receptor e avaliar a possibilidade de empregar o material na produção de biomateriais passíveis de serem utilizados pela engenharia de tecidos e pelas ciências biomédicas na substituição de estruturas do organismo que, por quaisquer motivos, estejam com sua funcionalidade prejudicada (ANDREWS, 2003).

É indispensável, antes da indicação do uso de *scaffolds*, sua validação em relação aos fatores acima descritos. Dentre esses fatores, a biocompatibilidade do material *in vivo* é um teste pré-clínico importante, mesmo antes da repopularização celular do *scaffold*. A pesquisa em animais *in vivo* ajuda a prever os possíveis danos imunológicos e tóxicos que podem ser encontrados após a implantação do biomaterial. A resposta *in vivo* do organismo acerca dos

biomateriais pode ser aguda ou crônica, sendo que estas dependerão de fatores relacionados a propriedade do biomaterial implantado, como o tamanho, morfologia, composição, estabilidade mecânica, duração de contato e degradação (ONUKE *et al.*, 2008).

Este projeto visou testar pré-clinicamente, em camundongos (*Mus musculus*), linhagem *swiss*, a reação inflamatória e incorporação tecidual de *scaffold* produzido a partir de placenta bovina. Em pesquisas futuras pretende-se desenvolver um implante biológico a ser recelularizado com células mesenquimais diferenciadas autólogas do receptor que, posteriormente, será implantado para os fins da medicina regenerativa.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Engenharia de tecidos e medicina regenerativa

Em 1993, Robert Langer e Joseph Vacanti definiram a engenharia de tecidos (TE) como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e da ciência para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido ou um órgão inteiro” (LANGER; VACANTI, 1993). Por outro lado, a medicina regenerativa tem sido definida como “o processo de substituir ou regenerar células, tecidos ou órgãos para restaurar ou estabelecer sua função normal” (GIRARD *et al.*, 2016),

Embora a Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos tenham sido tratadas primordialmente como sinônimos, a primeira constitui uma área multidisciplinar que, dentre outros, emprega células, fatores de crescimento e demais técnicas e produtos da Engenharia de Tecidos, uma de suas subáreas, com objetivo de reparar estruturas que, por quaisquer motivos, tenham sofrido injúrias. Juntas, a Engenharia de Tecidos e a Medicina Regenerativa objetivam desenvolver materiais e técnicas biocompatíveis, aplicáveis à regeneração de tecidos ou órgãos que tenham sofrido algum tipo de lesão celular, e por meio de abordagens terapêuticas inovadoras, dentre as quais, as que incluam o uso de *scaffolds*, fatores de crescimento e produção de células (FERREIRA, 2017).

A engenharia de tecidos tem apresentado desenvolvimento na área da pesquisa científica, principalmente pela busca de substitutos de tecidos e órgãos lesionados por doença ou trauma (SANTOS JUNIOR, 2007). Um dos campos de pesquisa da engenharia de tecidos é a busca de substitutos para a pele, sendo que uma das principais preocupações no cuidado de pacientes que tiveram grandes comprometimentos teciduais é o rápido fechamento da ferida (WOLF *et al.*, 2012). A gravidade do ferimento pode exigir o transplante de pele autóloga (YU *et al.*, 2016), que por sua vez se torna quase impossível quando o defeito ultrapassa 50-60% da área de superfície total do corpo, já que nesta condição não há material suficiente disponível para ser transplantado (GIRARD *et al.*, 2016), e mesmo quando a técnica é possível, o paciente enfrenta um longo processo de cicatrização (GIRARD *et al.*, 2016). Em vista disso o desenvolvimento de materiais que possam ser usados como substitutos teciduais tem aumentado, com o objetivo principal de ser uma alternativa ao uso dos enxertos autógenos e transplantes (PISKIN *et al.*, 2009).

Diversas classes de materiais têm sido pesquisadas e utilizadas pela engenharia de tecidos no desenvolvimento de novos biomateriais. Materiais sintéticos como metais, cerâmicas, polímeros e híbridos, assim como materiais naturais, principalmente derivados de matriz extracelular (FERREIRA, 2017).

## **2.2 Resposta inflamatória e cicatrização**

As feridas são definidas como ruptura da integridade de qualquer tecido ou célula, devido a problemas mecânicos, físicos ou até mesmo lesões relacionadas com o metabolismo. Em resposta a essas feridas, a primeira tentativa do organismo é conter a hemorragia para evitar perda excessiva de sangue e prevenir infecções. A cicatrização de feridas é caracterizada por diferentes processos, sendo estes, o estágio inflamatório, a fase proliferativa, a fase de maturação e por fim, a fase cicatricial (SHEVCHENKO *et al.*, 2010). O estágio inflamatório é caracterizado basicamente por um infiltrado de leucócitos e de macrófagos e pela produção de citocinas. Na fase proliferativa há a remoção de tecidos danificados e formação de um tecido de granulação, já na fase de maturação, a matriz extracelular produzida pelo tecido se torna bem definida e, portanto, ocorre a cicatrização, que é o estágio final (GREENWOOD *et al.*, 2006).

A inflamação é dada por uma sequência de eventos que ocorrem após um dano tecidual ou identificação de antígenos pelo sistema imune. Sua função é de neutralizar, conter, bloquear ou diluir o agente que esteja causando essa lesão. Uma das etapas do processo inflamatório, conhecida como inflamação aguda, ocorre por meio da exsudação de fluídos, proteínas e emigração de leucócitos (principalmente neutrófilos) podendo perdurar de minutos a poucos dias (GALLIN, 1999). Outra etapa do processo inflamatório é a inflamação crônica que, por sua vez, pode perdurar até meses. Esta pode ser caracterizada pela presença de macrófagos, monócitos e leucócitos, com proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1999).

A inflamação crônica também conta com a participação de células mononucleares, incluindo linfócitos. A participação destes na resposta inflamatória ao implante, bem como sua interação com outras células durante a resposta à biomateriais é amplamente desconhecida. No entanto, é aceito com normalidade a presença dessas células durante o processo de cicatrização. Após a chegada dos macrófagos ocorre também a proliferação de fibroblastos e a fase de neovascularização, que dão origem ao tecido de granulação, uma das principais características da inflamação crônica. Após isso, uma vez mantido o estímulo inflamatório (presença do implante), pode-se iniciar uma resposta de corpo estranho, caracterizada pela fusão de

macrófagos para formação de células-gigantes. Por fim, o processo encerra com a formação de cápsula fibrosa, que isolará o biomaterial do restante do organismo (ANDERSON, 2009).

A proliferação de fibroblastos e de novos vasos sanguíneos caracterizam histologicamente um tecido de granulação, que pode ser visto no início da inflamação quanto três a cinco dias após a lesão. Os fibroblastos são capazes de proliferar no tecido de granulação e de sintetizar colágenos e proteoglicanos, importantes na remodelação do tecido. A angiogênese envolve a proliferação, maturação e organização de células endoteliais em tubos capilares (GALLIN; SYNDERMAN, 1999).

Na literatura, três eventos celulares principais são apontados na ocorrência de injúria ao tecido animal, e que juntos podem promover reação inflamatória sistêmica: a) trombose; b) liberação de fatores inflamatórios; c) liberação de fatores pró-apoptóticos. O tecido lesado, ainda, libera padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como citocinas, componentes mitocondriais e oxidantes, que estimulam a produção de mediadores inflamatórios, principalmente TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , e CXCL8 (TIBBITT *et al.*, 2015). A liberação destas substâncias durante a resposta inflamatória aumenta a permeabilidade capilar, e permite a saída de líquidos do meio intracelular para o interstício. (GREENWOOD, 2018).

Na pele, em especial, quando ocorrem lesões como queimaduras por exemplo, o mecanismo de resposta celular, aliado ao estado geral do paciente, tende a piorar nas primeiras horas após o incidente, preconizando medidas de cuidados iniciais logo após a ocorrência da lesão, incluindo rápido fechamento da ferida (MARTINS *et al.*, 2020). Normalmente, essa cobertura terapêutica é realizada por meio da utilização de enxertos de pele autólogos, ou seja, provenientes do próprio animal. Entretanto, esse tratamento é inviável para pacientes em que a lesão resultou em perdas extensivas de pele, pois a falta desse tecido no receptor pode causar diversas e severas complicações, tais como baixa vascularização, diminuição da elasticidade e sensibilidade, graves contraturas e severas cicatrizes (FARROKHI *et al.*, 2018). Além disso, mesmo quando o enxerto de pele autólogo é possível, o paciente enfrentará um longo processo de cicatrização (GIRARD *et al.*, 2016).

Diante disso, é indicada a substituição de enxertos autólogos por scaffolds biológicos, cuja estrutura tridimensional é composta por MEC descelularizada, que além de proporcionar a cobertura da lesão, ainda permite o crescimento de uma nova e funcional camada celular. Isso é possível uma vez que a MEC pode ser aplicada como uma estrutura indutiva, para promover resposta de remodelação específica para o tecido, pois além de fornecer substâncias que auxiliam na cicatrização, possui capacidade para sinalizar e regular a migração celular e fornece

suporte físico necessário para a diferenciação e proliferação dessas células, possibilitando a reconstrução da estrutura fisiológica da pele (BADYLAK, 2014).

### **2.3 Pele e Matriz Extracelular**

As lesões cutâneas são normais para todas as espécies, independentemente do sexo ou idade. A pele, o maior órgão do corpo, funciona como uma barreira primária às agressões químicas, físicas e biológicas do meio ambiente. Nos animais, essas lesões podem ser decorrentes de lutas e/ou predações, assim como em humanos, existe uma causa muito comum de lesões causadas por queimaduras e carcinomas. Em busca de novas técnicas de bioengenharia de tecidos, estudos têm demonstrado resultados promissores para formulações de scaffolds biológicos acelulares a partir da descelularização de tecidos para a reconstituição dessas lesões (MARTINS *et al.*, 2020).

Em sua estruturação morfológica, a pele é um órgão composto por duas camadas, sendo a epiderme a externa, e a derme sua camada interna. No todo, diversos tipos celulares estão relacionados entre si na conformação do arcabouço estrutural da pele, sendo os ceratinócitos e os fibroblastos os mais representativos (SERRA *et al.*, 2006). As estruturas que compõem a pele possuem origens embrionárias distintas, sendo a epiderme derivada do ectoderma e a derme originada do mesoderma (GREENWOOD, 2018). A epiderme é constituída por quatro tipos celulares: os melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel e os ceratinócitos, sendo que os ceratinócitos representam cerca de 85% da população celular epidérmica (SOUZA *et al.*, 2010). Epiderme e derme estão separadas por uma membrana basal cuja MEC é rica em colágeno do tipo IV e laminina. A derme, onde estão localizados encontrados, dentre outros, vasos sanguíneos, linfáticos, músculos lisos e nervos, é constituída de tecido conjuntivo e pode ser subdividida em camadas, superficial e profunda (SOUZA *et al.*, 2010). Dentre a população celular da derme predominam fibroblastos, que respondem pela formação de fibrilas dérmicas, colágenas ou elásticas, e estão distribuídos em suas subcamadas papilar (superficial) e reticular (profunda) (SOUZA *et al.*, 2010).

As pesquisas relacionadas à criação de substitutos de pele avançaram muito nas últimas décadas, entretanto, o substituto ideal ainda não foi desenvolvido. Os experimentos concentraram-se em componentes isolados da pele. É preciso reunir o conhecimento já produzido em técnicas que incorporem os diversos constituintes: *scaffolds*, fatores de crescimento e células (GATTAZO; URCIUOLO; BONALDO, 2018).

