

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

VITOR EDUARDO MAMGUÊ<sup>1</sup>, AMANDA KNORST BELLON<sup>2</sup>, ANA LETÍCIA  
MARQUES<sup>2</sup>, RAFAEL LUAN PERIN<sup>2</sup>, GENTIL FERREIRA GONÇALVES<sup>3</sup>,  
PATRICIA ROMAGNOLLI<sup>4</sup>

### 1 INTRODUÇÃO

Quando um animal sofre um ferimento cutâneo grave, é necessária a cobertura adequada da lesão, visando o fechamento tanto para prevenção contra infecções e maiores traumas, quanto para que ocorra a cicatrização adequada. Normalmente, essa cobertura é realizada por meio do emprego de enxertos de pele autólogos, entretanto, esse tratamento não é adequado para pacientes em que a lesão resultou em perdas extensas da derme, uma vez que a disponibilidade é limitada (FARROKHI et al., 2018). Ainda, ao considerar-se a utilização de enxertos homólogos ou enxertos heterólogos/xenogênicos, com vantagens acerca da disponibilidade, a utilização desses materiais é associada ao desencadeamento de resposta imunológica exacerbada, fazendo com que o organismo receptor rejeite a presença do enxerto e, conseqüentemente, aumentando os danos ao paciente (BLAUDEZ, 2020).

Dessa forma, a utilização de biomateriais acelulares, compostos pela matriz extracelular (MEC), conhecidos como *scaffolds*, se apresenta como uma alternativa para esses casos, visto que o biomaterial acelular não somente realiza a cobertura da lesão, como também permite o crescimento de uma nova e funcional camada de pele. Isso se dá devido a estrutura e aos constituintes principais da MEC que proporcionam o estímulo à regeneração tecidual, fornecendo aporte físico necessário para agregação, diferenciação e proliferação de novas células (BROWN; BADYLAK, 2014; SOMUNCU, 2019).

Tais *scaffolds* podem ser produzidos pelo processo de descelularização, cujo objetivo é a remoção do material celular presente em determinado tecido, por meio da utilização de métodos físicos, químicos ou enzimáticos, bem como da combinação de dois ou mais desses

---

1Graduando do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: vitor.mamgue.v@gmail.com

2Graduando do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

3 Prof. Dr. da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza – contato: gentil.goncalves@uffs.edu.br

4Profa. Dra. da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, **Orientadora.**

(GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Em consequência da crescente aplicação desses *scaffolds* para o tratamento de lesões, diversas técnicas para descelularização são elaborados e submetidos a testes de validação. Assim, é de grande importância o desenvolvimento de um protocolo que remova o material celular do tecido, inativando todo o potencial imunogênico do enxerto, ao passo que preserve a composição estrutural da MEC, visando promover a regeneração do tecido lesionado (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; GARRETA, 2017; BLAUDEZ, 2020; OLGA, 2021).

## 2 OBJETIVOS

Padronizar protocolo de descelularização para produção de modelos experimentais de *scaffolds* dérmicos caninos para uso em terapias regenerativas.

## 3 METODOLOGIA

A coleta das amostras foi realizada por meio da tricotomia e posterior dissecação da pele da região dorsal de um canino em fragmentos de 4 cm<sup>2</sup>. Após essa coleta, as amostras foram divididas em dois grupos, sendo o primeiro submetido ao processo de descelularização e o segundo mantido em fixador paraformaldeído 4% (PFA 4%) para controle e comparação.

O primeiro grupo passou por três lavagens por imersão em tampão fosfato-salino (PBS) contendo antibiótico a 1% (ATB 1%), sendo deixados por cinco minutos em cada, sob temperatura ambiente e agitação orbital (135 rpm). Após a lavagem, as amostras foram submetidas ao protocolo de descelularização, que consistiu na imersão dos fragmentos em solução de dodecil sulfato de sódio 1% (SDS 1%) contendo ATB 1%, sob agitação orbital (135 rpm) em temperatura ambiente, por cinco dias.

