

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

ANA LETÍCIA R. MARQUES^{1,2*}, VITOR E. MAMGUÊ^{2,3}, AMANDA K. BELLON^{2,4},
LEONARDO GRUCHOUSKEI^{2,5}, PATRÍCIA ROMAGNOLLI^{2,6}

1 Introdução

A pele atua como agente de proteção mecânica e de manutenção hidroeletrólítica e termorregulação corporal (DUSOYER; MICHPOULOU; ROUSSELLE, 2020), sendo constituída por epiderme e derme (GHETTI *et al.*, 2018). Como primeira linha de defesa do organismo, inúmeras lesões e afecções podem acometer a pele, muitas representando desafios clínico-cirúrgicos pela complexidade dos tratamentos requeridos para sua recuperação (BROUKI MILAN *et al.*, 2020; TAYLOR *et al.*, 2018). A terapia comum para lesões de pele é o enxerto, porém, sendo de difícil disponibilidade o tecido autógeno e reconhecida rejeição de tecido alógeno/xenógeno (PÉREZ *et al.*, 2021).

A Medicina Regenerativa, portanto, busca desenvolver materiais que substituam o uso de enxertos de pele, como os *scaffolds* (HSIEH *et al.*, 2021), que podem ser obtidos por descelularização, como é o caso dos de matriz dérmica, livres de material genético que induza resposta imune no organismo receptor (TAYLOR *et al.*, 2018). Ainda, *scaffolds* biológicos se assemelham em forma e estrutura ao tecido a ser substituído, sendo adequados para a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (PÉREZ *et al.*, 2021).

A descelularização pode ser realizada por métodos físicos, químicos e/ou enzimáticos, cuja eleição depende de características do tecido alvo (PÉREZ *et al.*, 2021). Contudo, para ser acessível ao uso terapêutico requer a padronização do protocolo adequado (MACAGONOVA *et al.*, 2021). Desta forma, frente a disponibilidade de doadores de cadáveres caninos, objetivou-se otimizar um protocolo para descelularização de pele de cães, avaliando os efeitos do uso de diferentes soluções de lavagem prévia para produção de *scaffolds* dérmicos caninos, e seu potencial para uso em terapias regenerativas.

1 Graduanda do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: ana.marques@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa:

3 Mestrando do Programa de Pós-graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: ana.marques@estudante.uffs.edu.br

4 Graduanda do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza

5 Me. Técnico Educação em Anatomia e Necropsia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza

6 Prof. Dra. da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, **Orientador(a)**.

2 Objetivos

Padronizar um protocolo de descellularização de pele canina para produção de *scaffolds* biológicos, com ênfase na avaliação dos efeitos de NaCl e EDTA anterior à descellularização sobre a remoção celular.

3 Metodologia

As atividades foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) (Nº 7027300719), e realizadas na Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) do *Campus* Realeza. As amostras, obtidas de cadáveres de cães doados à SUHVU, foram coletadas de áreas isentas de lesões, e submetidas a antissepsia e completa remoção dos pelos. Foi utilizada pele da região dorsal do tronco, removida por dissecação, em fragmentos de 2 cm², organizados em grupos de lavagem G1, G2 e G3 e grupo controle G4, com 10 fragmentos cada.

A lavagem foi feita por imersão em soluções tampão fosfato-salino (PBS) para G1, cloreto de sódio (NaCl) para G2 e ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para G3, sob agitação orbital (135 rpm) e temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida, foram esterilizadas em luz ultravioleta (UV) por 2 horas. As amostras de G1, G2 e G3 foram descellularizadas usando solução de SDS 1% + ATB 0,5% por 5 dias (D1 a D5), seguido de solução de Triton X-100 1% + ATB 0,5% por 2 dias (D6 e D7). Ao final, as amostras foram lavadas em PBS + ATB 0,5% por 5 minutos para remoção de detergente residual e esterilizadas em luz UV por 2 horas. As soluções detergentes eram trocadas a cada 12 horas, todo o processo realizado sob agitação orbital (135 rpm) e temperatura ambiente.

Amostras de G1, G2, G3 e G4 foram fixadas em solução de paraformaldeído 4%, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram então seccionadas (4 µm), posicionadas em lâminas e coradas em hematoxilina e eosina (HE) e Tricromo de Massom (TM), para análise da ausência de núcleos celulares e preservação estrutural da MEC, respectivamente (BARRETO *et al.*, 2018; FEDONIUK *et al.*, 2021). Ao final, os tecidos foram analisados e microfotografados em microscópio óptico de luz.