Com relação a Matriz Extracelular (MEC), esta conforma o ambiente tridimensional de cada tecido, e é preenchido por células. A MEC é composta por moléculas de função estrutural e funcional, que são secretadas por células residentes no tecido (BADYLAK, 2014). A MEC pode ser dividida em intersticial, encontrada em tecido conjuntivo, e pericelular quando circunda as células. Além de fornecer suporte físico para as células, a MEC define a força de tensão e a flexibilidade da pele, e responde por diversos estímulos bioquímicos e biomecânicos para manter a homeostase do tecido (FERREIRA, 2017). A matriz ainda possui em sua composição glicosaminoglicanos (GAGs) e proteínas fibrosas (KIM *et al.*, 2017). As GAGs são responsáveis pela difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios para as células e por controlar processos celulares. As GAGs também se ligam a proteínas para formar proteoglicanos, que regulam a atividade de proteínas secretadas como enzimas proteolíticas ou inibidores de protease. Já as proteínas fibrosas da MEC são representadas por colágenos, laminina e fibronectina, que respondem pela organização estrutural e propriedades físicas da MEC (KIM *et al.*, 2017). A diversidade de sua composição fornece à MEC suas propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas. Dentre as propriedades físicas da MEC, incluem-se: insolubilidade, porosidade, rigidez e topografia, agindo em diversas funções biológicas como a adesão e multiplicação celular. As propriedades bioquímicas da matriz permitem que a MEC realize, direta e indiretamente, sinalizações celulares para fatores de crescimento (GATTAZZO; URCIUOLO; BONALDO, 2014).

## 2.4 Scaffold

*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). Quando é necessário transplante de órgãos e tecidos, uma série de problemas são considerados, como a necessidade de conseguir órgãos fisiologicamente viáveis para o transplante, além da terapia imunossupressora, potencialmente perigosa, a qual os pacientes devem ser submetidos ao longo da vida, culminando em riscos como o desenvolvimento de doenças, ou até mesmo a rejeição aguda ou crônica do órgão (BADYLAK *et al.*, 2012).

Diante disso, avanços na engenharia de tecidos e medicina regenerativa estabeleceram métodos para a utilização de arcabouços compostos pela MEC, obtidos pela descélularização de um tecido. Esses arcabouços são conhecidos como *scaffolds*, e podem ser utilizados como estruturas indutivas, promovendo resposta de remodelação do tecido após lesão. Além disso,

sua subsequente recelularização com células autólogas do receptor evitam a necessidade de imunossupressão após o transplante (BADYLAK *et al.*, 2012).

A descelularização é um processo de remoção das células e é uma etapa de extrema importância, pois a falha na remoção de restos celulares pode gerar uma resposta pró-inflamatória, o que poderia interferir de forma estrutural e funcional no órgão ou tecido descelularizado. Portanto, para que esse processo seja adequado para a produção de *scaffolds*, é necessário a aplicação de métodos que possam, não apenas promover a remoção da população celular, mas também restringir mudanças na estrutura e composição da matriz. Para tanto, já foram desenvolvidos diversos protocolos, que podem ser enzimáticos, físicos, iônicos e/ou químicos (BADYLAK *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2017).

A descelularização por métodos enzimáticos faz uso de nucleases, proteases e agentes quelantes para a remoção ou separação de debris da MEC (KIM *et al.*, 2017). Os métodos químicos são realizados através da perfusão ou imersão em soluções químicas, que são categorizadas como substâncias alcalinas, ácidas, detergentes iônicos e não iônicos (KIM *et al.*, 2017). Existe grande variedade de métodos físicos disponíveis para descelularização, como congelamento, pressão, osmose, sonicação e agitação (KIM *et al.*, 2017). A esterilização é requisito fundamental para o processamento e futuro potencial de uso de biomateriais, uma vez que elimina seus microrganismos. Caso a esterilização não seja eficiente, diversos problemas podem ser gerados como a inativação incompleta de microrganismos, resíduos tóxicos e mudanças nas propriedades dos *scaffolds* (DAI *et al.*, 2015). Vários métodos de esterilização já foram criados, como o tratamento térmico, irradiação e químico. Os principais métodos de tratamento térmico são a esterilização a vapor e a esterilização por calor seco. Nos métodos de irradiação podem ser utilizados, por exemplo, irradiação gama, feixe de elétrons e a irradiação com luz ultravioleta (UV). Já a esterilização química inclui a utilização de diversas substâncias, como o óxido de etileno (EtO), etanol, iodo e o ácido peracético (PAA) (DAI *et al.*, 2015).

Os melhores tipos de *scaffolds* não são aqueles produzidos artificialmente, mas sim os provenientes da MEC do tecido em seu estado nativo. No entanto, mesmo com a vantagem de não haver a necessidade de recriar todas as condições da matriz, a utilização desses *scaffolds* ainda apresenta limitações devido à dificuldade de manter suas propriedades estruturais inalteradas após o processo de descelularização (FRANCIPANE, 2016). A produção de *scaffolds* a partir de pele deve considerar a necessidade de serem obtidos produtos que simulem a MEC nativa e possibilitem a migração fibroblástica. O *scaffold* ideal deve possuir resistência para suportar até quatro semanas em meio de cultura em 37° C, e permitir a semeadura de

células (GREENWOOD, 2018). Por fim, nos últimos anos foram desenvolvidos diversos métodos de avaliação das estruturas celulares por meio de diferentes técnicas de observação, para facilitar esse processo (DAI *et al.*, 2015). A aplicação desses métodos de observação e análise do conteúdo celular são de extrema importância para a validação dos *scaffolds* como biomaterial acelular, garantindo que esse arcabouço esteja livre de quaisquer restos celulares que possam provocar reações adversas ao organismo do animal. Além disso, essa validação também permite analisar a composição estrutural dos *scaffolds* para garantir que sua arquitetura e propriedades bioquímicas e biomecânicas estejam adequadas para permitir a utilização desse material no tratamento de lesões cutâneas. Diante disso, diferentes métodos podem ser utilizados para a visualização dos *scaffolds*, visando garantir que esses materiais não possuam mais conteúdo celular após o processo de descelularização. Dentre esses métodos incluem-se hematoxilina e eosina (HE) para visualização de núcleos celulares (ROSS; PAWLINA, 2008), a coloração de *Tricromo de Masson* para observação de tecido conjuntivo e diferenciação entre colágeno e músculo liso (ROSS; PAWLINA, 2008).

## **2.5 Biomateriais e biocompatibilidade**

Não obstante seu uso empírico, desde a antiguidade, somente a partir do século XX os biomateriais foram estudados de maneira sistemática e científica, passando a ser produzidos com materiais sintéticos e orgânicos (HUEBSCH; MOONEY, 2009). Estes, por sua vez, tendem a não ser biocompatíveis, exigindo que sejam combinados a outros materiais para serem utilizados (ABBASIAN *et al.*, 2019). Outra característica importante na busca dos biomateriais é a bioatividade, que pode ser definida como a capacidade do material em interagir ou não com o organismo (ORÉFICE *et al.*, 2006). Materiais que auxiliam na regeneração tecidual são considerados bioativos, sendo cada vez mais buscados (TIBBITT *et al.*, 2015). A biodegradabilidade consiste na capacidade do material em ser degradado e substituído *in vivo*, evitando a necessidade de remoção deste por uma segunda cirurgia (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Os materiais biológicos podem ser derivados de matriz extracelular. A MEC é denominada como componente não celular que está presente em todos os tecidos e órgãos, possui diferentes proteínas e polissacarídeos que fornecem estruturas físicas essenciais para os constituintes celulares, inicia pistas bioquímicas e biomecânicas necessárias para a morfogênese, diferenciação e homeostase dos tecidos (KULAR; BASU; SHARMA, 2014). Os materiais baseados em MEC são derivados de tecidos de mamíferos, incluindo derme, pericárdio e submucosa do intestino delgado, esses tecidos podem ser colhidos em diferentes

espécies de idades variadas incluindo humanos, suínos, equinos e bovinos, e são utilizados em diferentes aplicações como suporte biológico (WOLF *et al.*, 2012).

Diversas classes de materiais têm sido pesquisadas e utilizadas no desenvolvimento de novos biomateriais, tais como metais, cerâmicas, polímeros e híbridos. Dentre estes, os polímeros, principalmente os naturais, como o colágeno, estão mostrando grandes benefícios para a engenharia de tecidos. O colágeno é extraído de tecidos animais, ou pode estar na composição da matriz extracelular de tecidos conjuntivos descelularizados como enxertos (FERREIRA, 2017). Em relação ao colágeno, estudos têm indicado que a manutenção da arquitetura tridimensional alcançada por meio de protocolos de descelularização, tem exibido menor grau de polarização de macrófagos à expressão de marcadores pró-inflamatórios, quando comparado à MEC homogeneizada, o que indica as vantagens e a importância de sua utilização mimetizando a MEC nativa (PETROSYAN *et al.*, 2017).

Diferentemente dos materiais da engenharia de tecidos que são projetados artificialmente e não refletem totalmente uma estrutura complexa e a química do microambiente celular visto *in vivo*, os materiais biológicos a partir de MEC representam estruturas muito semelhantes às do tecido hospedeiro não lesionado, apresentando muitas vantagens, como uma estrutura tridimensional (3D), composição natural complexa, retenção de fatores de crescimento e propriedades bioativas, incluindo estimulação da formação de novos vasos, modulação de resposta imune e migração de células progenitoras endógenas (BUWALDA *et al.*, 2014; WOLF *et al.*, 2012). Essas propriedades garantem a remodelação funcional do tecido lesionado, fazendo com que haja formação de tecido cicatricial, que é o que normalmente ocorre durante uma cicatrização sem o uso de implantes (WOLF *et al.*, 2012).

A ciência está em processo de entender o mecanismo por trás da complexa sinalização molecular, do comportamento das células ao longo da resposta inflamatória e das interações que ocorrem entre biomaterial e organismo (BUWALDA *et al.*, 2014). Após o implante de um biomaterial, inicia-se a interação deste com componentes do sangue, que aderem a sua superfície e formam uma matriz extracelular provisória. A partir disso, tem início o recrutamento de células inflamatórias, tanto por efeito da injúria causada pela abordagem cirúrgica necessária à colocação do implante, como pela presença do biomaterial. De maneira geral, neutrófilos estão presentes nas primeiras 24 a 48 horas (resposta inflamatória aguda), e depois desaparecem gradualmente, dando espaço a monócitos que se diferenciam em macrófagos no tecido, e por possuírem vida longa, podem permanecer por várias semanas, caracterizando o processo inflamatório crônico (ANDERSON, 2001).

A equipe de pesquisa de Ballesteros utilizou membrana amniótica bovina descelularizada como fonte para produção de matrizes acelulares. Os resultados da pesquisa indicaram que o *scaffold* não possuiu efeito citotóxico às células de pele posteriormente implantadas, além de ter permitido a adesão destas ao substrato. Sendo assim, comprovou-se a biocompatibilidade do material, e seu potencial de utilização em medicina regenerativa (BALLESTEROS *et al.*, 2020). Em corroboração a isso, Simal e colaboradores também destacaram o potencial das abordagens baseadas em descelularização de tecidos e órgãos para a medicina (SIMSA *et al.*, 2019).

Um dos grandes impasses à utilização de biomateriais em engenharia de tecidos é a relativa escassez de suas fontes. Entretanto, é inquestionável sua superioridade quando comparada às alternativas conhecidas (ABBASIAN *et al.*, 2019). A placenta é um tecido descartado com o advento do parto em todas as espécies e tem em sido utilizada como fonte de implante há algum tempo. A rica matriz extracelular e a disponibilidade tornam a placenta uma alternativa de biomaterial (BARRETO *et al.*, 2019). Seu processamento e descelularização para produção de *scaffold* foi descrita em placentas humana (CHOI *et al.*, 2013), canina (MATIAS *et al.*, 2018), murina (BARRETO *et al.*, 2019) e bovina (BARRETO *et al.*, 2017). Nesse contexto faz-se necessário estudos para avaliar a biocompatibilidade de materiais oriundos de placenta bovina descelularizada, tanto sobre seus aspectos macroscópicos e microscópicos quanto em relação a reposta material-hospedeiro.