Posteriormente, a epiderme desses fragmentos foi removida mecanicamente com auxílio de um microscópio estereoscópico. Em seguida, as amostras foram novamente submetidas à lavagem com SDS 1% por 12 horas. Durante esse processo, foram realizadas trocas da solução a cada 12 horas. Ao término dessa etapa, as amostras foram imersas em solução de Triton X-100 1% com ATB 1%, sob agitação orbital (300 rpm) e temperatura ambiente, por 48 horas, para remoção do SDS residual e finalização da descelularização. Durante essa etapa, também foram realizadas trocas de solução a cada 12 horas.

Em seguida, as amostras foram submetidas a três lavagens em solução de PBS + ATB 1%, por 15 minutos cada, em temperatura ambiente e agitação orbital (135 rpm), para

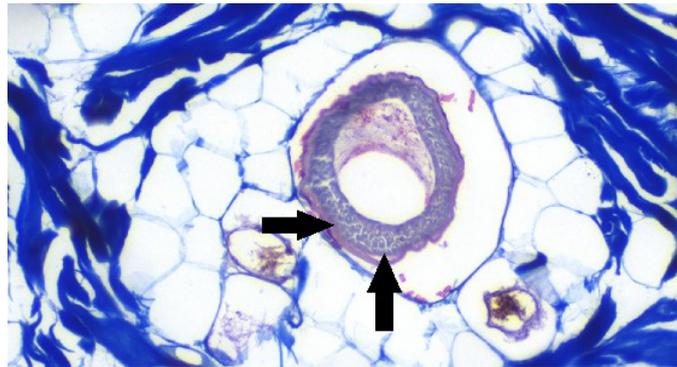
remoção do detergente residual. Ainda, realizou-se o processo de esterilização, em que as amostras foram submetidas a irradiação com luz ultravioleta, em câmara de fluxo laminar, por duas horas em repouso.

Ao final, os *scaffolds* foram fixados em paraformaldeído 4% (PFA 4%), por 24 horas e submetidos a diferentes análises histológicas para observação de sua estrutura, composição e validação como biomaterial acelular. Para a realização da análise histológica, as amostras foram desidratadas, diafanizadas, incluídas em blocos de parafina e seccionadas à 4 µm. Após dispostas em lâmina histológica, foram submetidas à coloração em Hematoxilina-Eosina, para visualização de núcleos celulares e de Tricromo de Masson, para avaliação da estrutura e preservação da MEC. Os resultados foram analisados e fotodocumentados em microscopia óptica de luz, com o auxílio de uma câmera acoplada e ligada a um computador.

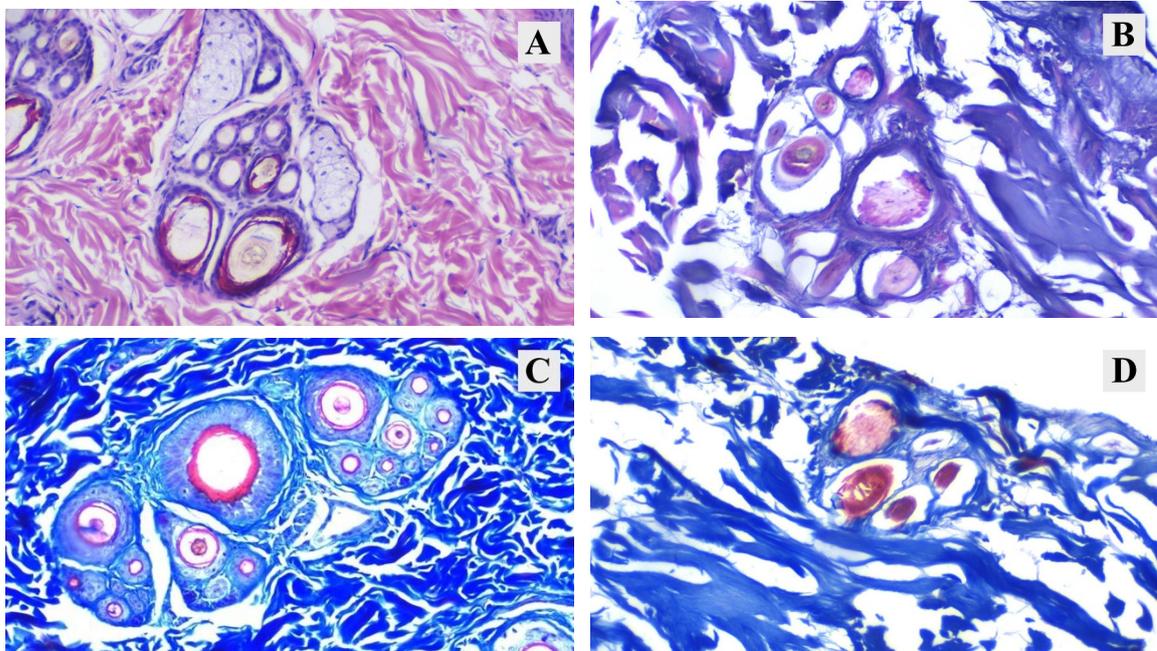
#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após avaliação histológica, os *scaffolds* apresentaram significativa redução na quantidade de núcleos celulares visíveis quando comparada com a histologia da pele *in natura*, entretanto é possível notar a presença de resquícios celulares no tecido, que permaneceram principalmente no entorno dos folículos pilosos presentes no tecido (FIGURA 1). Essa incompleta remoção celular se deve possivelmente à presença da epiderme em parte do processo, visto que estudos relatam que ela pode interferir no processo, uma vez que se comporta como um tecido mais resistente às diferentes agressões e, dessa forma, dificultando a absorção das soluções pela amostra (CHEN, *et. al.* 2004).

