

ARTHUR RODRIGUES MARTINS

Recelularização de derme de rato Wistar

São Paulo

2019

ARTHUR RODRIGUES MARTINS

Recelularização de derme de rato Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Cirurgia - VCI

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Dra. Paula Fratini

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2010

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3863
FMVZ

Martins, Arthur Rodrigues
Recelularização de derme de rato Wistar / Arthur Rodrigues Martins. – 2019.
48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Fratini.

1. Pele. 2. Scaffold. 3. Recelularização. 4. Descelularização. 5. Matriz extracelular.
I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Recelularização de Derme de Rato Wistar", protocolada sob o CEUA nº 6607100717 (ID 004737), sob a responsabilidade de **Paula Fratini e equipe; Arthur Rodrigues Martins** - 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 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/03/2018.

We certify that the proposal "Dermis Recellularization of Wistar Rat", utilizing 15 Transgenics rats (males and females), protocol number CEUA 6607100717 (ID 004737), under the responsibility of **Paula Fratini and team; Arthur Rodrigues Martins** - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/14/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2017](#) a [12/2018](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Animais provenientes de outros projetos](#)

Espécie: [Ratos transgênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [2 a 10 semanas](#)

N: [15](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 600 g](#)

Local do experimento: laboratório de histologia e laboratório de cultivo celular do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

São Paulo, 23 de outubro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTINS, Arthur Rodrigues

Título: **Recelularização de derme de rato Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus**, criador do universo e de todas as vidas nele presentes. Graças a ele pude realizar esse trabalho.

À minha família a quem muito devo e possui grande parte em minha formação pessoal e intelectual, meu pai **Gilberto Martins**, minha mãe **Evanir Martins** e meus irmãos **Ethiani** e **Leonardo Martins**. Não há palavras para agradecer o apoio, parceria e auxílio em todas as minhas decisões. Vocês possuem influência direta em todo o meu trabalho como homem.

À minha namorada **Claudia Flores Minuzi**, que está sempre a me apoiar e mesmo com as intempéries do tempo me auxilia em todas as decisões tomadas, te amo!

À minha orientadora **Paula Fratini** a quem muito devo da minha formação profissional, sempre me ajudando e ensinando o que for preciso, Obrigado!

À professora **Maria Angélica Miglino**, por ter acreditado e me dado a oportunidade de demonstrar meu trabalho nesse breve período.

Ao professor **José Roberto Kfoury** que com suas dicas e serenidade me ensinou que a paciência é a maior virtude em todas as situações.

À Dra. **Rose Eli Rici** por todo o auxílio na parte de imagens, profissionalismo e dedicação juntamente ao **CADI-FMVZ** sempre demonstrando apoio no trabalho efetuado.

Ao **Ronaldo Agostinho da Silva** que por mais rabugento sempre esteve disponível nas horas de precisão.

Aos colegas que me auxiliaram durante o percurso do meu estudo, desde o ingresso até os dias de hoje.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** que sediou minha pesquisa.

À **CAPES**(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por ter auxiliado e financiado meu projeto.

Acima de tudo agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres** pela credibilidade a mim concedida para a realização da minha dissertação de mestrado.

“A evolução do homem passa necessariamente, pela busca do conhecimento.”

Sun Tzu

RESUMO

Martins, A. R., **Recelularização de derme de rato Wistar** [*Wistar mouse dermis recellularization*]. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciências) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As lesões de pele são normais à todas as espécies, independentemente de sexo ou idade. A pele, por ser o maior órgão do corpo e servir de barreira primária às agressões químicas, físicas e biológicas do meio, é a primeira a sofrer lesões e as consequências das mesmas. Em animais estas lesões podem ser devido à brigas, caças e/ou predações e, também, assim como em humanos se tem uma causa muito comum de lesões dérmicas que são queimaduras e carcinomas. Tendo em vista novas técnicas da bioengenharia tecidual, para a recomposição dessas lesões, estudos com resultados significativamente têm se mostrado promissores de formulações de scaffolds biológicos acelulares a partir da descelularização de tecidos. A descelularização tem sua comprovação por uma variada gama de testes como microscopia eletrônica de varredura e testes de DNA genômico residual. Posteriormente o tecido pode passar pelo processo de recelularização utilizando células de interesse, até mesmo do animal que irá receber este tecido, diminuindo os riscos de rejeição e melhorando a resposta ao transplante tecidual. Assim, este projeto visou a realização de testes de descelularização do tecido com a utilização de variados meios químicos e físicos e posteriores testes de eficácia de protocolo seguida da esterilização através desidratação do material e o estabelecimento de um protocolo de recelularização de um scaffold biológico descelularizado oriundo de derme de rato Wistar utilizando nos testes fibroblastos murinos e células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo canino com incubação durante 7 dias. Após testes de eficácia a recelularização do tecido foi comprovada por ensaios de Imunofluorescência e microscopia eletrônica de varredura onde pode-se observar a aderência das células no scaffold biológico comprovando a eficácia dos protocolos utilizados.

Palavras-chave: pele; scaffold; recelularização; descelularização; matriz extracelular

ABSTRACT

MARTINS, A. M. Wistar mouse dermis recellularization [*Recelularização de derme de rato Wistar*]. 48p Dissertação (Mestrado em Ciências) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Skin lesions are normal to all species, regardless of gender or age. The skin, being the largest organ in the body and serving as a primary barrier to the chemical, physical and biological aggressions of the environment, is the first to suffer injuries and their consequences. In animals these injuries may be due to fighting, hunting and / or predation and also as well as in humans there is a very common cause of dermal lesions which are burns and carcinomas. Considering new techniques of tissue bioengineering, for the recomposition of these lesions, studies with significant results have shown promising formulations of acellular biological scaffolds from tissue decellularization. Decellularization is proven by a wide range of tests such as scanning electron microscopy and residual genomic DNA testing. Subsequently the tissue may undergo the recellularization process using cells of interest, even from the animal receiving the tissue, reducing the risk of rejection and improving the response to tissue transplantation. Thus, this project aimed to perform tissue decellularization tests using various chemical and physical media and subsequent protocol efficacy tests followed by sterilization through material dehydration and the establishment of a recellularization protocol of a decellularized biological scaffold from of Wistar rat dermis using murine fibroblasts and mesenchymal stem cells from canine adipose tissue incubated for 7 days. After efficacy tests, the recellularization of the tissue was confirmed by immunofluorescence assays and scanning electron microscopy where the adherence of cells in the biological scaffold can be observed, proving the effectiveness of the protocols used.

Keywords: skin; scaffold; recellularization; decellularization; extracellular matrix

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 ANDAIMES BIOLÓGICOS DÉRMICOS PARA USO EM MEDICINA REGENERATIVA	12
3.2 SCAFFOLDS BIOLÓGICOS E SINTÉTICOS USADOS EM ENGENHARIA DE TECIDOS	14
3.3 MÉTODOS DE DESCELULARIZAÇÃO	16
3.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO	17
3.5 RECELULARIZAÇÃO	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS	19
4.2 PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO	20
4.3 HISTOLOGIA	21
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA _g	22
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	22
4.6 ANÁLISE POR IMUNOFLOURESCÊNCIA – DAPI	22
4.7 ANÁLISE POR IMUNOHISTOPQUÍMICA	23
4.8 PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO DE SCAFFOLDS PARA RECELULARIZAÇÃO	23
4.9 RECELULARIZAÇÃO	24
4.10 MICROSCOPIA CONFOCAL	24
5 RESULTADOS	25
5.1 COLETA E DESCELULARIZAÇÃO DAS DERMES DE RATO WISTAR	25
5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	27
5.3 AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA	29
5.4 IMUNOFLOURESCÊNCIA POR DAPI	30

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	32
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	32
5.7 RECELULARIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE DERME.....	34
6 DISCUSSÃO.....	37
7 CONCLUSÃO.....	39
8 REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Investigar técnicas de tratamento para lesões cutâneas de espessura total, como o uso de enxertos em lesões extensas, aumenta a demanda pela busca de técnicas alternativas que visem prevenir infecções, reduzir a dor do paciente, garantir a cicatrização e reduzir a desidratação corporal (KUMAR et al., 2013; VILLAVEIRAN et al., 2018). A engenharia de tecidos atende a essa necessidade usando scaffolds biológicos derivados da descclularização. Materiais acelulares, como membrana amniótica, xenógrafos dérmicos suínos e aloenxertos de pele cadavérica, são utilizados em cirurgias reconstrutivas, sendo a última mais segura e economicamente mais viável (OBENG et al., 2001; VOIGT et al., 2018).

A engenharia de tecidos baseia-se na correlação entre biologia e química para o desenvolvimento de biomateriais que podem ajudar na reconstrução de uma área lesada de um tecido ou órgão específico. Desta forma, a engenharia tecidual tornou-se conhecida como uma terapia alternativa no campo da medicina regenerativa (GROLL et al., 2016, HUSSEIN et al., 2016, PALONE; SILVA; DALBEN, 2005, GASQUE et al., 2011).

Os biomateriais são definidos como sendo sintéticos ou biológicos (LEONEL et al., 2018). Biomateriais sintéticos são baseados em construções tridimensionais de proteínas ou polímeros sintéticos conjugados a peptídeos que mimetizam as características da matriz extracelular (LUTOLF; HUBBELL, 2005; SILVA; MOONEY, 2004; RAGHAVENDRA et al., 2018). Concomitantemente, materiais biológicos ou scaffolds são derivados de tecidos ou órgãos produzidos por um processo chamado descclularização, cujo objetivo é remover todos os componentes celulares e preservar a atividade biológica, integridade da matriz extracelular, propriedades biomecânicas e organização tridimensional (MORRIS; CHANG; KYRIAKIDES, 2016; GILBERT, 2012; HUSSEIN et al., 2016).

Uma variedade de tecidos e órgãos está sendo estudada atualmente como fonte de scaffolds biológicos, uma vez que a matriz extracelular do tecido descclularizado pode ser usada como um arcabouço na medicina regenerativa, possibilitando transplantes futuros em humanos e animais (DESTEFANI et al., 2017; JANK et al., 2014; MATTEI et al., 2017; MOORE et al., 2015; OBERWALLNER et al., 2014; STABLER et al., 2015).