4 Resultados e Discussão

A análise histológica da pele nativa (G4) demonstrou a epiderme formada por tecido epitelial e estrato córneo, com derme composta por elementos celulares, fibras colágenas e elásticas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas e vasos sanguíneos (Figura 1 A e E).

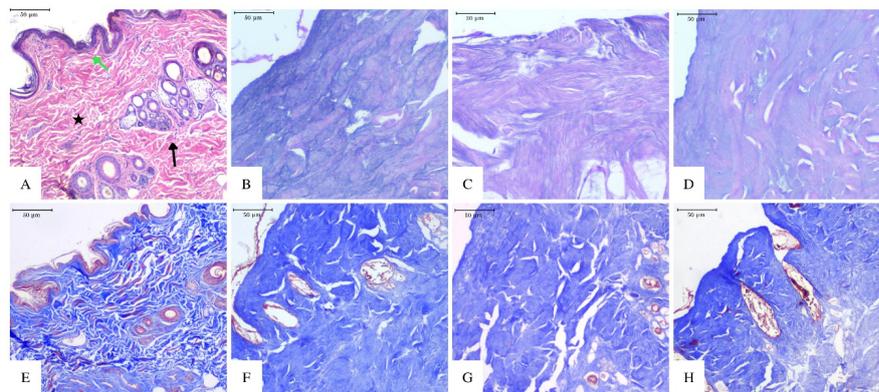


Figura 1. Histologia da pele canina nativa (A e E) e descelularizada (B-D e F-H). (A) Pele nativa com epiderme composta por tecido epitelial (seta verde), derme por fibras colágenas (estrela) e anexos como folículos pilosos, glândulas e vasos (seta preta); pele descelularizadas, com ausência de núcleos celulares visíveis e abundante matriz extracelular, submetidas a lavagem pré-descelularização com NaCl (B e F); com EDTA (C e G); e com PBS (D e H). A - D: H&E, 50 μ m; E - H: TM, 50 μ m.

Constatada normalidade da composição e conformação, o tecido coletado foi considerado adequado para o experimento (GHETTI *et al.*, 2018).

O uso de EDTA na descelularização prevê ruptura da adesão celular e prevenção da degradação da MEC por proteases teciduais (DUSOYER; MICHOPULOU; ROUSSELLE, 2020). Já o uso de NaCl anterior à descelularização resultou em ruptura das membranas celulares nas amostras do G2 e promoção da lise celular, o que ocorreu nas amostras tratadas com EDTA e PBS apenas entre D4 e D7. O resultado se semelha ao de Hashemi *et al.* (2018), que encontram no NaCl a melhor solução para remoção da barreira mecânica representada pela epiderme, contribuindo para a eficácia da descelularização (MACAGONOVA *et al.*, 2021). Na histologia foi constatada a ausência da epiderme, confirmando seu desprendimento nas amostras descelularizadas (Figura 1 B-D e F-H).

A MEC possui componentes indispensáveis para aplicação clínico-cirúrgica de *scaffolds*, favorecendo migração, adesão e proliferação celular, o que permite adequada regeneração tecidual após seu implante *in vivo* (GHETTI *et al.*, 2018; HSIEH *et al.*, 2021). O

protocolo de descclularização desta pesquisa utilizou detergentes empregados em estudos similares (BARRETO *et al.*, 2018; BROUKI MILAN *et al.*, 2020; TAYLOR *et al.*, 2018). Os detergentes afetam as membranas celulares e removem restos celulares dos tecidos, sendo considerados um método acessível, de simples aplicação e eficazes para descclularização (PÉREZ *et al.*, 2021). O SDS elimina o material genético e resíduos do tecido, mas pode alterar as proteínas estruturais e de sinalização da MEC se aplicado por longos períodos e altas concentrações. O Triton X-100, por sua vez, é considerado insuficiente para a remoção celular, porém, preserva componentes da MEC e auxilia na remoção de SDS residual (DUSSOYER; MICHOPPOULOU; ROUSSELLE, 2020; MACAGONOVA *et al.*, 2021)

Após a descclularização, foi observado clareamento e diminuição da consistência das amostras, em comparação a pele nativa (Figura 2). São alterações esperadas para tecidos descclularizados e indicativas da eficiente remoção do conteúdo celular (BARRETO *et al.*, 2018; BROUKI MILAN *et al.*, 2020). A descclularização obteve êxito em G1, G2 e G3, visto que na MEC descclularizada foi observada tanto a ausência de núcleos celulares, quanto a preservação de suas fibras estruturais (Figura 1 B-D e F-H) (FEDONIUK *et al.*, 2021).