Estes materiais, ao serem aplicados, irão interagir com o organismo do receptor e desencadear respostas. Quando a interação é vantajosa ao hospedeiro, seja em termos terapêuticos ou diagnósticos, estes implantes podem ser chamados de biomateriais, termo utilizado em medicina humana e veterinária (WILLIAMS, 2009). As fases e o estado do processo de cicatrização podem ser acompanhadas e avaliadas por meio de estudos histológicos, por meio dos quais pode-se qualificar as fases de homeostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. Alguns critérios são levados em consideração durante a avaliação, como por exemplo a presença de infiltrado de células inflamatórias, fibroblastos, formação de elastina e deposição de fibras colágenas, importantes à organização da estrutura do tecido durante o processo (UKONG *et al.*, 2008).

Dentre os desafios na aplicação dos biomateriais está que esses sejam mecanicamente e biologicamente compatíveis (TIBBITT *et al.*, 2015). Diante desses pressupostos, as pesquisas na área devem atentar-se a fatores como biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade desses materiais. A biocompatibilidade se trata da relação entre o organismo hospedeiro e o

material implantado, sendo uma das propriedades mais buscadas em um material biológico. É um aspecto complexo da medicina regenerativa, pois não se trata apenas de uma característica própria do material, mas do resultado de uma complexa interação entre material e organismo (WILLIAMS, 2014).

As diferentes técnicas histológicas possuem suas particularidades. O método de coloração com hematoxilina e eosina por exemplo, é incapaz de diferenciar a deposição de colágeno, o que se torna possível com a utilização da técnica de *Picrosirius red* (NOORLANDER *et al.*, 2002). Outra alternativa para a visualização das fibras de colágeno durante a cicatrização de feridas é a coloração de *Tricromo de Masson*. Por meio desta técnica é possível diferenciar componentes importantes para avaliação da cicatrização de feridas, como queratina, hemoglobina e fibra muscular (cor vermelha), citoplasma e células adiposas (vermelho claro ou rosa), núcleos celulares (marrom escuro para preto) e fibra de colágeno (azul) (SUVIK; EFFENDY, 2012).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul e foi aprovado. Protocolo: 8641130720, (Anexo 1).

#### 3.1 Scaffold

Os *Scaffolds* foram produzidos e enviados por Laboratório parceiro para uso cirúrgico de maneira estéril via portador. Sua obtenção foi dada por meio de úteros gestantes obtidos em frigoríficos abatedouros, sendo que a idade gestacional foi estimada por mensuração de *Crown-rump* (CR) (EVANS; SACK, 1973). Os úteros em terço médio da gestação foram selecionados. Para a produção dos *scaffolds*, os úteros foram incisados na linha anti-mesometrial do perimétrio e miométrio, no terço médio do corno uterino gestante e as membranas fetais e o endométrio foram expostas. O saco alantocoriônico foi individualizado e as artérias umbilicais canuladas com cateteres nº 14 e acopladas à bomba de infusão volumétrica. Inicialmente, foi realizada perfusão com solução tampão fosfato (PBS: 136,9 mM de NaCl, 26,8 mM de KCl, 14,7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; PH 7,2) com volume constante de 0,5 ml/min até completa limpeza do sistema vascular, aproximadamente 24 horas. Em seguida, a solução de 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi perfundida em água destilada, também sob 0,5 ml/min por 24 horas. Subsequentemente, a solução foi alterada para 0,1% de SDS durante dois dias; a 0,25% por dois dias; a 0,5% por 3 dias, e a 1,0% por um dia, respectivamente. O saco alantocoriônico descelularizado foi então perfundido com 1% de Triton X-100 (# 0694-1L, Amresco-Solon, EUA) durante três horas. Por fim, foram lavados com PBS durante 24 horas. Os cotilédones descelularizados foram isolados do saco alantocoriônico, lavados manualmente em PBS com 2% de antibiótico penicilina/estreptomicina sob agitação. Os cotilédones foram esterilizados em aparelho de ponto crítico (MSCPD 300, Leica) e mantidos por 10 minutos sob luz ultravioleta dentro de câmara de fluxo laminar. Por fim foram armazenados em recipientes hermeticamente fechados até o momento do uso. O controle de qualidade de descelularização foi realizado por meio de quantificação de DNA genômico (gDNA) que devia ser menor do que 50 ng de gDNA por mg de tecido descelularizado e seco, de acordo com (BARRETO *et al.*, 2018).

#### 3.2 Animais

Foram obtidos no biotério da UFFS, 30 camundongos, machos, linhagem *swiss*, adultos, com peso médio de 50 gramas, saudáveis. Os animais foram separados em grupos de seis

animais e acondicionados em laboratório experimental isolado, em caixas coletivas para camundongos para os respectivos grupos, com cama de maravalha autoclavada, ração para camundongos e água clorada *ad libidum*.

### 3.3 Procedimento De Implantação

Os animais foram conduzidos a ambiente cirúrgico estéril. Receberam como medicação pré-anestésica, analgesia com morfina na dose de 2 mg/kg, via subcutâneo, 30 minutos antes do início do procedimento, e tranquilização com midazolam na dose de 5 mg/kg, via intraperitoneal, 15 minutos antes do procedimento cirúrgico (Figura 1).



Figura 1. Aplicação de medicação pré-anestésica via intraperitoneal em camundongo.

A indução anestésica foi realizada em câmara de oxigênio com 5% de isofluorano (Figura 2). A manutenção do plano anestésico foi dada por meio de máscara com oxigênio a 100% e 1 a 2,5 CAM de isofluorano.



Figura 2. Sistema de indução anestésica modificado para camundongos.

O animal foi posicionado em decúbito esternal. O campo operatório foi preparado por tricotomia da região dorsal, entre as escápulas do animal por meio de tração manual dos pelos. A antisepsia foi realizada por meio de aplicação tópica de clorexidina degermante a 2%, seguida por clorexidina alcoólica a 0,5%. Uma incisão de aproximadamente 0,5cm na linha média dorsal, na região cervico-torácica do animal foi realizada em sentido longitudinal. Divulsão do subcutâneo com tesoura de íris, foi procedida para criação de uma bolsa de aproximadamente 0,5x0,5cm, em direção a parede torácica direita. Um fragmento de 0,5x 0,3x 0,1cm do *scaffold* estéril foi colocado no interior do espaço criado. Para o grupo controle, uma bolsa de mesma dimensão foi criada em direção a parede torácica esquerda, mas não foi introduzido um *scaffold*. A incisão de pele foi aproximada manualmente com cola cirúrgica (Glubran®, CicloMed, Brasil), de modo a manter as extremidades cutâneas próximas.

Após a implantação, os animais foram alocados em caixas individuais até a completa recuperação anestésica e comportamento compatível com a espécie, estação, movimentação e deambulação. Após a recuperação os animais foram dispostos nas caixas coletivas do referido grupo.

### 3.4 Eutanásia

Em períodos pré-determinados de 3, 7 15, 30 e 60 dias de maneira aleatória, um grupo foi submetido a eutanásia para coleta de material e verificação macroscópica e histológica do implante no tecido. O procedimento foi realizado de maneira individual, e cada animal foi

colocado em câmara de indução anestésica com fluxo de oxigênio e superdosagem de isoflurano, até a verificação de ausência de sinais respiratórios e cardíacos.

### 3.5 Coleta e Preparo Histológico

Os tecidos cutâneo, subcutâneo e fáscia muscular adjacente da região do implante foram removidos em bloco logo após a eutanásia dos animais, por meio de incisões e divulsão romba. Os fragmentos teciduais foram submersos em solução de paraformaldeído 4% (PFA 4%) para fixação por 48 horas.

As amostras foram processadas por desidratação em etanol (70%, 80%, 90%, 100% e 100%, 50 minutos cada), e diafanização em xilol, por 30 a 60 minutos, em duas repetições. Em seguida, elas 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, e então foram incluídas em blocos de parafina (III). Os cortes histológicos (5 µm) foram confeccionados em micrótomo, aderidos a lâminas de vidro, e posteriormente, corados com coloração específica para documentação fotográfica em microscopia de luz.

Para avaliação histológica dos *scaffolds* foram empregadas técnicas de coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) para visualização de núcleos celulares, e *Tricromo de Masson* para 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%, 90%, 70%, 5 minutos cada), lavados em água corrente por 5 minutos, corados em Hematoxilina por 2 a 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 rápido, e desidratados em etanol 90% e 100% em imersões rápidas e 100% por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em álcool/xilol por 2 minutos, e então diafanizadas em duas repetições de imersão em xilol por 3 minutos cada. Para finalizar, lamínulas foram aplicadas sobre as lâminas.

Para coloração em *Tricrômo de Masson*, o excesso de parafina foi removido em estufa a 55° C a 60° C por no mínimo 2 horas, e então os tecidos aderidos às lâminas foram diafanizados em xilol por 3 a 5 minutos, em duas repetições e em seguida, hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%, 2 minutos cada). Em seguida foram lavadas em água corrente por 5 minutos e então serão coradas em HE, lavadas em água corrente

(rápido), água corrente por 5 minutos e coradas em solução A (Fucsina Ácida 1%) por 5 minutos, e novamente lavadas em água corrente rápida e por 5 minutos. Após, foram coradas Solução B (ácido fosfomolibdico) por 10 minutos e então solução C (Azul de Anilina) por 10 minutos, lavadas em água corrente rápida e por 5 minutos e então lavadas em ácido acético 3% por 3 minutos. Em seguida foram imersas em água por 5 a 10 minutos e desidratadas rapidamente em etanol (70%, 95%, 100% e 100%) e diafanizadas em xilol, por 3 minutos, em duas repetições. Para finalizar, lâminulas foram aplicadas sobre as lâminas.

### 3.6 Análise Macroscópica

As análises e o escore macroscópico foram realizados no momento da retirada dos implantes seguindo um modelo modificado da normatização *ISO 10993-6 (2016)*. Foram avaliadas características como, aderência do implante a planos profundos, encapsulamento e mudança na coloração do implante, sendo estas estadiadas de acordo com a intensidade dessas lesões em graus I, II, III e ausente.

### 3.7 Análise Histológica

As análises morfométricas, dos tecidos corados em H&E, *Tricromo de Masson*, foram realizadas em microscópio de luz. As análises quantitativas em H&E da população de mononucleares (MN), polimorfonucleares (PN) foram analisadas seguindo os modelos modificados de Garros *et al.* (2006) no qual foram avaliados cinco campos aleatórios, com aumento de 400x, na região da interface entre implante e subcutâneo de cada uma das amostras coletadas.

As avaliações das duas colorações foram realizadas às cegas e por um único avaliador. O ranqueamento para verificar a quantidade de tipos celulares foi estabelecido em Escore 0, 1, 2 e 3, onde o “0” foi utilizado para ausência de células inflamatórias e do conjuntivo; o escore “1” para quantidade discreta de células e sem formação de grandes aglomerados; o escore “2” para moderada quantidade de células formando agregados pouco concentrados; o escore “3” para acentuada quantidade de células formando agregados concentrados em grande parte do tecido avaliado (modificado de Garros *et al.*, 2006).

A avaliação das lâminas coradas por *Tricrômio de Masson* deu-se por avaliação da organização estrutural da transição entre o tecido receptor e o implante, através de escores de 0 a 3, onde o “0” foi utilizado para ausência de fibroblastos ou fibras colágenas, “1” para quantidade discreta de fibroblastos ou fibras colágenas, “2” para quantidade moderada e “3”

para quantidade acentuada. A avaliação seguiu o modelo prescrito pela normatização “ISO 10993-6. (2007)”.