Dessa forma, nesse trabalho buscamos o estabelecimento de um protocolo eficaz de descelularização de derme de rato Wistar buscando a posterior esterilização e recelularização do scaffold oriundo da primeira etapa. Para a recelularização a utilização de fibroblastos murinos assim como células-tronco mesenquimais de gordura canina visavam a aderência e proliferação celular no scaffold uma vez que esses dois modelos celulares são comuns à pele nativa dos animais mostrando que o scaffold é passível de recelularização e tornando-o uma ferramenta disponível a cirurgias reconstrutivas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Promover a descelularização total, realizar os testes para a visualização da eficácia dos protocolos utilizados, realizar a esterilização do material e estabelecer um protocolo de recelularização de um scaffold de derme de rato Wistar para verificar sua capacidade de adesão e replicação celular.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Descelularização da pele de rato Wistar

2.2.2 Estabelecimento de protocolo de esterilização de scaffold de derme;

2.2.3 Estabelecimento de protocolo de recelularização de derme de rato Wistar utilizando fibroblastos murinos e células tronco de tecido adiposo canino.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SCAFFOLDS BIOLÓGICOS DÉRMICOS PARA USO EM MEDICINA REGENERATIVA

A pele está dentro da diversidade de tecidos e órgãos usados para a descelularização. Recobrimo toda a superfície corpórea, é o maior órgão,

representando até 16% do peso de um indivíduo (SANTOS, 2017; BHARDWAJ; CHOUHAN; MADAL, 2018). A pele separa o organismo do ambiente externo e é dividida em duas camadas: a derme, originada do mesoderma, e a epiderme, originada do ectoderma (MENDONÇA & RODRIGUES, 2011; STOCCO; SILVA; FARIA., 2014; ZHANG et al., 2012; BHARDWAJ; CHOUHAN; MADAL, 2018). Do ponto de vista funcional, a pele oferece proteção contra desidratação, raios UV, lesões, fricção e invasão bacteriana, regula a temperatura corporal, recebe informações do ambiente externo e sintetiza a vitamina D. Ela é constituída externamente pela epiderme e internamente pela pele derme. Abaixo da derme está a hipoderme. Embora essa região não faça parte da pele, ela conecta a pele aos órgãos subjacentes (GARTNER; HIATT, 2014; MAHARLOOEI et al., 2011; BHARDWAJ; CHOUHAN; MADAL, 2018).

A derme, fundida com a hipoderme, corresponde ao tecido conjuntivo que sustenta a epiderme, sendo separado por uma junção irregular. Essa região pode ser dividida em duas outras camadas distintas, a papilar e a reticular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; BHARDWAJ; CHOUHAN; MADAL, 2018). O primeiro é fino, consistindo de tecido conjuntivo frouxo das papilas dérmicas. Essas papilas reforçam a união entre a epiderme e a derme, aumentando a área de superfície de contato entre elas. Esta camada consiste principalmente de fibras de colágeno tipo III e elásticas, que formam uma rede; e colágeno tipo VII, que ancora a lâmina basal à derme (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; GARTNER; HIATT, 2014).

A camada reticular, composta por tecido conjuntivo denso, é mais espessa do que a camada papilar. Seus principais componentes da matriz extracelular são fibras colágenas tipo I, fibras elásticas e proteoglicanos dermatan sulfato (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; SMITH; MELROSE, 2015). Devido às fibras colágenas e elásticas, a derme é flexível e resistente a altos níveis de deformação por alongamento e reorganização dessas fibras, atribuindo as características mecânicas da pele (TEREZINI et al., 2016).

Dado que a pele é a primeira linha de defesa do corpo, é necessário entender como é importante a sua integridade para que o corpo responda adequadamente aos agentes agressivos. (STOCCO; SILVA; FARIA, 2014). Traumas violentos, feridas crônicas e intervenções cirúrgicas são fatores que podem causar perda de pele (KUMAR et al., 2013). Quando a lesão tem seu tecido regenerativo epitelial (lesões cutâneas de espessura total) completamente removido, o uso de enxertos é

necessário, uma vez que nenhuma regeneração espontânea pode ser alcançada (KUMAR et al., 2013; WU et al., 2015).

As feridas abertas têm um alto risco de contaminação e têm períodos de cicatrização prolongados, o que requer que essa condição seja resolvida da forma mais rápida e eficiente possível (SANTOS, 2006; BHARDWAJ; CHOUHAN; MADAL, 2018). A escassez de materiais de enxertia, devido ao número limitado de doadores, e a inexistência de um banco de pele acessível dificultam o uso de enxertos de pele em cirurgias reconstrutivas (GILPIN; YANG, 2017, FRANCO et al., 2015; LABUS et al., 2017). Uma ferramenta alternativa para superar a escassez de tecido transplantado tem sido procurada há muito tempo. O primeiro relato de enxertos de tecidos transplantados é datado de 1920. (ANDREW; LAM; LAU, 2002). A derme descelularizada, um material mecanicamente resistente, apresenta boa resposta à adesão e infiltração celular e apresenta baixo risco de inflamação e imunorreação, permitindo sua utilização como arcabouço biológico para aplicação clínica em medicina regenerativa (MATSUSHIMA et al., 2013; LABUS et al., 2017).

3.2 SCAFFOLDS BIOLÓGICOS E SINTÉTICOS USADOS EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Com a evolução da engenharia de tecidos, scaffolds sintéticos e biológicos surgiram para serem usados em cirurgias reconstrutivas com o auxílio das técnicas atuais. O primeiro teste realizado em 1974 demonstrou o uso de fragmentos de pele recelularizada com um procedimento demorado. Para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, é necessário um melhor entendimento das técnicas utilizadas.

Em grandes áreas de lesão, onde as peles novinhas são deixadas para remoção, materiais de outros doadores ou da mesma espécie são usados. Esta técnica de aloenxerto tem problemas com imunorreação. No entanto, a ECM descelularizada pode não ter esse problema e pode ajudar a proteger contra infecções, desidratação e hipotermia. O risco de rejeição total do aloenxerto deve ser considerado, como: transmissão da doença, alto custo e possível sensibilização do paciente. Essas considerações são preocupantes, mas atualmente existe uma ampla gama de produtos derivados da derme humana sendo comercializada (Tabela 1) (MAZDEH et al., 2013; MIN et al., 2014; NYAME et al., 2014; VILLAPALOS; ELDARDIRI; DZIEWULSKIP, 2010; LABUS et al., 2017).

O autoenxerto é a primeira opção recomendada para pacientes com pele saudável deixada para extração, suas primeiras descrições datam de 1871 e desde então é utilizado como principal ferramenta em cirurgias cutâneas (VOIGT et al., 2018). Esses enxertos de pele serão tratados *in vitro* para expandir a população de queratinócitos e substituirão a camada epidérmica da pele lesada, permitindo o crescimento do tecido. Esse processo leva de 3 a 4 semanas. Além do alto custo e longo tempo de preparação, o material é frágil e suscetível a infecções bacterianas contra as quais não pode lutar. O transplante de pele requer profissionais qualificados com uma técnica de aplicação meticulosa e precisa. Além disso, o paciente precisa ser imobilizado, para que não haja deslocamento do material implantado (Mocha et al., 2016).

Como os aloenxertos, os equivalentes de pele alogênica também podem ser usados para diminuir o tempo de cicatrização da ferida. Eles são adequados para lesões em que a barreira epidérmica é comprometida, como em pacientes diabéticos com acúmulo de colágeno insuficiente e fraca resposta celular à lesão. Estes substitutos são os mais próximos da pele natural e são comercialmente disponíveis. Fatores de crescimento e citocinas estimulam a formação de cicatriz no tecido lesionado. Apesar de seu potencial regenerativo, o alto custo e a necessidade de reaplicar a pele alogênica a cada 4 semanas restringem seu uso (CHUA et al., 2016; NYAME et al., 2014).

Os xenoenxertos são uma alternativa viável considerando-se seu custo relativamente baixo. Além disso, uma grande quantidade de material pode ser prontamente disponível para a cobertura temporária de lesões cutâneas (KWON; MOON, 2017). A pele suína pode isolar a região, ao mesmo tempo que estimula a reepitelização. Após o epitélio regenerar, a pele de porco é separada da lesão (CHEN et al., 2013, JOZSEF et al., 1976; NYEME et al., 2014).

Os materiais sintéticos são outra opção se puderem manter sua estrutura por mais de 3 dias, a fim de promover a migração de fibroblastos, cobertura de células epiteliais e neovascularização. Do lado positivo, esses materiais sintéticos não geram uma reação imunológica, sua composição pode ser determinada, assim como a quantidade de fatores de crescimento e adesão celular que contém (ALRUBAY; ALRUBAIY, 2009; CHUA et al., 2016; HALIM et al., 2010; BHARDWAJ; CHOUHAN; MADAL, 2018). No lado negativo, peles sintéticas não possuem membrana basal e

apresentam uma arquitetura não-nativa, que pode ser biologicamente incompatível (HALIM et al., 2010).

A utilização atual de substitutos biológicos na cicatrização e fechamento de feridas de pele em variadas extensões e profundidades tem sido a mais procurada na medicina regenerativa, principalmente pelo fato da matriz extracelular do tecido biológico fornecer fatores de crescimento celular proporcionando a cicatrização com maior rapidez (BOYCE; LALLEY, 2018; SCARRITT; MURDOCK; BADYLAK, 2019). Os materiais sintéticos são utilizados em feridas de alta contaminação por serem menos propensos a ação dos microrganismos. Porém o tempo de cicatrização se eleva, pois, ele demora cerca de duas semanas a mais para a vascularização ser suficiente a ponto de permitir a migração e manutenção da vida celular, portanto a avaliação de utilização vai depender do médico que realizará o tratamento (BOYCE; LALLEY, 2018; CASTELLANO et al., 2017)

3.3 MÉTODOS DE DESCELULARIZAÇÃO

Métodos físicos, biológicos e químicos podem ser implementados em materiais descelulares, mas a eficiência de cada um desses métodos depende da densidade de tecido, espessura, conteúdo lipídico e celularidade (FU et al., 2014; WALLIS et al., 2004; LABUS et al., 2017). Os métodos físicos são baseados em congelamento e descongelamento, gradientes de pressão e aplicação de ondas sonoras em soluções aquosas. No entanto, os métodos biológicos baseiam-se no uso de enzimas, como nucleases, tripsina e lipases, e no uso de agentes não enzimáticos, como o ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Finalmente, os métodos químicos são baseados no uso de ácidos e bases, soluções hipotônicas e hipertônicas, detergentes e álcool. (RANA et al., 2005; LABUS et al., 2017).

Além disso, os detergentes podem ser classificados como zwitteriônicos, não-iônicos e iônicos (FAULK et al., 2014, LEONEL et al., 2018, WHITE et al., 2017). Esses detergentes solubilizam a membrana celular e nuclear, decompõem a proteína do DNA, resultando na liberação de conteúdos intracelulares e na remoção celular do tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Por um lado, detergentes não-iônicos como Triton X-100 interrompem ligações intermoleculares entre proteínas, DNA, lipídios e lipoproteínas (WHITE et al., 2017). Por outro lado, detergentes iônicos como o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) são mais eficientes na solubilização de membranas

nucléicas e na desnaturação de proteínas nucleicas. No entanto, detergentes do tipo SDS também reduzem a quantidade de glicosaminoglicanos, citocinas e colágenos presentes na matriz extracelular (LEONEL et al., 2018; WHITE et al., 2017). Diferentes protocolos testaram o uso de uma combinação de detergentes juntamente com métodos físicos para mostrar a eficiência da descelularização nos vários tecidos (XU et al., 2014; DUISIT et al., 2017).