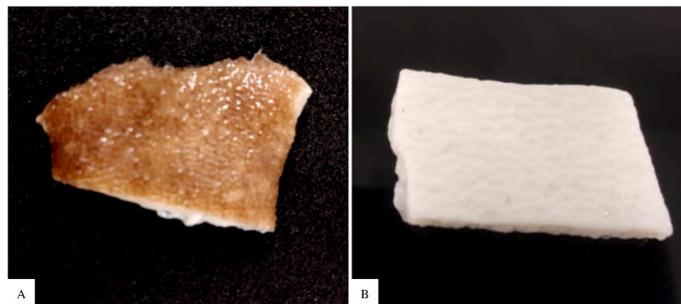


Figura 2. Pele canina nativa (A) e descclularizada (B). Observa-se a significativa alteração na coloração entre o tecido nativo (A) e o tecido submetido ao protocolo de descclularização (B), o que indica a remoção do conteúdo celular e da epiderme.

5 Conclusão

O estudo demonstrou que a pele canina possui abundante matriz extracelular, configurando-se como um modelo experimental viável para a produção de *scaffolds* dérmicos. Além disso, o uso de NaCl anteriormente à sua descclularização diminuiu o tempo de remoção da epiderme durante a descclularização, favorecendo protocolos mais rápidos, com menos utilização de reagentes e mais acessíveis, uma vez que o NaCl apresenta baixo custo e ampla disponibilidade comercial. Em suma, o protocolo de descclularização utilizado é eficaz

para produção de *scaffolds* dérmicos caninos, uma vez que eliminou células e seus conteúdos e preservando as características estruturais da matriz extracelular.

Referências Bibliográficas

- BARRETO, R. Da S. N. *et al.* Decellularized bovine cotyledons may serve as biological scaffolds with preserved vascular arrangement. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 13 abr. 2018. v. 12, n. 4, p. e1880–e1888.
- BROUKI MILAN, P. *et al.* Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery. **Methods**, jan. 2020. v. 171, n. February 2019, p. 62–67.
- DUSSOYER, M.; MICHPOULOU, A.; ROUSSELLE, P. Decellularized Scaffolds for Skin Repair and Regeneration. **Applied Sciences**, 15 maio. 2020. v. 10, n. 10, p. 3435.
- FEDONIUK, L. Y. *et al.* MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ACELLULAR DERMAL MATRIX MANUFACTURING. **Wiadomości Lekarskie**, mar. 2021. v. 74, n. 3, p. 418–422.
- GHETTI, M. *et al.* Subpopulations of dermal skin fibroblasts secrete distinct extracellular matrix: implications for using skin substitutes in the clinic. **British Journal of Dermatology**, 16 maio. 2018. v. 179, n. 2, p. 381–393.
- HASHEMI, S.-S. *et al.* Biochemical Methods in Production of Three-Dimensional Scaffolds from Human Skin: A Window in Aesthetic Surgery. **World journal of plastic surgery**, 2018. v. 7, n. 2, p. 204–211.
- HSIEH, D.-J. *et al.* Protocols for the preparation and characterization of decellularized tissue and organ scaffolds for tissue engineering. **BioTechniques**, fev. 2021. v. 70, n. 2, p. 107–115.
- MACAGONOVA, O. *et al.* Comparative analysis of the skin decellularization methods. **The Moldovan Medical Journal**, maio. 2021. v. 64, n. 2, p. 79–86.
- PÉREZ, M. L. *et al.* Fast protocol for the processing of split-thickness skin into decellularized human dermal matrix. **Tissue and Cell**, out. 2021. v. 72, n. June, p. 101572.
- TAYLOR, D. A. *et al.* Decellularized matrices in regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, 1 jul. 2018. v. 74, p. 74–89.

Palavras-chave: Descelularização. Pele. Matriz Extracelular. Engenharia de Tecidos.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2021-0424.

Financiamento: Fundação Araucária.