### **3.8 Análise Estatística**

A partir da coleta dos dados, os mesmos foram tabulados e então foi realizada uma análise de qui quadrado de frequência, e o teste de análise de *Fischer* foi escolhido e realizado entre os grupos pelo tempo de evolução em dias, considerado  $p < 0.05$  quando houvesse significância estatística. Estes testes foram realizados através do *software R version 4.0.2*.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após implantação do biomaterial no subcutâneo dos camundongos, estes foram submetidos a eutanásia e um fragmento de tecido foi coletado para análise de biocompatibilidade através de observação macroscópica, processamento histológico da amostra e observação em microscópio óptico. Foram realizadas as colorações de hematoxilina e eosina e também a coloração de *Tricromo de Masson*. Ambas colorações mostraram a estrutura geral do tecido pós implantação. O ato operatório de todos os animais transcorreu sem complicações. Não houve óbitos. Todos os camundongos recuperam-se bem da anestesia. As avaliações clínicas diárias mostraram adequada recuperação, com manutenção do estado geral, presença de atividade física e disposição para alimentar-se.

Uma grande parte da pré-clínica dos testes de biomateriais (ou seja, otimização, caracterização, segurança) são realizados *in vitro*, no entanto, muitas vezes, é desejável avaliar o desempenho de tais materiais dentro do contexto de toda a fisiologia animal. Os estudos *in vivo* servem como um ponto final crítico no caminho da pesquisa, suas implicações de custo e tempo exigem cuidadosa consideração, em conjunto com as preocupações éticas associadas (JIMENÉZ *et al.*, 2017). Considerando o fato elucidado acima, neste trabalho optou-se por utilizar o teste *in vivo* justamente para avaliar a resposta do biomaterial em todo âmbito fisiológico do animal.

Uma das principais preocupações no uso da matriz xenogênica descellularizada para aplicação em engenharia de tecidos é o seu potencial para eliciar resposta imunogênica do hospedeiro devido à componentes celulares remanescentes. A estimativa do conteúdo de DNA na matriz é geralmente considerada como um critério preliminar para garantir uma descellularização eficiente. Estudos anteriores sugerem que matrizes descellularizadas com conteúdo de DNA abaixo de 50ng/mg de peso seco da matriz são adequados para aplicações de engenharia de tecidos (CRAPO *et al.*, 2011). Neste estudo foram utilizados *scaffolds* de placenta bovina que apresentaram conteúdo de DNA abaixo de 50ng/mg de matriz, assim como estudos que tratam da importância da remoção celular afim de evitar resposta imunogênica exacerbada.

A evolução da ferida cutânea nos camundongos do grupo controle e do grupo de implantação mostrou exsudação e formação de crostas delicadas até o 7º dia de pós-operatório. A partir do 7º dia, houve diminuição da crosta, que passou a reduzir espontaneamente a partir

do 15º dia; evoluindo para epitelização no 30º dia de pós-operatório, com crescimento de pelos em torno da lesão (Figura 3).

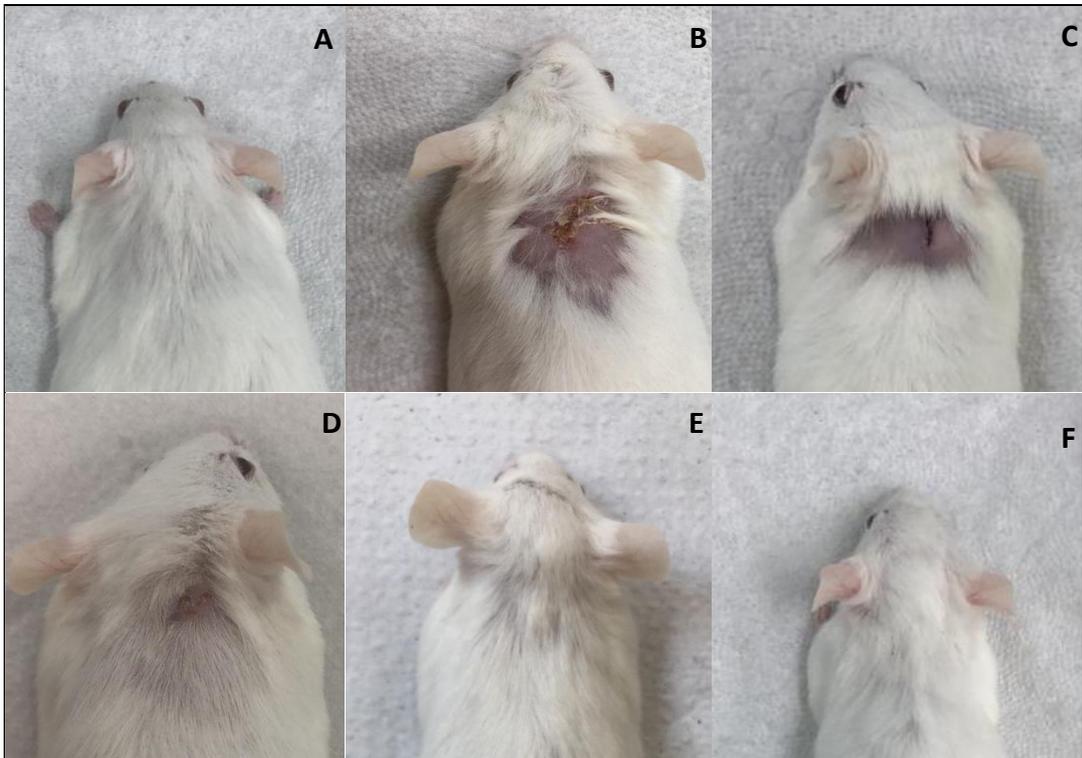


Figura 3. Fotografia da região de implantação do biomaterial. A letra (A) refere-se ao momento antes da implantação do biomaterial, observando-se nesta imagem a pele do animal íntegra. A letra (B) remete o terceiro dia pós implantação, na qual pode ser observada a lesão causada pela incisão no início da cicatrização. Letra (C), sete dias pós implantação, observa-se gradual diminuição da ferida. Letra (D), quinze dias pós implantação, ainda há presença de pequena ferida. Letra (E), trinta dias pós implantação, na qual observa-se ausência de ferida. Letra (F), sessenta dias pós implantação, mostrando completa cicatrização.

Em um estudo realizado por Garros e colaboradores, no qual utilizaram extrato de *Passiflora Edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos e água destilada como grupo controle, não houve diferença estatística significativa entre as áreas cirúrgicas das feridas tratadas e o controle; entretanto, histologicamente houve colagenização significativamente maior no 14º dia de pós-operatório nos animais do grupo tratado. A área da ferida diminuiu gradativamente com a evolução do tempo. No presente estudo, as áreas das feridas também diminuíram com o passar do tempo, evoluindo para epitelização no 30º dia de pós-operatório (GARROS *et al.*, 2006).

As análises e o escore macroscópico foram realizados no momento da retirada dos implantes seguindo um modelo modificado da normatização *ISO 10993-6 (2016)*. A avaliação macroscópica dos grupos de implantação, mostraram ausência de edema e de formação nodular em todos os animais de todos os grupos e não foi possível avaliar características como aderência

do implante a planos profundos e nem o encapsulamento do mesmo através da análise macroscópica, visto que o implante não foi visualizado macroscopicamente em nenhum dos animais (Figura 4).

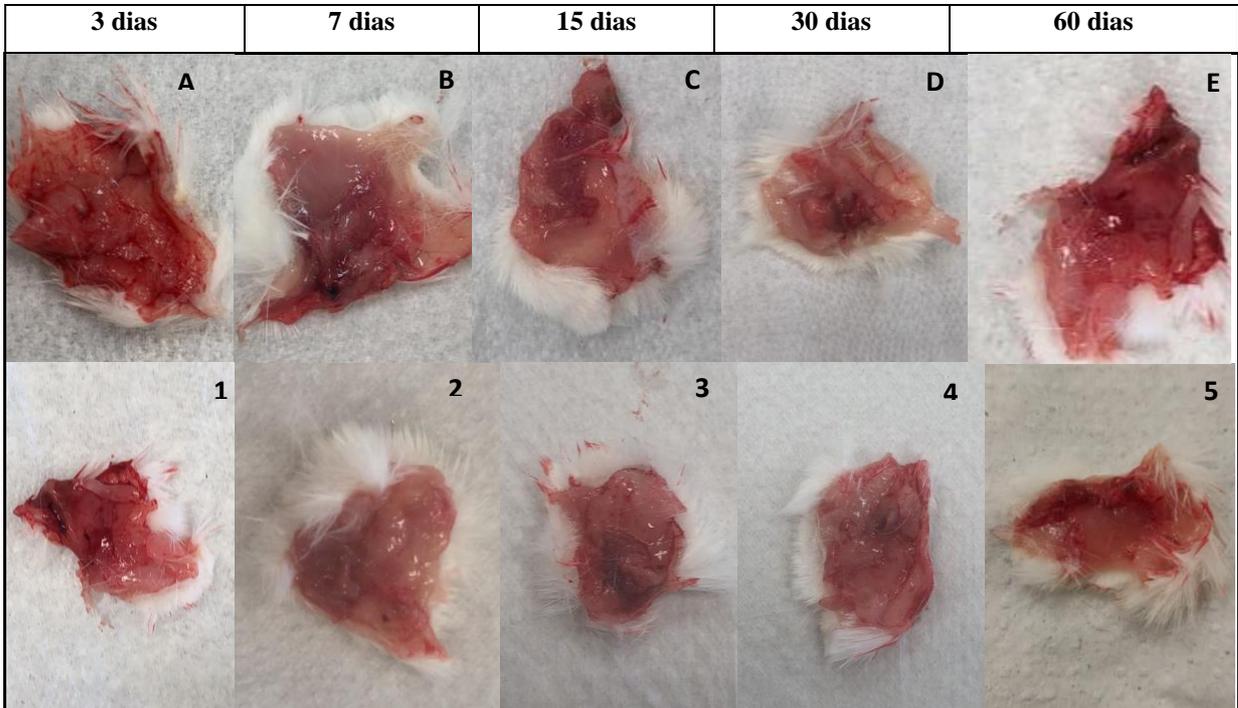


Figura 4. Imagens fotográficas de peças de pele e tela subcutânea, após remoção em bloco dos animais (camundongos Swiss). As imagens das letras (A, B, C, D e E) indicam o grupo de implantação dos biomateriais placentários bovinos. As imagens de número (1, 2, 3, 4 e 5) indicam o grupo controle.

Pela análise das lâminas coradas em H&E (Fig. 5A, C, D e E; Fig. 6A, B, D e E; Fig. 7A, B, C, D e E) foi possível observar a presença de células inflamatórias no local de implante do biomaterial, ou seja, na tela subcutânea, no antímero direito, na região cervico-escapular. As células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares estavam presentes nos d 3, 7, 15 e 30 pós implantação, sendo que no primeiro dia de coleta, terceiro dia de pós-operatório, 3 animais apresentaram deposição de células inflamatórias de forma moderada e 3 animais apresentaram deposição acentuada. No sétimo dia pós implantação, 1 animal apresentou deposição discreta, 3 apresentaram deposição moderada e 2 apresentaram deposição acentuada. Na coleta do décimo quinto dia, 2 animais mostraram deposição discreta de células inflamatórias, 3 com deposição moderada e 2 com deposição acentuada. No trigésimo dia, 3 animais com deposição discreta e 3 com deposição acentuada e no sexagésimo dia, em nenhum dos animais foi encontrado células inflamatórias (Tabela 1).

<b>Animais</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>	<b>Grupo 5</b>
Animal 1	3	2	2	1	0
Animal 2	3	2	1	1	0
Animal 3	2	1	1	1	0
Animal 4	3	3	2	1	0
Animal 5	2	3	2	1	0
Animal 6	2	2	2	1	0
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

Tabela 1. Intensidade da inflamação com avaliação de polimorfonucleares e mononucleares observados no processo de reparação tecidual no local de implantação do biomaterial, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós implantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de células inflamatórias; o escore “1” para quantidade discreta de células e sem formação de grandes aglomerados; o escore “2” para moderada quantidade de células formando agregados pouco concentrados; o escore “3” para acentuada quantidade de células formando agregados muito concentrados e coalescentes em grande parte do tecido avaliado.