Estudos sobre a descelularização da pele porcina utilizam o protocolo de congelamento a -80°C seguido de lavagens em solução salina NaCl 1M, tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético, água deionizada, isopropanol, Triton X-100 e PBS (ZHANG et al., 2016; KWON; MOON, 2017). Outros protocolos de descelularização da pele usam detergentes mais agressivos, como dodecil sulfato de sódio (SDS) em conjunto com agitação orbital para remover a porção de células do tecido. (LIEM et al., 2013; KWON; MOON, 2017; LABUS et al., 2017; DUISIT et al., 2017). Ambos os métodos estabelecidos são eficazes.

3.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO

A matriz extracelular (MEC) tridimensional é formada por uma rede de macromoléculas como proteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e receptores de sinal que promovem a adesão celular (THEOCHARIS et al., 2016). Também é utilizado como marcador bioquímico e biomecânico para diferenciação, proliferação e controle celular (FRANTZ et al., 2010; JARVELAINEN et al., 2009; LABUS et al., 2017; FARROKHI et al., 2018). A composição da MEC descelularizada é basicamente devida à presença de proteínas estruturais, como colágenos e elastinas, glicoproteínas, como fibronectina e laminina, glicosaminoglicanos, como hialurônico, e proteoglicanos responsáveis pelo preenchimento da porção intersticial da matriz (FRANTZ et al., 2010; JARVELAINEN et al., SCHAEFER; SCHAEFER, 2010; FARROKHI et al., 2018) que é necessário analisar para verificar a preservação destes para aplicabilidade em medicina regenerativa.

Para que a pele seja considerada descelularizada, ela deve ser testada com técnicas histológicas. A coloração de tecidos nativos com hematoxilina-eosina (H & E) mostra material nuclear, corado por hematoxilina e fibras colágenas, coradas por eosina, enquanto apenas fibras colágenas são evidenciadas em tecido descelularizado. Além disso, a coloração tricrômica de Masson pode ser usada para

mostrar fibras de tecido conjuntivo no material descelularizado (ZHANG et al., 2016; KWON; MOON, 2017).

Alterações morfológicas e topográficas nas fibras de colágeno entre os arcabouços de matriz extracelular nativa e acelular, podem ser avaliadas usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para afirmar a eficácia do protocolo de descelularização (FARROKHI et al., 2017; LIU et al., 2017).

O conteúdo de DNA genômico (gDNA) da estrutura biológica descelularizada deve ser inferior a 50 ng por mg de tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). O Spin Kit IllustraCells (GE Healthcare) é usado para processar amostras digeridas para quantificação por leitura espectrofotométrica (GILBERT et al., 2009; ZHANG et al., 2016; KWON; MOON, 2017). Além disso, os pares de bases dos fragmentos de DNA restantes devem ser menores que 200 pb (FRATINI et al., 2016; KEANE et al., 2015). Também é importante que a matriz extracelular seja preservada o máximo possível, de modo que o biomaterial possa ser usado como uma ferramenta para a medicina regenerativa veterinária e humana (HOGANSON et al., 2010).

Para avaliar a preservação da MEC, métodos de coloração, como imunohistoquímica e imunocitoquímica, são usados para analisar qualitativamente a presença de proteínas da matriz por coloração de anticorpos. Na pele, essas proteínas são proteínas estruturais, como colágeno e elastina, e glicoproteínas, como laminina e fibronectina. Além disso, as proteínas podem ser avaliadas quantitativamente por espectrometria de massa, que fornece um perfil detalhado de proteínas da MEC (HILL et al., 2015; KULAR; BASU; SHARMA, 2014; KWON; MOON, 2017). Por fim, os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) presentes na pele podem ser medidos por espectrofotometria com um kit comercial baseado na digestão (ZHANG et al., 2016; FARROKHI et al., 2017).

A distribuição de proteínas da matriz extracelular, juntamente com a agregação de imunomarcadores, pode ser analisada com Microscopia Confocal (FARROKHI et al., 2017). A Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) aprimora a visualização ultraestrutural da MEC, gerando uma imagem 2D através da transmissão de elétrons (KULAR; BASU; SHARMA, 2014).

Finalmente, a atividade das metaloproteinases da matriz (MMP) deve ser analisada no ECM, uma vez que desempenha um papel na degradação da MEC. MMPs ativos e seus inibidores teciduais (TIMPS) podem ser detectados através da zimografia. Nesta técnica, o substrato de interesse é copolimerizado com o gel, que

mostra uma banda no peso molecular correspondente ao MMP que o digeriu. Para visualizar o TIMPS, o gel é copolimerizado com metaloproteinases reversas (MMP-R) (BHARDWAJ; CHOUHAN; MADAL, 2018)

3.5 RECELULARIZAÇÃO

A utilização do scaffold recelularizados é uma das porções mais promissoras da engenharia tecidual. Já houveram relatos de diferentes procedimentos e células utilizadas como sementeiras, injeções e perfusão (PORZIONATO et al., 2018) porém os testes clínicos após processo de recelularização ainda são pouco difundidos havendo a necessidade de estudos quanto à resposta do hospedeiro após o implante(CUI; CHAI; YU, 2019).A potencial utilização de células isoladas do tecido do receptor pode trazer vantagens como melhor resposta e diminuição cicatricial principalmente pelo implante não causar resposta imune ao receptor (ABAEGHOU EI et al., 2018; CUI; CHAI; YU, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 12 ratos Wistar, fêmeas, com 60 dias de idade e com peso médio de 200g fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, com aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, n. 6607100717. Estes foram eutanasiados em câmara de CO₂ com posterior deslocamento cervical (CONCEA, 2015).

Após a eutanásia, os animais foram submetidos a retirada de pêlos com a utilização de creme depilatório comercial posterior tricotomia. A pele foi separada em região dorsal e ventral e subdivididas em 6 grupos: dorsal torácica, dorsal lombar e dorsal sacral; ventral peitoral, ventral abdominal e ventral inguinal.

4.2 PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO

O processo foi realizado utilizando-se métodos físicos e químicos de descelularização.

Foram realizados alguns testes utilizando diferentes concentrações de detergentes e detergentes diferentes (tabela 1), estes testes visavam selecionar o melhor resultado de descelularização com a menor degradação de matriz extracelular possível. Todos utilizaram agitação orbital com o material sob imersão. Inicialmente foram realizadas três lavagens com duração de 5 minutos em solução de EDTA 5%, para limpeza de sangue remanescente e mantido em agitação a temperatura ambiente. Os protocolos utilizados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1: Protocolos de descelularização realizados em derme de rato wistar para teste de tempo e eficiência

Protocolo	Descrição
SDS 0,5%	3 lavagens em EDTA com duração de 5 minutos, material em imersão em SDS 0,5% durante 15 dias e 3 lavagens em Triton X-100 durante 5 minutos cada.
SDS 1%	3 lavagens em EDTA com duração de 5 minutos, material em imersão em SDS 1% e 3 lavagens em Triton X-100 durante 5 minutos cada.
SDS Gradual	3 lavagens em EDTA com duração de 5 minutos, material imerso em SDS 0,1% durante 3 dias, 0,3% durante 3 dias, 0,5% durante 3 dias, 0,8% durante 3 dias e 1% durante 6 dias e 3 lavagens em Triton X-100 durante 5 minutos cada.

SDC 2%	3 lavagens em EDTA com duração de 5 minutos, material imerso em solução de SDC a uma concentração de 2% e 3 lavagens em Triton X-100 durante 5 minutos cada.
Glicerol	3 lavagens em EDTA com duração de 5 minutos, material imerso em solução de NaCl 1M durante 24 horas, posteriormente imerso em solução de glicerol 85% durante 18 dias e 3 lavagens em Triton X-100 durante 5 minutos cada.

As amostras descelularizadas foram armazenadas em solução de PBS 1x para posterior recelularização, congeladas e fixadas para análise histológica, microscópica de varredura e DNA genômico.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para análise histológica as amostras controle e descelularizadas foram fixadas em formol 10% por 48h, desidratadas por imersão em série crescente de álcoois e agitação orbital, iniciando com uma seção de álcool 70% por 40 minutos e posteriormente com seções de 40 minutos em álcool 80 e 90% e duas seções com duração de 40 minutos em álcool absoluto. O material foi diafanizado em Xilol I e II por 40 minutos cada e incluído em parafina. Secções de 5 µm, feitas em micrótomo (Leica, RM2125RT), foram transferidas para lâminas de vidro e coradas por colorações de Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômio de Masson para avaliação de presença de núcleo celular e tecido conjuntivo, distinção de celularidade do tecido conjuntivo, observação de tecido muscular e marcação de fibras conectivas, respectivamente.

Para análise histológica também foi utilizado o corte em criostato (Leica CM-1860), onde amostras foram emblocadas em meio tissue-tek O.C.T. compound diluído em PBS 1X com concentração final de 60% e congeladas a -150°C durante 20 minutos. Para a realização das micros secções foram utilizados 20µm para material descelularizado e 25µm para material controle.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA_g

Para quantificação de DNA genômico foi utilizado 30 mg de derme descclularizada e derme controle não descclularizada. Foi utilizado o Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare), de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram digeridas por 2 horas a 56°C com Proteinase K e tampão de lise do kit. As amostras foram purificadas e analisadas por espectrofotometria a 260nm (Nanodrop, ThermoScientific).

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliação de estrutura morfológica e arquitetura tecidual. Para este fim, as amostras de tecido controle e descclularizadas foram fixadas em formol 10% por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram seccionadas e lavadas em ultrassom por um período de 24 minutos, sendo duas lavagens com duração de 2 minutos e quatro lavagens de 5 minutos, em água destilada trocada a cada lavagem. As amostras foram acondicionadas overnight em álcool 70%.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcoois em duas seções de 5 minutos cada, em álcool 80%, duas em álcool 90% e três em álcool absoluto, sendo estas com duração de 10 minutos cada. O álcool da imersão foi trocado a cada seção. Foram transferidas para a câmara de secagem do aparelho de ponto crítico (LEICA EM CPD 300*), em seguida, aderidas sobre a superfície de stubs, utilizando-se cola de carbono, metalizadas com ouro e a análise e foto documentação dos resultados se deu através de microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

4.6 ANÁLISE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA - DAPI

A imunofluorescência com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) foi utilizada para certificar a ausência de núcleos celulares no tecido descclularizado, avaliando, assim, a eficiência do processo de descclularização. A lâmina da amostra foi lavada duas vezes em PBS 1x, colocada em solução DAPI durante aproximadamente 10 minutos e logo após lavada, novamente, em PBS 1x. A lâmina foi coberta com a lamínula e

selada sua base com esmalte e deixada para secar coberta com papel alumínio. Estas foram avaliadas e fotografadas em microscópio Nikon Eclipse 80i.

4.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise imunohistoquímica se deu através da utilização do kit comercial Dako EnVision Flex.