Apesar da remoção celular, ambas as colorações evidenciaram grande espaçamento entre as fibras de colágeno nos tecidos descelularizados, indicando que o tecido sofreu alterações na quantidade e conformação dos componentes da matriz extracelular (FIGURA 2). Tais alterações presentes na MEC podem ser justificadas pela utilização e tempo de permanência no SDS. Apesar de sua efetividade na remoção celular, é relatado que a presença de um detergente iônico pode levar à ruptura da estrutura tecidual nativa, resultando em diminuição na concentração de glicosaminoglicanos (GAGs) e danos às fibras de colágeno (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; GRATZER, HARRISON; WOODS 2006).



**Figura 1.** Derme canina descelularizada (*scaffold*). Observa-se acentuada presença de estruturas celulares (setas) ao redor de um folículo piloso. Coloração: Tricromo de Masson. Aumento de 10X



**Figura 2.** Derme canina *in natura* (A, C) e descelularizada (B, D). Observa-se, ao comparar a celularidade com o tecido *in natura* (A, C), que houve significativa redução do conteúdo celular, bem como considerável espaçamento entre as fibras colágenas do tecido que fora submetido ao processo de descelularização (B, D). Coloração: Hematoxilina e Eosina (A, B) e Tricromo de Masson (C, D). Aumento de 10X.

## 5 CONCLUSÃO

Na presente pesquisa constatou-se que o protocolo utilizado promoveu significativa remoção celular, entretanto evidenciou consideráveis alterações estruturais na matriz extracelular. Pode-se presumir que tais alterações ocorreram em função do tempo de

permanência das amostras no detergente iônico, fazendo-se necessária a remoção da epiderme anterior à descelularização. Ademais, observa-se exacerbada presença de folículos pilosos com restos celulares no tecido, indicando a necessidade de remoção dos mesmos. Dessa forma, os resultados demonstram a necessidade de adaptações acerca de algumas etapas, como a coleta e preparação das amostras, bem como o tempo de exposição aos reagentes utilizados no processo de descelularização da pele.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BLAUDEZ, F. et al. An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration. **Methods**, v. 171, p. 28-40, 2020.
- BROWN, B. N.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Translational Research*, v. 163, n. 4, p. 268–285, 2014.
- SOMUNCU, Ö. S. Decellularization concept in regenerative medicine. **Cell Biology and Translational Medicine**, Volume 6, p. 71-85, 2019.
- GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.
- GARRETA, E. et al. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. **Materials Today**, v. 20, n. 4, p. 166-178, 2017.
- OLGA, M. et al. Comparative analysis of the skin decellularization methods. **The Moldovan Medical Journal**, v. 64, n. 2, p. 79-86, 2021.
- CHEN, R. et al. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 25, n. 13, p. 2679-2686, 2004.
- GRATZER, P; HARRISON, R; WOODS, T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. **Tissue engineering**, v. 12, n. 10, p. 2975-2983, 2006.

**Palavras-chave:** Pele; Matriz Extracelular; Biomaterial; Engenharia de tecidos; Medicina Regenerativa;

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2020-0407

**Financiamento** UFFS