A fase inicial da cicatrização é a fase inflamatória e é de extrema importância para o processo de reparação tecidual. Nesta fase há aumento da permeabilidade vascular e consequente migração de células como leucócitos, linfócitos e eritrócitos para a ferida, que juntamente com o plasma, constituem o exsudato inflamatório normal (GARROS *et al.*, 2006). Este estudo é compatível com este trabalho pela presença de infiltrado inflamatório observada através da análise histológica do local de implantação e do grupo controle.

Na observação do grupo controle, o qual foi realizado no antímero esquerdo, através de divulsão da tela subcutânea entre a região cervico-torácica do mesmo lado, a presença de células inflamatórias foi discreta nos primeiros 15 dias e após 30 dias já não foi possível as observar, isto provavelmente pelo fato de que a inflamação ocorreu justamente pela solução de continuidade causada no tecido (Tabela 2).

<b>Animais</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>	<b>Grupo 5</b>
Animal 1	2	2	2	0	0
Animal 2	2	2	1	0	0
Animal 3	2	2	1	0	0
Animal 4	3	1	1	0	0
Animal 5	2	2	2	0	0
Animal 6	2	1	1	0	0
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Tabela 2. Intensidade da inflamação com avaliação de polimorfonucleares e mononucleares observados no processo de reparação tecidual do grupo controle, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós implantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de células inflamatórias; o escore “1” para quantidade discreta de células e sem formação de grandes aglomerados; o escore “2” para moderada quantidade de células formando agregados pouco concentrados; o escore “3” para acentuada quantidade de células formando agregados muito concentrados e coalescentes em grande parte do tecido avaliado.

A partir da análise estatística de Fischer, pela associação entre os níveis da inflamação, comparando no grupo de implantação com o grupo controle, obteve-se que no dia 3, o *Fisher's p*=0.545, no dia 7 *Fisher's p*=0.539 e no dia 15 *Fisher's p*=0.567, demonstrando que não houve significância estatística entre os dados. Já no dia 30 de implantação, houve diferença estatística, pois o *Fisher's p*=0.002. Estes resultados mostram que na comparação do grupo de implantação com o grupo controle, a intensidade inflamatória foi maior no grupo de implantação.

A implantação de biomaterial placentário bovino no subcutâneo de camundongos demonstrou-se biocompatível, pois a partir das análises realizadas foi possível observar que, apesar do biomaterial ter causado resposta inflamatória que perdurou até o trigésimo dia, esta resoluciona-se até o sexagésimo dia.

As lesões cutâneas são normais para todas as espécies, independentemente do sexo ou idade. Nos animais, essas lesões podem ser decorrentes de lutas e/ou predações, assim como em humanos, existe uma causa muito comum de lesões causadas por queimaduras e carcinomas (MARTINS *et al.*, 2020). Estudos têm demonstrado resultados promissores para formulações de scaffolds biológicos acelulares a partir da descclularização de tecidos para a reconstituição dessas lesões. Neste âmbito Martins e colaboradores descclularizaram a derme de rato através de meios químicos e físicos e recelularizaram o *scaffold* com fibroblastos murinos e células-

tronco mesenquimais de tecido adiposo canino por 7 dias. Após testes de eficácia, a recelularização tecidual foi confirmada e houve baixo infiltrado inflamatório, comprovando a biocompatibilidade do biomaterial (MARTINS *et al.*, 2020). Assim como no presente estudo, visto que na avaliação da intensidade inflamatória, foi possível observar que a inflamação perdurou até os trinta dias pós-implantação e a partir deste período esta foi contida pelo organismo.

Calabrese *et al.* (2017) avaliaram a biocompatibilidade de *scaffolds* tridimensionais produzidos a partir de colágeno tipo 1 de equinos. O biomaterial foi implantado no subcutâneo de 40 fêmeas (BALB/c), utilizando-se quatro animais como grupo controle. As secções coradas em hematoxilina e eosina, bem como os testes imuno-histoquímicos, revelaram a presença de infiltrado granulocítico na região do implante. Este permaneceu durante alguns dias, desaparecendo em seguida. Em situações normais, o processo inflamatório tende a ser resolvido em algumas semanas (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2007), e assim, tanto o estudo de Calabrese e colaboradores, como este trabalho encontram-se dentro dos resultados esperados para um processo de cicatrização normal.

Jung e colaboradores avaliaram a biocompatibilidade *in vivo* de membranas de colágeno obtidas por meio da descélularização de pericárdios bovinos. Da mesma forma que em nosso estudo, as membranas foram implantadas no tecido subcutâneo de camundongos (linhagem BALB/c). Aos 10 dias pós-implantação, a resposta inflamatória predominante foi de macrófagos e granulócitos, sendo a presença de linfócitos menos significativa e não foram encontradas células gigantes de corpo estranho (JUNG *et al.*, 2020). Neste trabalho também não foram encontrados macrófagos do tipo célula-gigante em nenhuma das amostras investigadas. Enquanto isso, Fan *et al.* (2018), ao avaliarem a biocompatibilidade *in vivo* de *scaffolds* híbridos, produzidos ao combinar hidroxiapatita com ceratina, identificaram resposta de corpo estranho nos primeiros dois meses após a inserção do implante. Respostas de corpo estranho indicam pobre biocompatibilidade do material, tendência a degradação e possível falha do biomaterial como matéria-prima para a produção de dispositivos biomédicos (CHANG, 2007).

A deposição de colágeno tecidual foi avaliada através da observação de lâminas coradas com *Tricromo de Masson* (Fig. 5B e F; Fig. 6C e F; Fig. 7F), sendo avaliados 5 campos aleatórios em aumento de 40x. Em se tratando do grupo em que o biomaterial foi implantado, no terceiro dia pós-operatório, ou seja, o primeiro dia de coleta, todos os animais apresentaram

deposição de fibras colágenas de maneira discreta, indicando o início da deposição. No sétimo dia, a colagenização foi considerada moderada em 5 de 6 animais do grupo de implantação, e em 1 deles foi considerada acentuada. No décimo quinto dia pós implantação, a colagenização foi moderada em 2 animais e acentuada em 4. No trigésimo dia de coleta, 3 animais apresentaram colagenização discreta e 3 moderada. No sexagésimo dia não houve deposição de fibras (Tabela 3).

<b>Animais</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>	<b>Grupo 5</b>
Animal 1	1	2	2	1	0
Animal 2	1	2	3	1	0
Animal 3	1	2	3	2	0
Animal 4	1	2	2	2	0
Animal 5	1	3	2	2	0
Animal 6	1	2	3	1	0
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>0</b>

Tabela 3. Deposição de colágeno observada na transição da derme e tela subcutânea no local de implantação do biomaterial, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com *Tricromo de Masson*. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós implantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de fibroblastos; o escore “1” para quantidade discreta de células; o escore “2” para moderada quantidade de células; o escore “3” para acentuada quantidade de células do tecido avaliado.

Em se tratando do grupo controle, a deposição de fibras ocorreu de maneira discreta em todos os animais, nas amostras coletadas no terceiro e no sétimo dia. No décimo quinto dia, 3 animais apresentaram deposição discreta e 3 animais apresentaram deposição moderada, nos trigésimo todos os animais apresentaram deposição discreta e no sexagésimo dia, não houve deposição de novas fibras (tabela 4).

<b>Animais</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>	<b>Grupo 5</b>
Animal 1	1	2	2	2	0
Animal 2	1	2	1	2	0
Animal 3	1	2	1	2	0
Animal 4	1	2	2	2	0
Animal 5	1	1	1	2	0
Animal 6	1	2	2	2	0
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>0</b>

Tabela 4. Deposição de colágeno observada na transição da derme e tela subcutânea no local do grupo controle, através da análise de 5 campos aleatórios em um aumento de 40x de lâminas coradas com Tricromo de Masson. O grupo 1 refere-se aos 3 dias pós implantação, grupo 2, 7 dias, grupo 3, 15 dias, grupo 4, 30 dias e grupo 5, 60 dias pós implantação. Foram utilizados os escores 0, 1, 2 e 3, em que o “0” refere-se para ausência de fibroblastos; o escore “1” para quantidade discreta de células; o escore “2” para moderada quantidade de células; o escore “3” para acentuada quantidade de células do tecido avaliado.

Na comparação da deposição de colágeno tecidual entre o grupo tratado e o grupo controle, a partir da análise de *Fischer*, obteve-se que no dia 3,  $p=0.182$  não demonstrando significância estatística entre os dados, no dia 7, *Fisher's*  $p=0.002$ , mostrando diferença estatística e nos dias 30 e 60 também não houve diferença estatística entre os dados, pois, dia 30, *Fisher's*  $p=0.129$ , e no dia 60, *Fisher's*  $p=0.182$ . Isto mostra que aos sete dias pós implantação, a deposição de colágeno tecidual foi maior no grupo de implantação do biomaterial do que no grupo controle.

No estudo histopatológico da cicatrização de feridas, diferentes características são consideradas para determinar o estágio de alteração histopatológica, como profundidade e comprimento da ferida cicatrizada, período de epitelização, infiltração de glóbulos brancos, formação de elastina, agregação de fibroblastos e o mais importante é fibra de colágeno, uma vez que desempenha um papel dominante na preservação da integridade anatômica e cicatrização de feridas. Quando os tecidos são rompidos, o colágeno é necessário para reparar a lesão tecidual e restaurar a estrutura e função anatômicas. O colágeno é uma proteína que possui três cadeias entrelaçadas em uma hélice tripla e é muito importante em todas as etapas do processo de cicatrização de feridas, pois proporciona força e integridade a todos os tecidos (Mayer & Willemsteijn, 2008). Neste estudo obteve-se uma maior deposição de colágeno no local de implantação, sendo que este fato pode ter sido pela maior lesão tecidual causada para implantar o biomaterial, ou pela própria presença de fibras colágenas do implante.

Devido à crescente busca pelo desenvolvimento de biomateriais, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade de *scaffolds* têm sido questionadas, uma vez que a aplicação clínica final exige segurança biológica e eficiência dos biomateriais. Após a implantação de *scaffolds* em organismos vivos, uma resposta inflamatória excessiva e uma reação de corpo estranho podem acontecer. A reação pode comprometer os resultados da cicatrização tecidual ou, eventualmente, levar à falha da regeneração (YANG *et al.*, 2019). Em um estudo com primatas não humanos (babuíno-sagrado; *Papio hamadryas*) utilizou-se um aparato de polietereftalato de etileno populado com células tronco mesenquimais alogênicas em ensaios de biocompatibilidade. Poucas alterações foram identificadas, e concentraram-se nos primeiros dias do experimento. Os autores apontam que a causa da resposta inflamatória foi desencadeada pela incisão e manipulação cirúrgica. Amostras de pele foram colhidas e observadas em microscópio óptico. A histologia da estrutura revelou a presença de uma fina cápsula em torno do *scaffold*, com presença de células inflamatórias, porém houve resolução do quadro no primeiro mês pós implantação (GILEVICH *et al.*, 2017). Assim como neste trabalho, em que houve a presença de células inflamatórias até o primeiro mês pós implantação e que na sequência foi resolucionado.

Outro trabalho que mostra a resolução do processo inflamatório nos primeiros dias pós implantação é o de Sicari e colaboradores que implantaram um *scaffold* de vescícula urinária porcina no quadríceps de camundongos para avaliar a bioatividade e consequente biocompatibilidade do material. Após 6 meses da implantação do *scaffold*, obtiveram como resultado uma remodelação muscular, mostrando eficácia na regeneração de tecidos, pois o biomaterial forneceu um nicho indutivo que proveu o recrutamento e a diferenciação de células progenitoras miogênicas endógenas, apesar de ter passado por um processo inflamatório nos primeiros dias pós implantação (SICARI *et al.*, 2014).