As lâminas foram incubadas em banho maria a 95°C em solução Flex Target Retrieval diluídas 50x durante 20 minutos, posteriormente resfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Realizou-se a lavagem das lâminas com Envision Flex Wash Buffer diluído 20x por 3 minutos e posteriormente o bloqueio com peroxidase utilizando Peroxidase Bloking. O bloqueio foi realizado em câmara úmida a temperatura ambiente e teve a duração de 30 minutos, após o bloqueio as lâminas foram lavadas por três vezes com a utilização de Wash Buffer.

As amostras foram circundadas com caneta hidrofóbica e encubadas por 12 horas em câmara úmida escura 4°C com os anticorpos primários: fibronectina (ab9519), laminina (ab11575), colágeno I (GTX60939) e colágeno III (GTX60940).

Após o tempo de encubação as lâminas foram lavadas com Wash Buffer durante 5 minutos, após a lavagem foi adicionado 2º HRP sobre os cortes e encubadas por 30 minutos em câmara úmida escura a temperatura ambiente.

As lâminas foram secadas novamente e a revelação deu-se através da utilização de 1ml de substrato e 1 gota de cromógeno, utilizando 30 µl por corte. Esta solução foi deixada durante 5 minutos e as lâminas foram enxaguadas com destilada. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina durante 40 segundos, lavadas e montadas com lamínulas. A leitura deu-se em microscopia de luz (Nikon Eclipse 80i).

4.8 PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO DE SCAFFOLDS PARA RECELULARIZAÇÃO

Para realizar a esterilização do scaffold, utilizou-se a imersão dos fragmentos em série crescente de graduação alcoólica iniciando duas lavagens em álcool 80º passando ao álcool 90º e finalizando com quatro lavagens em álcool absoluto, cada

lavagem durou 5 minutos. Após esse procedimento a amostra foi submetida ao aparelho de ponto crítico LEIKA EM CPD 300.

Após a retirada do aparelho de ponto crítico, a amostra é levada ao fluxo laminar e alojada em placas de cultivos estéreis e lavadas por três vezes com a solução de PBS 1X com adição de 1% de estreptomicina e penicilina= durante 5 minutos cada lavagem, submete-se a amostra a imersão em álcool 70° e radiação ultravioleta durante 10 minutos e realiza-se lavagem com a utilização de PBS 1X com adição de 1% de solução de estreptomicina e penicilina. As amostras de fragmentos estéreis são deixadas overnight em meio de cultivo Alpha MEM (LGCBio) com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina-estreptomicina, mesmo meio utilizado para o cultivo das células.

4.9 RECELULARIZAÇÃO

Após a amostra preparada, os scaffolds foram colocados em placas antiaderentes de 12 poços. As células foram tripsinizadas e transferidas de modo a constar 5×10^3 células por poço com scaffold alojadas em estufa de cultivo durante 7 dias. Para este ensaio de recelularização foram utilizados fibroblastos murinos (linhagem NIH 3T3) e células-tronco mesenquimais de gordura de cão. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias.

Após este período as amostras foram lavadas e fixadas para análise.

4.10 MICROSCOPIA CONFOCAL

As amostras recelularizadas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 10 minutos, lavadas três vezes com PBS com a adição de 0,5% de Tween 20 e encubadas com o anticorpo primário pré-diluído em PBS com 1% de BSA, durante 1 hora a 37°C. Lavou-se a amostra por 3 vezes utilizando a solução de PBS e Tween, colocou-se o anticorpo secundário. 1 hora depois lava-se por 3x com a utilização de PBS e Tween, incubou-se com DAPI por 10 minutos, seguido de lavagem em PBS 1X e montagem da lâmina para a leitura.

Para análise confocal foram utilizados os anticorpos primários Vimentina anti-mouse (VM452) para marcação de fibroblastos, elastina (ab9519) para marcação de matriz extracelular e fibronectina anti-rabbit (ab2413) para marcação de fibroblasto e

matriz. Os anticorpos secundários utilizados foram AlexaFluor 488 anti-mouse e AlexaFluor 568anti-rabbit.

5 RESULTADOS

5.1 COLETA E DESCELULARIZAÇÃO DAS DERMES DE RATO WISTAR

O protocolo principal foi escolhido visando obter a manutenção da matriz extracelular a mais íntegra possível assim como a completa descелularização do tecido. Os protocolos que apresentavam resultados insatisfatórios foram excluídos (figura 1). O resultado final obtido foi que o que mais mantinha a integridade matricial com um tempo de realização satisfatório fora o com a utilização de SDS 0,5% (tabela 2).

Figura 1: Protocolo de descелularização 1: lavagem com EDTA, 24h em NaCl 1M, 14 dias em glicerol 85%, lavagem em tripsina e Triton X-100; protocolo 2: Lavagem em EDTA, 9 dias em SDS 1%, lavagem com Triton X-100; Protocolo 3: Lavagem em EDTA, 3 dias em SDS 0,1%, 3 dias em SDS 0,3%, 3 dias em SDS 0,5%, 3 dias em SDS 0,8%, 6 dias em SDS 1%, lavagem com Triton X-100; Protocolo 4: Lavagem com EDTA, 15 dias em SDS 0.5%, lavagem com Triton X-100.

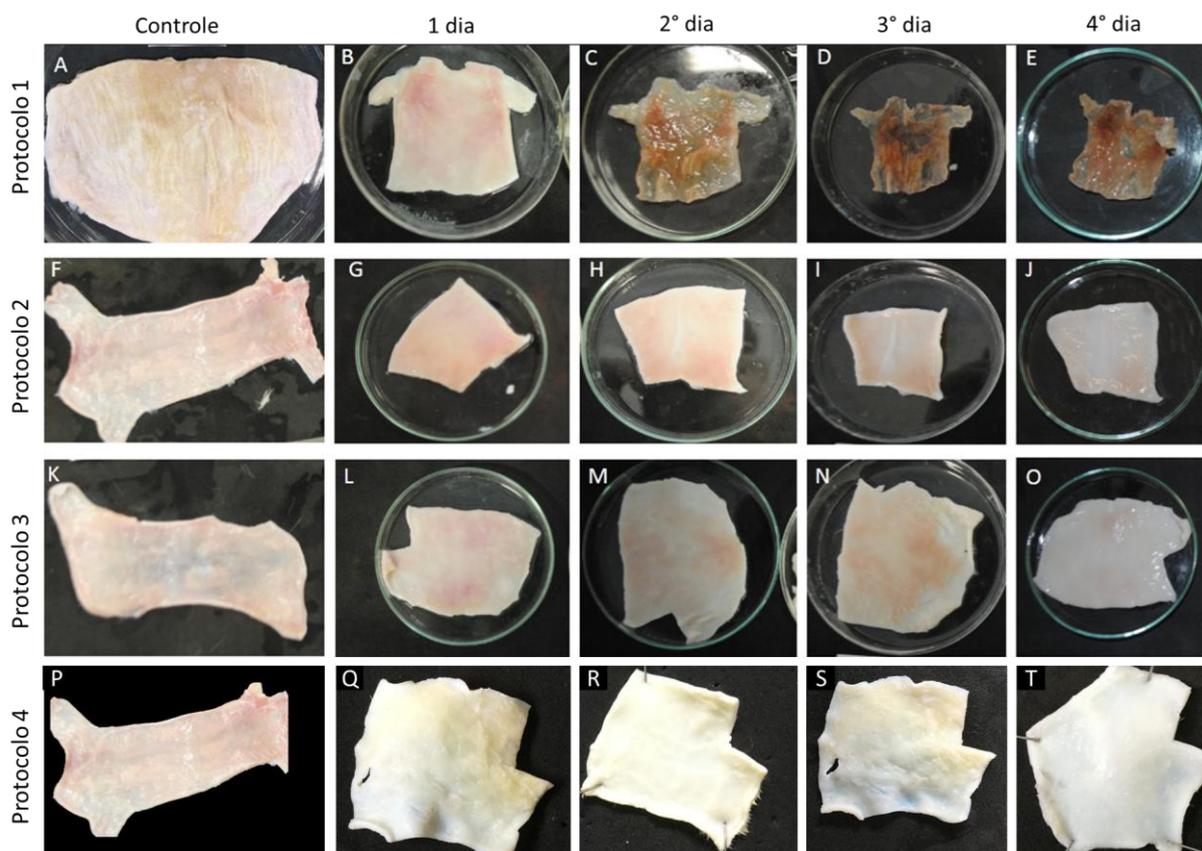


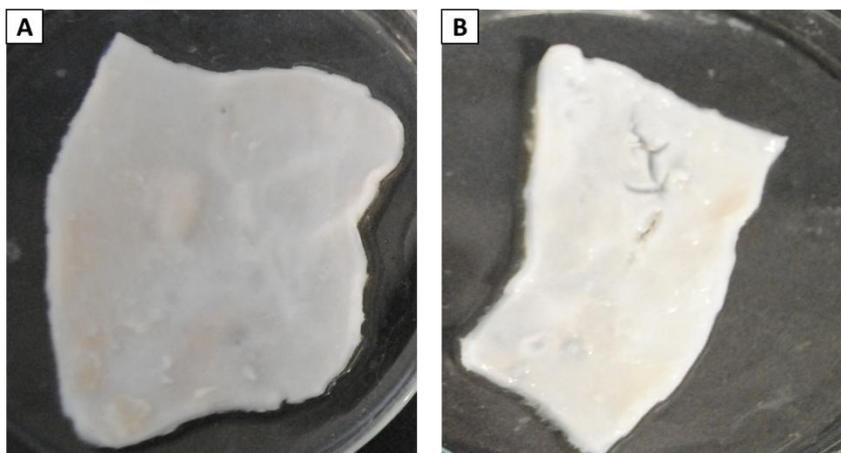
Tabela 2: eficácia dos protocolos de descélularização testados.

Protocolo	Tempo	Resultado
SDS 0,5%	15 dias	satisfatório
SDS 1%	9 dias	Ineficiente Agride a matriz
SDS Gradual	18 dias	Ineficiente Tempo elevado
SDC 2%	15 dias	Ineficiente Resquícios celulares
Glicerol	19 dias	Ineficiente Resquícios celulares

Sendo assim o protocolo eleito para descélularização foi através de imersão dos fragmentos de 20 cm² em Dodecil Sulfato de Sódio (SDS, #13-1313-01, LGCBio) a 0,5% durante 15 dias com o tecido sendo mantido a temperatura ambiente e com agitação orbital de 192 rpm durante o dia e a 4°C overnight sem agitação. A finalização do processo se deu através de três lavagens de 5 minutos em agitação orbital com a utilização de Triton X-100 1% (#13-1315-05, LGCBio).

Devido a diferença de espessura e organização no tecido, obtivemos diferentes resultados de descélularização mesmo utilizando o mesmo protocolo, uma vez que utilizamos diferentes regiões para a coleta de derme. As porções ventrais de tecido, ao final da descélularização demonstravam-se muito frágeis ao manuseio, assim como a porção dorsal sacral (figura 2). Estas foram excluídas dos demais testes mesmo se mostrando completamente descélularizadas na visualização histológica.