No âmbito da biodisponibilidade de material para a produção de *scaffolds*, as matérias-primas são restritas quando derivadas de tecido humano, mas no campo da engenharia de tecidos, alguns órgãos humanos estão sendo utilizados para a descellularização, como o fígado. Um trabalho realizado por Mazza e colaboradores, utilizou fígado inteiro para produção de um *scaffold* de matriz extracelular. Neste trabalho, buscaram avaliar a eficácia da descellularização do biomaterial e também a biocompatibilidade do mesmo, depois de implantado no subcutâneo de camundongos, e como resultado, obtiveram que o biomaterial não apresentou reação de corpo estranho, assim como neste presente projeto, visto que no trabalho de Mazza e colaboradores, nos primeiros sete dias após o implante, a resposta inflamatória foi leve com

pouco infiltrado inflamatório e a partir da terceira semana já não havia presença de célula inflamatória (MAZZA *et al.*, 2015). No presente estudo a resposta inflamatória perdurou até o trigésimo dia pós implantação.

Outro tecido derivado de seres humanos que está sendo estudado é a placenta. A placenta é um biomaterial que pode ser coletado in vivo, no pós-parto e isto faz com que seja um material promissor para a engenharia de tecidos. A rica matriz extracelular e a disponibilidade tornam a placenta uma alternativa de biomaterial (BARRETO *et al.*, 2019). Neste âmbito, em um estudo realizado por Schneider e colaboradores, estes utilizaram parte vascular da placa coriônica para formular um material descelularizado a ser utilizado como enxerto. Para avaliar a biocompatibilidade do tecido, os vasos descelularizados foram semeados com células endoteliais e incubados por 7 dias, esse processo mostrou a proliferação e a aderência celular sobre o biomaterial. Como resultado obtiveram a preservação da ultraestrutura fibrosa da matriz extracelular, a remoção de componentes celulares, a proliferação e aderência celular, e baixo infiltrado inflamatório, caracterizando assim, a biocompatibilidade (SCHNEIDER *et al.*, 2016). Na presente pesquisa, o material de escolha para produção do scaffold foi a placenta, sendo que na sua formulação, esta apresentou adequada remoção celular pós preparo do biomaterial e como resposta tecidual o baixo infiltrado inflamatório.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da infinidade de modelos *in vitro* que oferecem uma alternativa aos testes em animais, é importante que novos biomateriais sejam testados no contexto de uma fisiologia animal completa, para avaliar sua segurança e eficácia. As análises realizadas no presente estudo mostraram que o biomaterial implantado em camundongos, teve como resultado, deposição de colágeno tecidual significativa no sétimo dia pós implantação e presença de infiltrado inflamatório normal para a cicatrização de feridas. Desta forma, conclui-se que o biomaterial produzido a partir do processo de descelularização de placenta bovina aplicado em camundongos é biocompatível, e assim, seu uso deve ser considerado promissor em terapias baseadas em Engenharia de Tecidos.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign Body Reaction To Biomaterials. **Semin Immunol**. v. 20, n. 2, p. 86 – 100, 2009. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2327202/>. Acesso em: 17 jan 2022.
- ABBASIAN, M. *et al.* Scaffolding polymeric biomaterials: are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering? **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 134 n. 2019 p. 673-694, maio 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.197. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019317969> Acesso em: 24 jun. 2020.
- ANDREWS, J. M. Biomateriais em cirurgia plástica. *In*: Townsend CM, **Tratado de Cirurgia**. 16ª edição. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2003. p.111. *E-book*.
- BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. **Biomedical Engineering**, v. 13, n. Annual Review, p. 27–53, 14 jul. 2011. DOI: 10.1002/jbm.a.35291\_ Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25045886/> Acesso em: 5 ago. 2020
- BADYLAK, S. F. *et al.* Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, p. 333–343, oct. 1999. Suplemento 367. DOI: 10.1097/00003086-199910001-00032. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10546657/> Acesso em: 18 jul. 2020.
- BALLESTEROS, A. C. V. *et al.* Bovine decellularized amniotic membrane: extracellular matrix as scaffold for mammalian skin. **Polymers (Basel)**, v. 12, n. 3, p. 590, mar. 2020. DOI: 10.2290/polym12030590. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7182835/>. Acesso em: 17 set. 2020.
- BARRETO, R.S.N. *et al.* Decellularized bovine cotyledons may serve as biological scaffolds with preserved vascular arrangement. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 12, n. 4, p. 1880-1888. 2017. DOI: 10.1002/term.2618. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29164819/> Acesso em: 12 jul. 2020.
- BARRETO, R.S.N. *et al.* Mouse placental scaffolds: a three-dimensional environment model for recellularization **J Tissue Eng**. v.8, n. 10. 2019. DOI: 10.1177/2041731419867962\_ Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6689918/> Acesso em: 5 jun. 2020.
- BUWALDA, S. J. *et al.* Hydrogels in a historical perspective : From simple networks to smart materials. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 254–273. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24746623/> Acesso em: 16 jun. 2020

CALABRESE, G. *et al.* In Vivo Evaluation of Biocompatibility and Chondrogenic Potential of a Cell-Free Collagen-Based Scaffold. **Front Physiol.** v.8 p. 984, 2017.

DOI: 10.3389/fphys.2017.00984. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5712864/>. Acesso em: 20 abr. 2022

CHANG, D. T. *et al.* Lymphocyte Adhesion and Interactions with Biomaterial Adherent Macrophages and Foreign Body Giant Cells. V. 15, n. 4, p. 1210- 1220, 2009. DOI:

10.1002/jbm.a.32218. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2783376/>. Acesso em: 23 fev. 2022

CHAO, N. *et al.* Fabrication and characterization of a pro-angiogenic hydrogel derived from the human placenta. **Biomaterials Science**, v. 12, n. 8, p. 2062-2075, 2022. DOI:

10.1039/d1bm01891d. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35315457/>. Acesso em: 29 mar. 2022

CHAUDHARI, P. *et al.* Expression kinetics of hepatic progenitor markers in cellular models of human liver development recapitulating hepatocyte and biliary cell fate commitment.

**Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 15, p. 1653–1662, 2016. DOI:

10.1177/1535370216657901. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27390263/>

Acesso em: 12 set. 2020.

CHOI, J. S. *et al.* Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived

extracellular matrix containing bioactive molecules. **Tissue Eng, Part A** n.19, p. 329–339.

2013. DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0738. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22891853/> Acesso em: 14 jun. 2020

CORNWELL, K. G.; LANSMAN, A.; JAMES, K. S. Extracellular Matrix Biomaterials for Soft Tissue Repair. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 26, n. 4, p. 507–523.

2009. DOI: 10.1016/j.cpm.2009.08.001. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19778685/> Acesso em: 29 jul. 2020

COTRAN R. Z.; KUMAR V.; ROBBINS, S.L. (eds). **Pathologic Basis of Disease**, pp. 50–112. Philadelphia: Saunders. 6. Ed, 1999.

CRAPO, P.M; GILBERT, T.W; BADYLAK, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v 32, p. 3233-3243. 2011. DOI:

10.1016/j.biomaterials.2011.01.057. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21296410/>. Acesso em 26 maio 2022

DAI, Z. *et al.* In vivo biocompatibility of new nano-calcium-deficient hydroxyapatite/poly-amino acid complex biomaterials. **Int J Nanomedicine**. v. 6, n. 10, p. 6303-16, 2015. DOI:

10.2147/IJN.S90273. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26504382/>. Acesso em 20 maio 2022

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals:

growth curves, external features and selected references. **Anat. Histol. Embryol.** v. 2, n. 1, p.

11-45, 1973. DOI: 10.1111/j.1439-0264.1973.tb00253.x. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4745140/>. Acesso em: 17 set. 2020.

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. DOI: 10.1089/ten.TEA.2017.0273. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29303417/>. Acesso em: 14 set. 2021

FERREIRA, K. D. **Cartilagem auricular de bovinos tratada com solução alcalina: avaliação histológica pré-implantação e termográfica pós-implantação na parede abdominal de coelhos (*oryctolagus cuniculus*)**. 2017. 68f. Trabalho de conclusão de curso (Tese Mestrado), UFG – Regional Goiânia, 2017. Disponível em:  
<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/7052> Acesso em: 14 ag. 2020

FRANCIPANE, M.G; LAGASSE, E. Towards Organs on Demand: Breakthroughs and Challenges in Models of Organogenesis. **Curr Pathobiol Rep**, v. 4, n. 3, p. 77-85, 2016. DOI: 10.1007/s40139-016-0111-9. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28979828/>. Acesso em: 15 jun. 2022

FREYTES, D. O. *et al.* Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. **Biomaterials**, v. 29, n. 11, p. 1630–1637, 2008. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.014. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18201760/>. Acesso em: 12 maio 2020

GALLIN, J. I., SYNDERMAN, R., eds. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven. 2nd. Ed. 1999.

GARROS, I. C. *et al.* Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. **Acta Cir Bras**. v. 21, n. 3, p. 55–65. 2006. DOI: 10.1590/S0102-86502006000900009. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/pdf/acb/v21s3/09.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2020

GATTAZO, F.; URCIUOLO, A.; BONALDO, P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. **Biochim Biophys Acta**. v. 1840, n. 8, p. 2506-19, 2018. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24418517/>. Acesso em: 14 fev. 2022

GHOSAL, K. *et al.* Eletrospinning tissue engenee- ring and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposite, **Chem. Eng. J**, v. 358, p. 1.262-1.278. 2019. DOI: 10.1016/j.cej.2018.10.117. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894718320710>. Acesso em: 17 jul. 2020.

GILEVICH, V.I. Effects of Growth Factors on Mobilization of Mesenchymal Stem Cells. **Experimental Biology**. v.162. n.11, 2017. DOI: 10.1007/s10517-017-3687-0. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28361423/>. Acesso em 21 maio 2022

- GIRARD, D. *et al.* Biotechnological management of skin burn injuries: challenges and perspectives in wound healing and sensory recovery. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, New Rochelle, v. 23, n. 1, p. 59–82, 2016. DOI: 10.1089/ten.TEB.2016.0195. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27609352/>. Acesso em: 30 mar. 2020
- GRENEWOOD, H.L. *et al.* Regenerative Medicine and the Developing World. **PLoS Med.** v.3, n.9, p.381, 2006. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030381. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1564180/>. Acesso em: 21 jan. 2022
- GREENWOOD, J.E. SCHIMITT, B. J.; WAGSTAFF, M. J. D. Experience With A Synthetic Bilayer Biodegradable Temporising Matrix In Significant Burn Injury. **Burns Open.** v. 2, n. 1, p. 17-34, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.burnso.2017.08.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468912217300378>. Acesso em: 12 jul. 2021
- HOWARD, D. *et al.* Tissue engineering: strategies stem cells and scaffolds. **Journal of Anatomy.** v. 213, n. 1, p. 66-72, 2008. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2475566/>. Acesso em: 23 maio 2021
- HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, London, v. 26, n. 462, p. 426-432. 2009. DOI: 10.1038/nature08601. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19940912/>. Acesso em: 12 jul. 2020
- ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation. International Standard. v.2, p.1-19. 2007. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:10993:-6:ed-3:v1:en>. Acesso em: 23 maio 2022
- JIMÉNEZ, I.M. *et al.* The chorioallantoic membrane (CAM) assay for biomaterial testing in tissue engineering: a short term in vivo preclinical model. **Tissue Engineering.** v.12, p. 938-952, 2017. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0186. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28877648/>. Acesso em: 10 fev 2022
- KATARI, R.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 12, n. 2. p. 57, 2015. DOI: 10.3389/fbioe.2014.00057. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290692/>. Acesso em: 27 maio 2020
- KOČÍ, Z. *et al.* Extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord as a scaffold for neural tissue repair and its comparison with extracellular matrix from porcine tissues. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 23, n. 6, p. 333–345, 2017. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0089. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28471271/>. Acesso em: 12 jul. 2020.
- KIM, B. S. *et al.* Decellularized extracellular matrix: a step towards the next generation source for bioink manufacturing. **Biofabrication.** v. 4, n. 3, p. 034104, 2017. DOI: 10.1088/1758-5090/aa7e98. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28691696/>. Acesso em: 12 jul. 2021.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 5, 2014. DOI: 10.1177/2041731414557112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25610589/>. Acesso em: 12 jul. 2020.