Figura2: Imagem macroscópica do material descelularizado. Em A a porção dorsal torácica após o processo de descelularização demonstrando a integridade na morfológica da matriz macroscopicamente, em B a porção ventral peitoral onde revelaram-se fissuras ocorridas durante o manuseio da mesma.



5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Quando avaliada histologicamente, as amostras dorsal lombar (figura 3) podemos notar o comparativo do material controle em A, B e C mostrando o tecido epidérmico (EP), o tecido dérmico (DE) contendo folículos pilosos (FP) e o tecido muscular (TM) contendo a marcação de núcleos celulares em todas as porções. Quando avaliado o tecido descelularizado em D, E e F temos somente a matriz extracelular de uma porção epidérmica (EP) e da porção dérmica (DE) com ausência de marcação de núcleos celulares demonstrando a correta descelularização através da utilização de SDS 0,5% como protocolo.

A amostra dorsal torácica (figura 4) também apresentou-se completamente descelularizada à análise histológica onde notamos na comparação do material controle demonstrado em A, B e C o material nuclear celular presente nas porções epidérmicas (EP), dérmicas (DE) e bulbos dos folículos pilosos (FP) assim como na porção do tecido muscular (TM) com o material descelularizado presente nas imagens D, E e F em que não é possível visualizar celularidade nas porções epidérmicas (EP) e dérmicas (DE) demonstrando a eficiência do protocolo utilizado com SDS 0,5% durante 15 dias, assim como a manutenção das fibras de colágeno da matriz extracelular, portanto essas duas porções foram utilizadas para os demais testes, verificando a eficácia do protocolo.

Figura 3: Histologia do material dorsal lombar controle e descelularizado corado em H&E demonstrando a ausência de núcleos celulares no material descelularizado comprovando a eficácia do protocolo de descelularização utilizado.

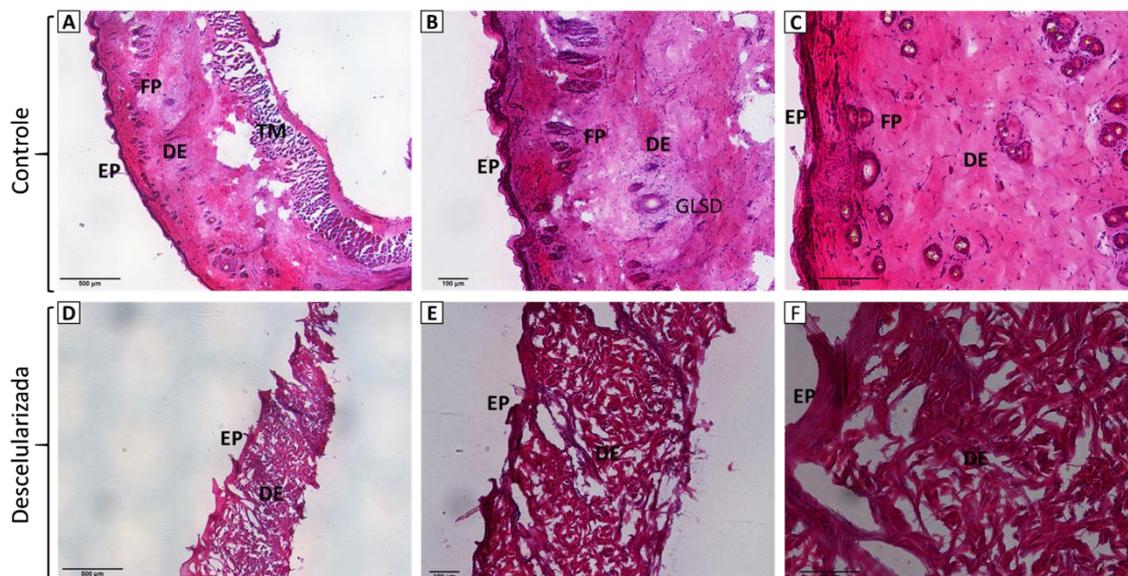
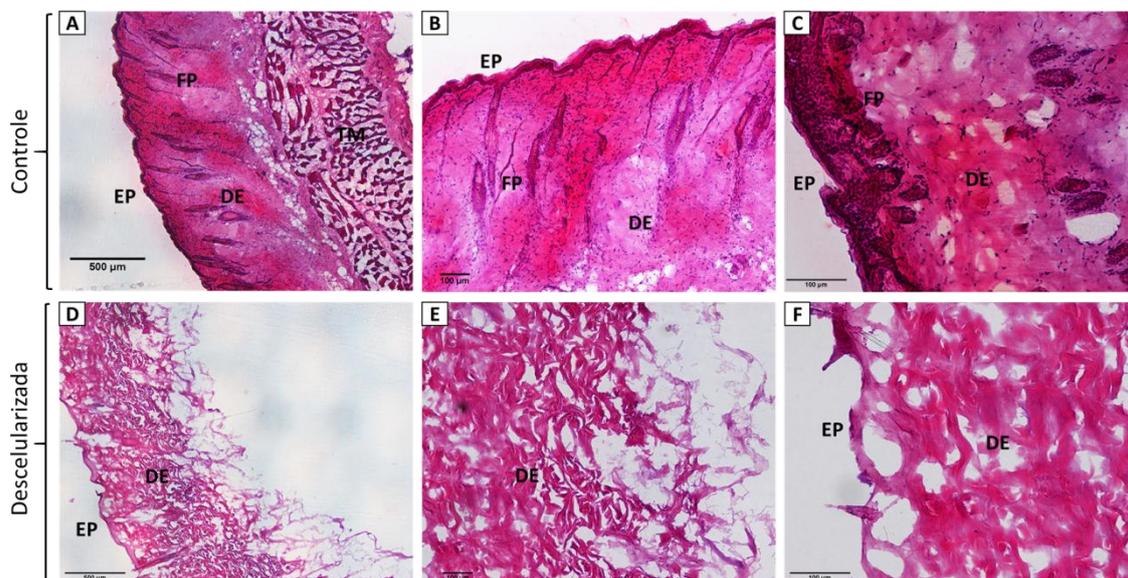


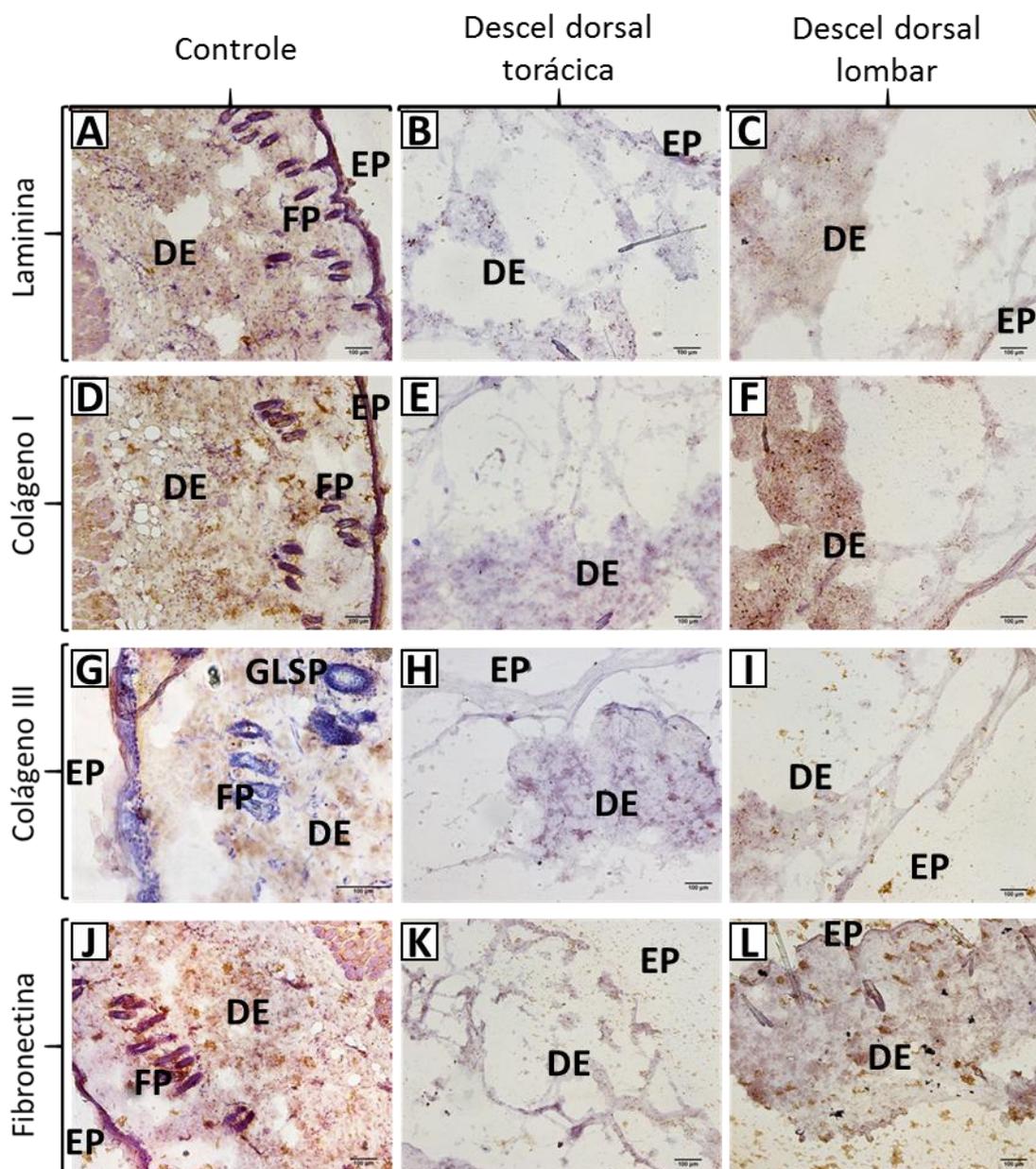
Figura 4: Histologia do material dorsal torácico controle e descelularizado corado em H&E onde a ausência de núcleos celulares no material descelularizado indica a eficácia do protocolo de descelularização.



5.3 AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA

As análises por imunohistoquímica demonstraram que mesmo após o processo de descelularização com a utilização de um detergente bastante agressivo, a matriz extracelular continuou a expressar as proteínas: laminina, colágeno e fibronectina, tanto na porção dorsal lombar quanto da dorsal torácica (figura5), em A, o material controle demarcado com laminina. Na camada mais externa temos a epiderme (EP) e no mais ao centro do corte a derme (DE) contendo folículos pilosos (FP). Em B e C temos amostras de material descelularizado sendo as amostras dorsal torácica e lombar, respectivamente, mostrando a derme (DE) e a epiderme (EP) contendo imunomarcador para laminina e não demonstrando a nucleação celular. Em D notamos a os folículos pilosos (FP) e a derme (DE) assim como a epiderme (EP) bastante demarcados por colágeno I, em E notamos no material dorsal torácico a epiderme (EP) e a derme (DE) assim como em F onde nota-se a marcação do colágeno I na, derme (DE) e epiderme (EP) sem uma conformidade celular o que demonstra uma correta descelularização do tecido. Em G notamos a forte demarcação no material controle da epiderme (EP), dos folículos pilosos (FP) e glândula sudorípara presentes na derme (DE). Em H e I nota-se a marcação do material descelularizado quanto ao colágeno III e a demarcação da posição da derme (DE), epiderme (EP) dos fragmentos dorsal torácico e lombar, respectivamente. Em J observa-se a marcação de fibronectina no material controle tendo na camada mais externa a epiderme (EP) e na parte mais central a derme (DE) contendo folículos pilosos (FP). Em K e L temos o material descelularizado também com imunomarcador para fibronectina mostrando a porção da derme (DE) e epiderme (EP) nas amostras das porções dorsal torácica e lombar, respectivamente. essas proteínas são fundamentais para a estruturação e organização da matriz e posterior sustentação e adesão das células na recelularização.

Figura 5:Imunohistoquímica do material controle e descelularizado da pele do rato Wistar representando a manutenção das fibras conectivas de laminina, colágeno I e III sugerindo que o protocolo mantém a integridade da matriz extracelular.

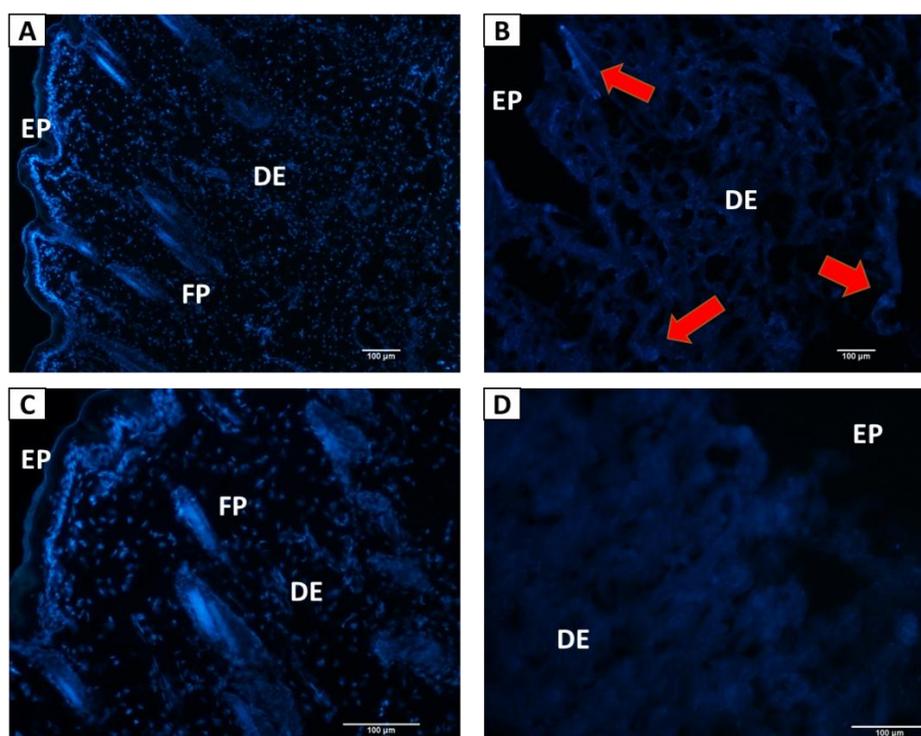


5.4 IMUNOFLORESCÊNCIA POR DAPI

As porções dorsais lombar e torácica obtiveram um aspecto relativamente compatível ao do material controle quando comparadas a elasticidade e resistência no manuseio do tecido. Durante a visualização das lâminas histológicas estas apresentaram um bom aspecto da matriz extracelular, quando comparadas ao

material controle e a ausência de células no tecido, demonstrando a correta descclularização. Quando realizamos a imunomarcção DAPI para observação de núcleos celulares, observamos que a presença de células na porção dorsal lombar ainda persistia, o que não se repete no resultado da porção dorsal torácica o que comprova a efetividade do protocolo nesse material com a concentração 0.5% de SDS durante 15 dias conforme a figura 6 onde em A, temos a pele dorsal da porção lombar, controle evidenciando a marcação de DNA celular na epiderme (EP), derme (DE) e envoltório dos folículos pilosos (FP). Em B a pele dorsal da porção lombar após a descclularização mostrando a presença do imunomarcador na matriz, evidenciando que há material genético do tecido nativo presente na amostra tanto na epiderme (EP) quanto na derme (DE) e a ausência dos folículos pilosos. Em C o material controle da porção torácica da pele mostrando a celularidade da porção epidérmica (EP) e da dérmica (DE), assim como o bulbo dos folículos pilosos (FP). Em D o material da porção torácica dorsal demonstrando a total descclularização tanto da epiderme (EP) quanto da derme (DE).

Figura6: Amostra controle e descclularizado imunomarcadas com a utilização de DAPI. Demonstrando a eficiência da descclularização da porção dorsal torácica enquanto a existência de resíduos de celularidade na porção dorsal lombar.



5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A realização do ensaio de microscopia eletrônica de varredura nos mostra a completa descelularização do tecido da porção dorsal lombar e resquícios celulares na porção dorsal torácica demonstrando falha ao descelularizar essa amostra. Na Figura 7 temos em A temos o material controle e é observada a porção da epiderme (EP) e derme (DE) do material evidenciando a compactação celular na matriz extracelular. Em B temos a aproximação da porção dermal (DE) demonstrando o arranjo celular junto a matriz. Em C e D temos o material oriundo da porção dorsal lombar evidenciando a parte da epiderme (EP) e derme (DE) do tecido em C e também em C e D a apresentação resquícios celulares (*). Em E evidencia-se a porção da epiderme (EP) e derme (DE) da amostra dorsal torácica evidenciando a completa descelularização através do efeito rarefeito da imagem. Em F observamos a matriz extracelular em sua porção dermal sem a presença celular. Em G e H observamos o material recelularizados e os fibroblastos aderidos a matriz extracelular. Em contrapartida temos a recelularização do tecido mostrando a viabilidade do scaffold biológico. Observar que a morfologia que a célula utilizada para o ensaio de recelularização adota, é diferente da célula do tecido nativo.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A avaliação do DNA genômico presente da matriz extracelular foi muito relevante uma vez que a amostra dorsal torácica continha 12,34 ng/mg de tecido e a dorsal lombar 13,04 ng/mg após o processo de descelularização (figura 8).

Figura 7: Material analisado em Microscopia Eletrônica de Varredura onde em A e B temos o material controle, em C e D temos o material oriundo da porção dorsal lombar em E e F evidencia-se a amostra dorsal torácica com completa descclularização através do efeito rarefeito da imagem e em G e H observamos o material recelularizados e os fibroblastos aderidos a matriz extracelular.

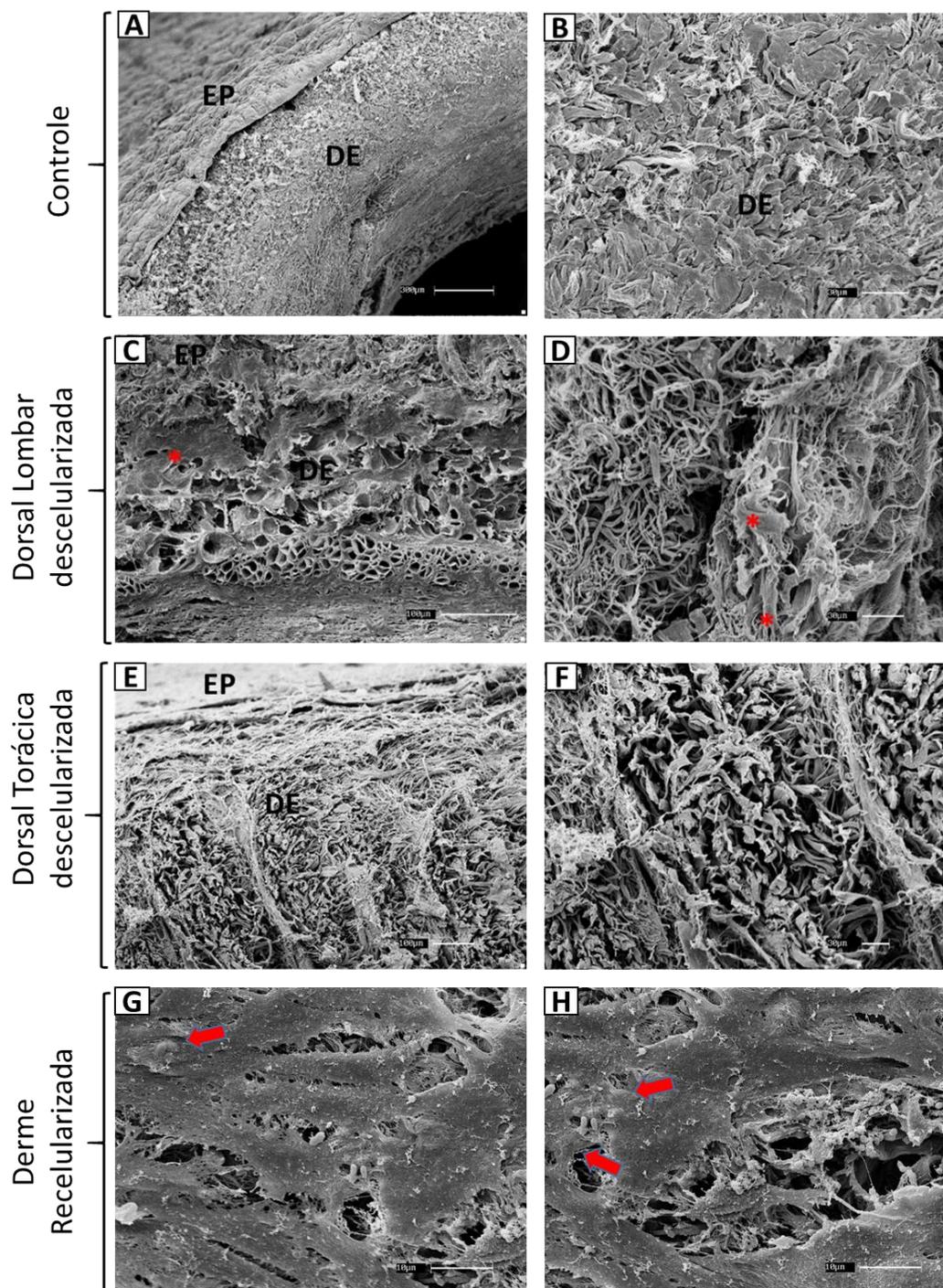
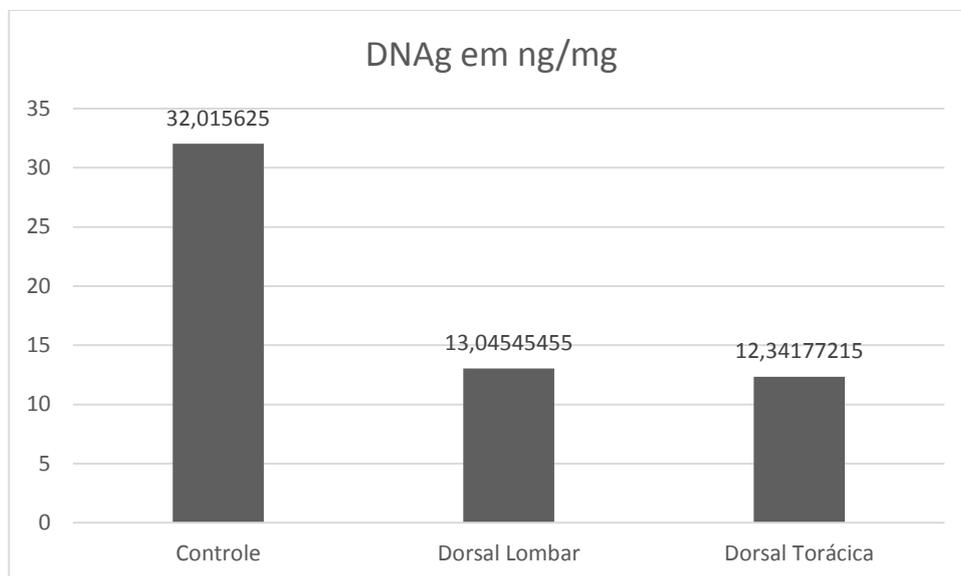