LABARGE, W.; MORALES, D.; PRETORIUS, A.M. Scaffold-free bioprinter utilizing layer-by-layer printing of cellular spheroids, **MJicromachines (Basel)**, v. 10. 2019. DOI: 10.3390/mi10090570. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31470604/>. Acesso em 16 ago. 2020

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 920-926, maio 1993. Disponível em: <http://www.sciencemag.org>. Acesso em: 5 set. 2021.

MATIAS, G. S. S. *et al.* Optimization of Canine Placenta Decellularization: An Alternative Source of Biological Scaffolds for Regenerative Medicine. **Cells Tissues Organs**. v. 205, n. 4, p. 217-225, 2018. DOI: 10.1159/000492466. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30199873/>. Acesso em: 8 maio 2020

MARTINS, A.R. *et al.* Wistar rat dermis recellularization. **Research in Veterinary Science**. v. 131. P. 222-231, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.05.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528819308410?via%3Dihub>. Acesso em: 26 maio 2022

MAYER, G.; WILLEMSTEIJN, B. **Coaching chronic wounds into healing wounds with collagen**. Germany: Beese Medical. 2008.

MAZZA, G. *et al.* Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. **Sci Rep**, v. 7, n. 5, p. 13079, 2015. DOI: 10.1038/srep13079. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26248878/>. Acesso em: 15 mar. 2022

MOGASANU, G.D.; GRUMEZESCU, A.M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **Int. J. Pharm**, v. 463, p. 127-136, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24368109/>. Acesso em: 13 jun. 2020

NAGAO, R. J. *et al.* Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model. **Neurological Research**, v. 33, n. 6, p. 600–608, 2011. DOI: 10.1179/1743132810Y.0000000023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24368109/>. Acesso em: 2 set. 2020.

NOORLANDER, M. L. *et al.* A quantitative method to determine the orientation of collagen fibers in the dermis. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v. 50 n. 11, p. 1469-1474, 2002. DOI: 10.1177/002215540205001106. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12417612/>. Acesso em: 28 jul. 2020

ONUKEI, Y; BHARDWAJ, U; PAPADIMITRAKOPOULOS, F; BURGESS, D. J. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. **J. Diabetes Sci. Technol.** v. 2, n. 8, p. 1003–1015, 2008.

DOI: 10.1177/193229680800200610. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19885290/>. Acesso em: 15 mai. 2022

ORÉFICE, R. M.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais, Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PETROSYAN, A. *et al.* A step towards clinical application of acellular matrix: a clue from macrophage polarization. **Matrix Biol.** v. 57-58, p. 334-346, 2017. DOI:

10.1016/j.matbio.2016.08.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27575985/>.

Acesso em:

PIŞKIN, E. *et al.* In vivo performance of simvastatin loaded electrospun spiral- wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. **J Biomed Mater Res A.** v. A, n. 4, p. 1.137-1151. 2009 DOI: 10.1002/jbm.a.32157. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18671271/>. Acesso em: 18 jul. 2020

POULIOT, R. A. *et al.* Development and characterization of lung derived extracellular matrix hydrogels. **J Biomed Mater Res A**, v. 104, n. 8, p. 1922-35. 2016. DOI:

10.1002/jbm.a.35726. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27012815/>. Acesso

em: 14 set. 2020

REING, J. E. *et al.* Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. **Tissue Engineering: Part A**, v. 15, n. 3, p. 605-614, 2009. DOI:

10.1089/ten.tea.2007.0425. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18652541/>.

Acesso em 20 jul. 2020.

RIBEIRO, J. *et al.* Carboxychanones: biactive agents and molecular scaffold for synthesis of analogues and derivatives. **Molecules**, v. 24, p. 180-213. 2019. DOI:

10.3390/molecules24010180. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30621303/>.

Acesso em: 14 jul. 2020.

RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, M. *et al.* Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. **BioMed Res. Int.**, v. 2015, p. 5-15. 2015. DOI:

10.1155/2015/821279. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26504833/>. Acesso

em: 13 mar. 2020.

ROSS, M.; PAWLINA, W. R. **Histologia Texto e Atlas-Correlações com Biologia Celular e Molecular**. Guanabara Koogan; 7ª edição, 1 julho 2016.

SANTOS JUNIOR, A.R.; WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, v.17, n 4, p. 308-317, 2007. DOI:

10.1590/S0104-14282007000400010. Disponível em:

[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282007000400010](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282007000400010). Acesso

em: 30 jan. 2020.

SARA, A.; AFRA, H.; HASSAN, N. Chitosan-gelatin porous scaffold incorporated with chitosan nanoparticles for growth factor delivery in tissue engineering. **Carbohydrate polymers**, v. 202, p. 315-322. 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30287006/>. Acesso em: 24 fev. 2020.

SERRA, M. *et al.* Development and characterization of a canine skin equivalent. **Exp Dermatol**, v. 16, n. 2, p. 135-42, 2007. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2006.00525.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17222228/>. Acesso em: 26 nov. 2021

SCHNEIDER, K. H. *et al.* Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, v. 29, p.125-134. 2016. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.09.038. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26432442/>. Acesso em: 10 set. 2020.

SHEVCHENKO, R.V.; JAMES, S.L.; JAMES, S.E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **J. R. Soc. Interface R. Soc**, v. 7, n. 43, p. 229–258, 2010. DOI: 10.1098/rsif.2009.0403. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2842616/> Acesso em: 21 dez. 2021

SICARI, M.B. An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. **Science Translational Medicine**, v.6, p. 234-248. 2014. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008085. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24786326/>. Acesso em: 15 abr. 2022

SIMSA, R. *et al.* Effect of fluid dynamics on decellularization efficacy and mechanical properties of blood vessels. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0220743. DOI: 10.1371/journal.pone.0220743. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682308/>. Acesso em: 15 set. 2020.

SUVIK, A.; EFFENDY, A. W. M. The use of modified massons trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. **Malaysian Journal of Veterinary Research**, v. 3, n. 1, p. 39-47, jan. 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/263542834> The use of modified Massion%27s trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. Acesso em: 17 set. 2020.

SYED, O. *et al.* Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 12, p. 5043–5054, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.08.024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25173840/>. Acesso em: 3 jun. 2020.

TEODORI, L. *et al.* Native extracellular matrix: A new scaffolding platform for repair of damaged muscle. **Frontiers in Physiology**, v. 5 jun, p. 1–9, 2014. DOI: 10.3389/fphys.2014.00218. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4058757/>. Acesso em: 3 set. 2020.

TIBBITT, M. W.; RODELL, C. B.; BURDICK, J. A.; ANSETHC, K. S. Progress in material design for biomedical applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 112, n. 47, , p. 14444-14451. 2015. DOI: [10.1073/pnas.1516247112](https://doi.org/10.1073/pnas.1516247112). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26598696/>. Acesso em: 30 maio 2020.

UKONG, S.; AMPAWONG, S.; KENGKOOM, K. Collagen measurement and staining pattern of wound healing comparison with fixation and stain. **Journal of Microscopy Society of Thailand**, v. 22, p. 37-41. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Sumate\\_Ampawong/publication/285320102\\_Collagen\\_measurement\\_and\\_staining\\_pattern\\_of\\_wound\\_healing\\_comparison\\_with\\_fixations\\_and\\_stains/links/585c6dde08ae8fce48fad0a6/Collagen-measurement-and-staining-pattern-of-wound-healing-comparison-with-fixations-and-stains.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sumate_Ampawong/publication/285320102_Collagen_measurement_and_staining_pattern_of_wound_healing_comparison_with_fixations_and_stains/links/585c6dde08ae8fce48fad0a6/Collagen-measurement-and-staining-pattern-of-wound-healing-comparison-with-fixations-and-stains.pdf). Acesso em: 12 fev. 2020.

VIJAYAN, A. *et al.* Multiple cargo deliveries of growth factors and antimicrobial peptide using biodegradable nanopolymer as a potential wound healing system. **Int. J. Nanomedicine**. v. 14, p. 2253-2263. 2019. DOI: 10.2147/IJN.S190321. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6445221/>. Acesso em: 30 abr. 2020.

WANG, R. M.; CHRISTMAN, K. L. Decellularized myocardial matrix hydrogels: in basic research and preclinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 96, p. 77–82, 2016. DOI: 10.1016/j.addr.2015.06.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26056717/> Acesso em: 13 maio 2020

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 30, n. 30, p. 5897-5909. 2009. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2009.07.027](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19651435/>. Acesso em: 21 maio 2020.

WILLIAMS, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 35, n. 38, p 10009-10014. 2014. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2014.08.035](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.035). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25263686/>. Acesso em: 10 ago. 2020.

WOLF, M. T. *et al.* A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7028–7038, 2012. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2012.06.051](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.051). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22789723/> Acesso em: 14 jul. 2020.

XU, Y. *et al.* Preparation and characterization of bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 103, n. 3, p. 670-678, 2015. DOI: [10.1002/jbm.b.33231](https://doi.org/10.1002/jbm.b.33231). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25045062/>. Acesso em: 10 set. 2020.

YANG, D. *et al.* The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering. **Materials Science & Engineering**. v.104, p.109907, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109927>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119311130?via%3Dihub>. Acesso em: 26 maio 2022.

YU, Y. *et al.* Decellularized scaffolds in regenerative medicine. **Oncotarget**, v. 7, n. 36, p. 58671–58683, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.10945. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5295461/>. Acesso em: 22 fev. 2019.