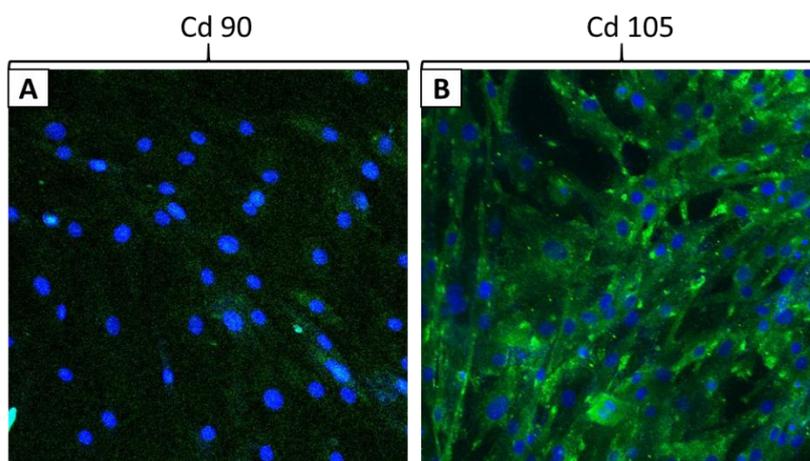
Figura 8: Quantificação de DNA genômico das amostras descellularizadas dorsal lombar e dorsal torácica, comparadas a amostra controle, demonstrando a eficácia do protocolo que utilizava SDS 0.5% durante 15 dias.



5.7 RECELULARIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE DERME

A realização de imunocitoquímica para avaliar quais os melhores anticorpos para serem utilizados para visualização das células nos scaffolds recelularizados deu-se de maneira a utilizar marcadores de matriz e marcadores de fibroblastos para que tivéssemos certeza que não haveria reação cruzada entre os antígenos. Na utilização de células tronco-mesenquimais oriundas de tecido adiposo canino, utilizamos a marcação através dos anticorpos cd 90 e cd 105 (figura 9) e para a marcação dos fibroblastos murinos, utilizamos os anticorpos cd 90, fibronectina, vimentina e N-caderina, sendo o núcleo das células sempre demarcadas através do imunomarcador DAPI (figura 10).

Figura 9: Imunocitoquímica de células tronco mesenquimais de tecido adiposo de cão, nele, observamos em A a utilização de anticorpo cd90 no citoplasma e marcação de imunofluorescência DAPI evidenciando o núcleo celular em azul. Em B a utilização de anticorpo cd105 no citoplasma das células com o núcleo com coloração azul com a utilização de marcador de fluorescência DAPI.



Após a esterilização do scaffold, a recelularização se deu de forma em que o material ficasse submerso em meio de cultivo contendo 5×10^3 células por poço da placa. Após esses 7 dias a avaliação através de microscopia confocal revelou a migração celular para o scaffold comprovando a recelularização. Quando avaliada a capacidade das células tronco mesenquimais quanto ao povoamento do scaffold, foram utilizados os marcadores laminina, para matriz, cd105 e vimentina (figura 11) enquanto a capacidade de os fibroblastos migrarem para a matriz extracelular foi avaliada com a utilização de laminina, cd 105, vimentina, elastina e fibronectina (figura 12).

Após a esterilização do scaffold, a recelularização se deu de forma em que o material ficasse submerso em meio de cultivo contendo 5×10^3 células por poço da placa. Após esses 7 dias a avaliação através de microscopia confocal revelou a migração celular para o scaffold comprovando a recelularização. Quando avaliada a capacidade das células tronco mesenquimais quanto ao povoamento do scaffold, foram utilizados os marcadores laminina, para matriz, cd105 e vimentina (figura 11) enquanto a capacidade de os fibroblastos migrarem para a matriz extracelular foi avaliada com a utilização de laminina, cd 105, vimentina, elastina e fibronectina (figura 12).

Figura 10: Análise imunocitoquímica promovendo marcação em fibroblastos murinos. Em A temos imunomarcação citoplasmática com anticorpo cd 90. Em B, imunomarcação citoplasmática com fibronectina. Em C temos imunomarcação citoplasmática com vimentina. Em D o anticorpo N-Caderina foi utilizado para a marcação citoplasmática em todas as amostras temos marcação de fluorescência DAPI evidenciando os núcleos celulares na coloração azul

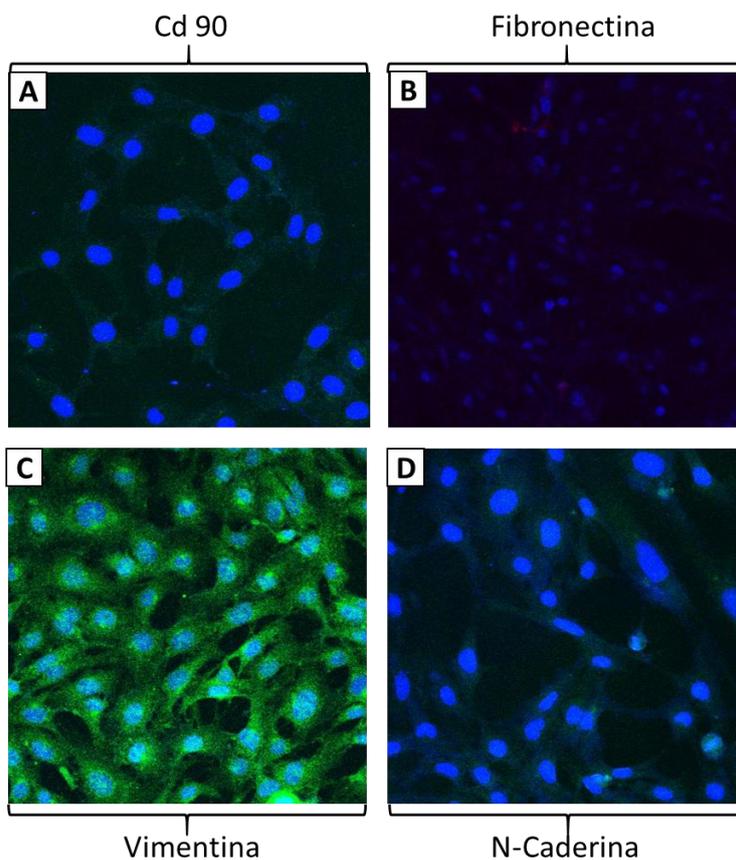


Figura 11: Análise confocal realizada nas amostras de derme recelularizadas com a utilização de células tronco-mesenquimais de gordura canina. Em A podemos observar a imunomarcação através do anticorpo cd 105 (Verde), em vermelho evidenciamos a imunomarcação da matriz extracelular marcada com laminina. Em B temos a imunomarcação com o anticorpo vimentina (verde) e matriz (vermelho). E em ambas as amostras os núcleos celulares imunomarcados com DAPI

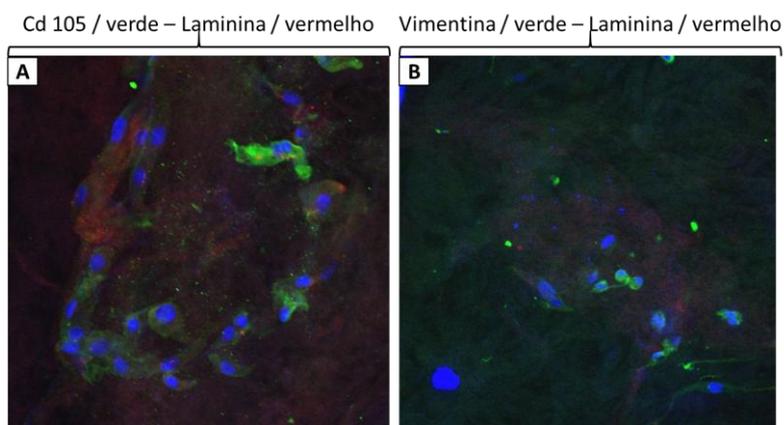
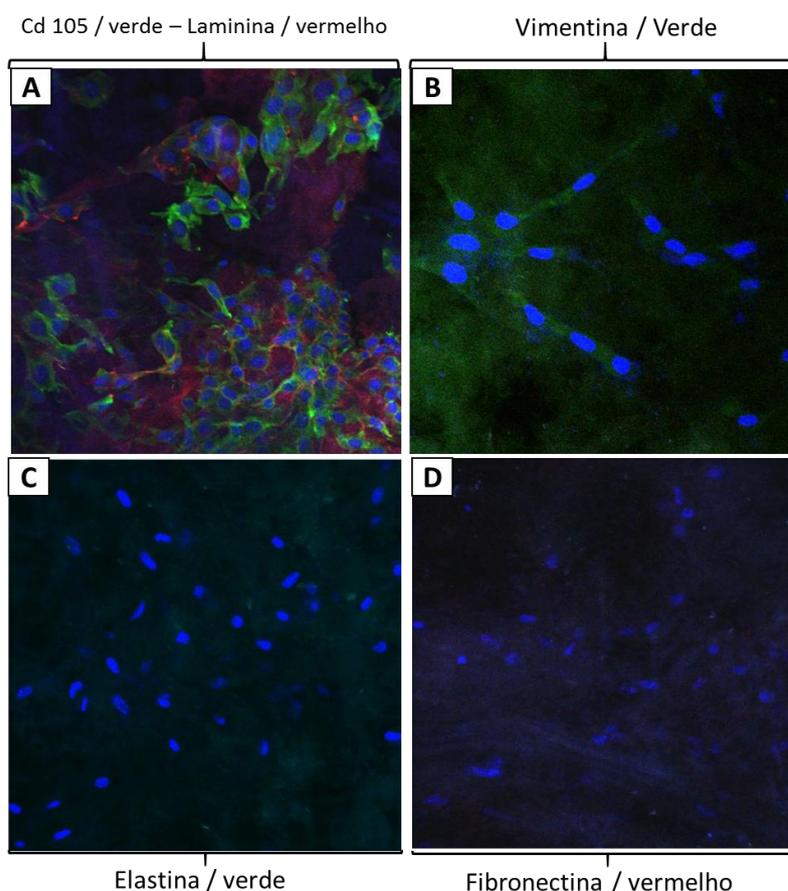


Figura 12: Análise confocal realizada nas amostras recelularizadas com a utilização de fibroblastos murinos. Em A temos a imunomarcação através do anticorpo cd 105 e os núcleos celulares evidenciados em azul através de marcação de fluorescência DAPI e em vermelho a matriz extracelular marcada com laminina. Em B temos a imunomarcação por DAPI para os núcleos celulares e a imunomarcação com o anticorpo vimentina para matriz. Em C a imunomarcação com a utilização do anticorpo elastina e os núcleos celulares evidenciados em coloração azul por DAPI. Em D a imunomarcação através de Fibronectina e os núcleos celulares com marcação imunofluorescente em azul.