## 6. APÊNDICE

### Apêndice 1

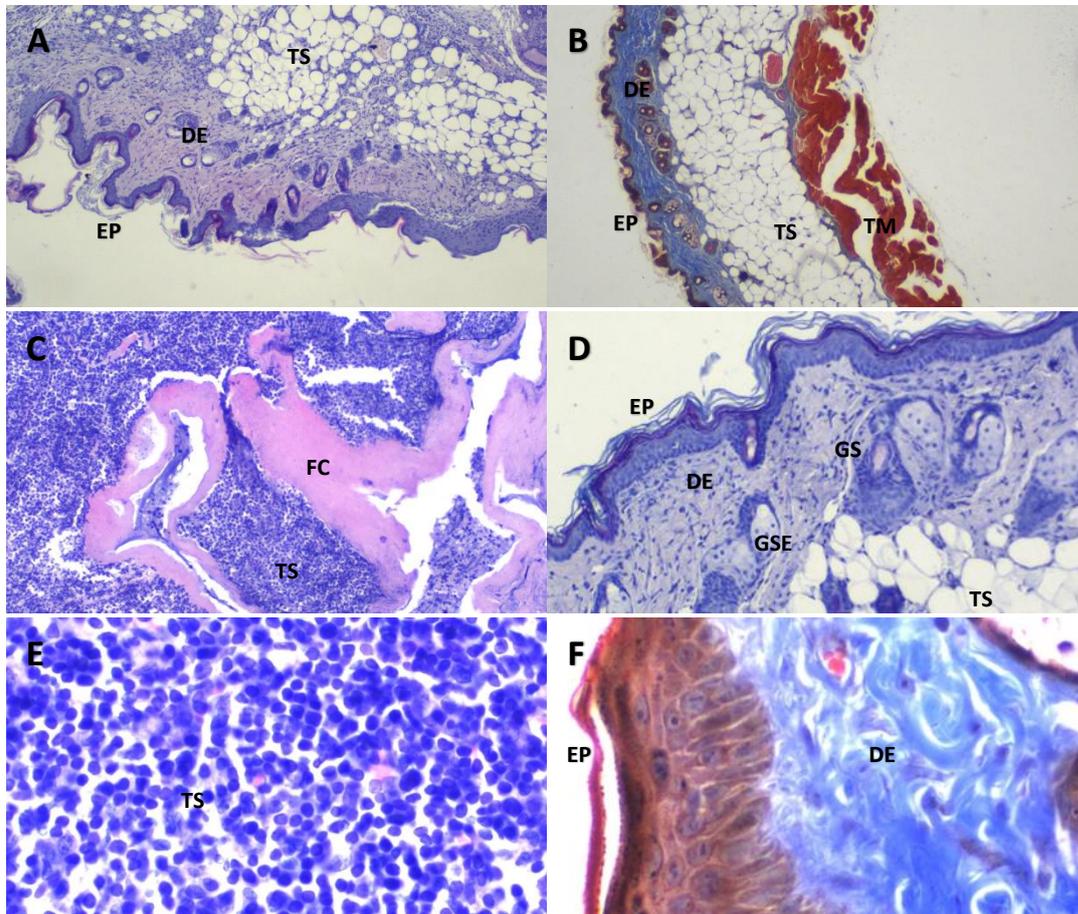


Figura 5 Fotomicrografia da pele e tela subcutânea de camundongos coradas em H&E(A, C, D e E) e *Tricromo de Masson* (B e F), do terceiro ao décimo quinto dia de implantação de biomateriais placentários bovinos, na região cervico-escapular do antímero direito (A, C e E). No antímero esquerdo, grupo controle, sem biomaterial (B, D e F) referem-se ao lado esquerdo. Em A, B e F, a epiderme (EP), derme (DE) e tela subcutânea (TS) bem demarcadas, com evidência de folículos pilosos na tela subcutânea (TS) em B. Em C, células inflamatórias circundando as fibras colágenas (FC) do implante. Em D, glândulas sudoríparas (GS), glândulas sebáceas (GSE) na derme, e em E presença de células inflamatórias na tela subcutânea. A e B = 4x; C e D = 10x; E e F = 40x.

## Apêndice 2

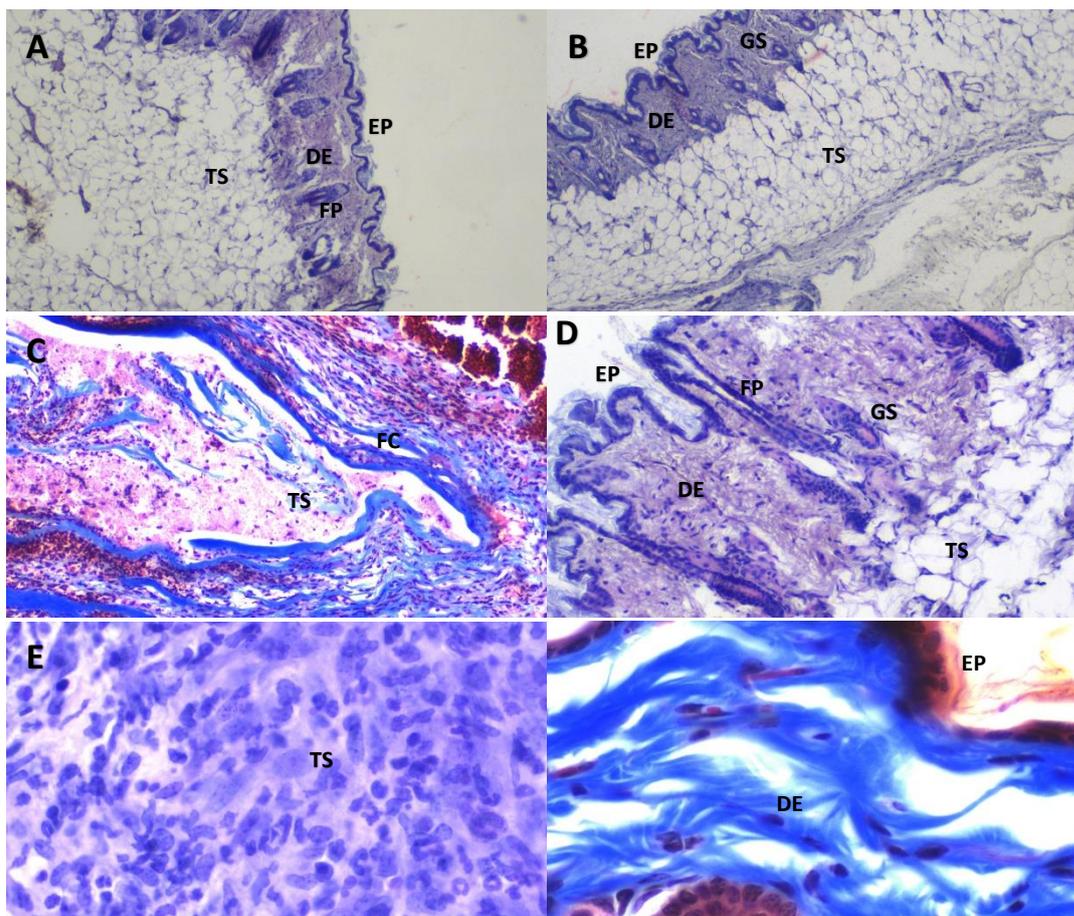


Figura 6. Fotomicrografia da pele e tela subcutânea de camundongos coradas em H& E (A, B, D e E) e *Tricromo de Masson* (C, F), do terceiro ao décimo quinto dia de implantação de biomateriais placentários bovinos, na região cervico-escapular do antímero direito (A, C e E). No antímero esquerdo, grupo controle, sem biomaterial (B, D e F) referem-se ao lado esquerdo. Em A, B, C e D observar a epiderme bem demarcada (EP), derme (DE) e a tela subcutânea (TS). Em B, derme (DE) com glândula sudorípara (GS) evidente. Em C, na tela subcutânea (TS), presença de células inflamatórias circundando as fibras colágenas (FC) do implante. Em D, derme (DE) com folículos pilosos (FP) e glândulas sudoríparas (GS). Em E, na tela subcutânea (TS) há presença de células inflamatórias e deposição de matriz extracelular. Em F, epiderme (EP) e derme (DE) bem demarcadas. A e B = 4x; C e D = 10x; E e F = 40x.

### Apêndice 3

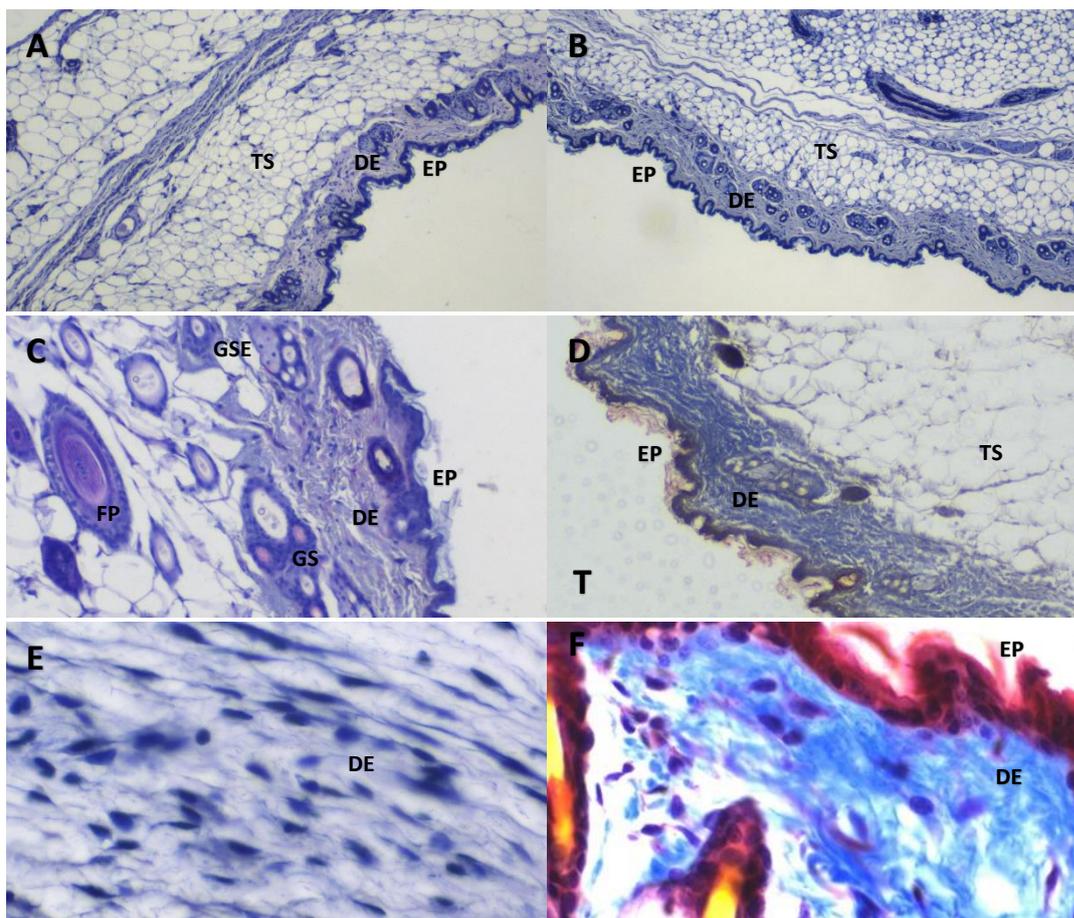


Figura 7 Fotomicrografia da pele e tela subcutânea de camundongos coradas em H&E (A, B, C, D e E) e *Tricromo de Masson* (F), do terceiro ao décimo quinto dia de implantação de biomateriais placentários bovinos, na região cervico-escapular do antímero direito (A, C e E). No antímero esquerdo, grupo controle, sem biomaterial (B, D e F) referem-se ao lado esquerdo. Em A, B e D observar epiderme (EP), derme (DE) e a tela subcutânea (TS) bem demarcadas. Em C, ausência de células inflamatórias na tela subcutânea (TS), a presença de glândula sudorípara (GS) e glândula sebácea (GSE) na derme (DE), epiderme (EP) bem demarcada. Em E, na tela subcutânea (TS) há predominância de fibroblastos auxiliando na deposição de matriz extracelular e ausência de células inflamatórias. Em F, epiderme (EP) e derme (DE) evidenciadas. A e B = 4x; C e D = 10x; E e F = 40x.

## ANEXO 1 Certificado CEUA



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Biocompatibilidade in vivo de scaffold de placenta de bovinos em camundongos.", protocolada sob o CEUA nº 8641130720 (ID 000174), sob a responsabilidade de **Gentil Ferreira Gonçalves e equipe; Gabrielle Coelho Freitas; Fabiana Elias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEUA/UFFS) na reunião de 11/09/2020.

We certify that the proposal "In vivo biocompatibility of bovine placenta scaffold in mice.", utilizing 30 Heterogenics mice (30 males), protocol number CEUA 8641130720 (ID 000174), under the responsibility of **Gentil Ferreira Gonçalves and team; Gabrielle Coelho Freitas; Fabiana Elias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of South Border (CEUA/UFFS) in the meeting of 09/11/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2020 a 07/2022**      Área: **Medicina Veterinária**

Origem:	<b>Aplicável ao Biotério</b>		
Espécie:	<b>Camundongos heterogênicos</b>	sexo:	<b>Machos</b>
		idade:	<b>3 a 8 meses</b>
		N:	<b>30</b>
Linhagem:	<b>Swis</b>	Peso:	<b>40 a 60 g</b>

Local do experimento: Dependências e laboratórios da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU), Campus Realeza da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Realeza, 17 de junho de 2022

Profa. Dra. Gabrielle Coelho Freitas  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Fronteira Sul

Profa. Dra. Susana Regina de Mello Schlemper  
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Fronteira Sul