6 DISCUSSÃO

A separação das porções da pele visou a avaliação das diferentes porções do tecido, uma vez que possuem sistemas de irrigação, mobilidade e espessuras diferentes (REUS et al., 2010). A utilização do EDTA imediatamente após a coleta auxiliou na retirada do sangue residual do material, conforme descrito por (SOARES et al., 2018). A utilização do detergente SDS proporcionou a lise e retirada de células da matriz extracelular, sendo este processo potencializado através do método físico

de agitação orbital, que auxilia fazendo com que haja maior fricção do líquido no material e que o detergente seja melhor distribuído entre os fragmentos de amostra conforme já comprovado em trabalhos que visavam a descélularização de outros tecidos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Após a retirada de todo conteúdo celular, observando-se a transparência do material, realizou-se a lavagem com Triton x-100 para retirada de material remanescente, fazendo com que seja possível um repovoamento com novas células no tecido (LEE et al., 1978).

Quando realizada a análise macroscópica, as porções ventrais, assim como a porção dorsal sacral mostraram-se bastante translúcidas e friáveis ao manuseio, demonstrando uma possível desnaturação proteica da matriz extracelular (HIRATA; SATA; SANTOS, 2004). Quanto à análise microscópica, utilizada para a visualização de células resquiciais através da coloração de hematoxilina e eosina demarcando através da hematoxilina os núcleos celulares enquanto a eosina é utilizada para demarcação de fibras de colágeno, foi observada a ausência de celularidade, resultado este comprovado pela imunofluorescência por DAPI, métodos de observação utilizado em vários trabalhos com descélularização de tecidos (SIMSA et al., 2018; ZHANG et al., 2016; LEONEL et al., 2018; SADLER et al., 2019)

O método de DNAg é utilizado para quantificar o DNA resquicial presente no scaffold biológico. O material é considerado descélularizado quando o nível de DNAg encontrado no tecido é menor que 50 ng/mg de tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). As amostras analisadas neste trabalho, apresentavam conteúdo de DNA entre 12,34 e 13,04 ng/mg de tecido analisado. Dados estes que corroboram com o preconizado pela literatura (SIMSA et al., 2018; ZHANG et al., 2016)

Para estipulação do protocolo de esterilização avaliou-se aspectos físicos e químicos para que pudesse explorar todas as possibilidades, aumentando a chance de exterminar os possíveis microrganismos presentes no material. Utilizamos o ponto crítico e posteriormente a associação de luz UV e álcool 70%. O álcool 70 utilizado juntamente à radiação ultravioleta leva a desnaturação de microrganismos (DORMSTETTER et al., 2019; TAWEMA et al., 2016), outros trabalhos demonstraram que o ponto crítico também auxilia com a esterilização no material para posterior recelularização (FRATINI et al., 2018), observamos nos ensaios de recelularização realizados, ausência de quaisquer microrganismos que pudessem comprometer a viabilidade celular.

Avaliado o crescimento no cultivo celular estipulamos um período de crescimento celular no scaffold de aproximadamente 7 dias. A placa de cultivo celular sem aderência auxiliou a migração de células para o scaffold. Observamos que tanto os fibroblastos quanto as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino foram capazes de aderir ao scaffold de pele. Os fibroblastos foram previamente caracterizados, expressando Vimentina e fibronectina, enquanto que as células tronco de tecido adiposo se mostraram positivas para CD90 e CD105, resultados semelhantes para recelularização de scaffolds visando um substituto para pele com células tronco de tecido adiposo foram observados por Paganelliet al, 2019.

Não existem muitos artigos na literatura que utilizem matriz extracelular de ratos para estudo, logo, comparamos nossos resultados com outros tecidos descelularizados segundo Heuschkel et al, 2018 e scaffolds comerciais e descritos por FARROKHI et al 2018, (AYALA et al., 2017; LABUS et al., 2017; RASHTBAR et al., 2017)

Assim, podemos observar que nossos métodos de descelularização e recelularização corroboram em alguns aspectos com dados recentes da literatura na área de medicina regenerativa como os protocolos de descelularização usados por SIMSA et al., 2018 e GILPIN; YANG, 2017 e de recelularização avaliado por SIMSA et al., 2018. Quanto às proteínas de matriz, observamos manutenção destas após o processo de descelularização, conforme Ghetti et al., 2018.

7 CONCLUSÃO

É possível realizar a completa descelularização da pele mantendo a arquitetura da matriz extracelular o que é indispensável para a posterior recelularização, gerando um scaffold biológico viável na utilização para enxertia em medicina regenerativa. Após a recelularização o material demonstrou capacidade de integração célula-matriz o que permite a agregação e replicação celular utilizando o scaffold como base para a aderência e crescimento das células tornando-o uma nova ferramenta disponível para cirurgias reconstrutivas em casos de inviabilidade da realização de autoenxertias.

8 REFERÊNCIAS

ALRUBAY L., AL-RUBAIYAI K. K.. Skin Substitutes: A Brief Review of Types and Clinical Applications. *Oman Medical Journal*, vol. 24. 2009;

ANDREW B., LAM P. K., LAU H. Allogenic skin: transplant or dressing? *Burns*. 28:358-66; 2002;

ARBAGHOUEI E. K. et al.. Characterization, recellularization, and transplantation of rat decellularized testis scaffold with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;

AYALA P. et al.. Evaluation of a bioengineered construct for tissue engineering applications. *Society For Biomaterials*. 2345-2354. 2018;

BHARDWAJ N.; CHOUHAN D.; MANDAL B. B..3D functional scaffolds for skin tissue engineering. *Materials, Technologies and Applications*. Pg. 345 – 365. 2018;

BOYCE S. T.; LALLEY A.. Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care. *Burns & Trauma*. 6:4. 2018

CASTELLANO D. et al.. Electrospun poly(hydroxybutyrate) scaffolds promote engraftment of human skin equivalents via macrophage M2 polarization and angiogenesis. *Tissue Engineering in Regenerative Medicine*.983-994. 2017.

CHEN X. et al.. Application of acellular dermal xenografts in full-thickness skin burns. *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 6, pg. 194-198. 2013;

CHUA A. W. C. et al.. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. *Burns & Trauma*, vol. 4. 2016;

CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 29 DE SETEMBRO DE 2015. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-25-de-29.09.2015-D.O.U.-de-02.10.2015-Secao-I-Pag.-04_ANEXO-retificado-no-DOU-de-06-10-2015.pdf. Acesso em 10 de julho de 2019

CRAPO P. M, GILBERT T. W., BADYLAK S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Elsevier B.V. 2011.

CUI H.; CHAI Y.; YU Y.. Progress in Developing Decellularized Bioscaffolds for Enhancing Skin Construction. Journal of Biomedical Materials Research. 2019;

DESTEFANI A. C. et al.. Advances in the Knowledge about Kidney Decellularization and Repopulation. Bioengineering and Biotechnology, vol. 5. 2017;

DORMSTETTER K. et al.. Evaluation of activity and potential for development of antimicrobial resistance to a new tinted 2% chlorhexidine gluconate/70% isopropyl alcohol film-forming sterile preoperative skin preparation. Journal of Global Antimicrobial Resistance. Pg. 160 – 167. 2019;

DUISIT J. et al.. Bioengineering a Human Face Graft: The Matrix of Identity. Annals of Surgery. Vol. 266, pg. 754 – 764. 2017;

FARROKHI A. et al.. Evaluation of detergent-free and detergent-based methods for decellularization of murine skin. Tissue Engineering, 2018.

FAULK D. M. et al.. The Effect of Detergents on the Basement Membrane Complex of a Biologic Scaffold Material. Acta Biomaterialia, vol. 10.2014;

FRANCO D. et al.. Plastic surgery in chest wall reconstruction: relevant aspects – case series Rev. Col. Bras. Cir. vol.42 no.6 Rio de Janeiro Nov./Dec. 2015;

FRANTZ C. et al.. The extracellular matrix at a glance. Journal of Cell Science, dec 15, 123(24), pg. 4195-4200. 2010;

FRATINI P. et al.. Canine Placenta Recellularized Using Yolk Sac Cells with Vascular Endothelial Growth Factor. Biores Open Access. 7(1): 101–106; 2018;

FRATINI P. et al.. Endothelial differentiation of canine yolk sac cells transduced with VEGF. Research in Veterinary Science 104;71–76, 2016

FU R. H. et al.. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. Cell Transplantation, vol. 23, pg. 621-630. 2014;

GARTNER L.P., HIATT J.L. Atlas Colorido de Histologia. 6° ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2014;

GASQUE K. C. S. et al.. Matriz colagênica de tendão bovino como potencial biomaterial para bioengenharia de tecidos. In nov Implant J, Biomater Esthet. 2011;

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. 2018;

GILBERT T. W., FREUND J. M., BADYLAC S. F.. Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials. Journal of Surgical Research. Vol. 152, pg. 135-139. 2009;

GILBERT T. W.. Strategies for Tissue and Organ Decellularization. Journal of Cellular Biochemistry, vol. 113, pg. 2217-2222. 2012;

GILPIN A., YANGY.. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. BioMedReserch International. 2017;

GROLL J. et al.. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. International Society for Biofabrication, 8. p. 013001 2016;

HALIM A. S. et al.. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. Indian Journal of Plastic Surgery, vol. 43, pg. 23-28. 2010;

HEUSCHKEL et al.. In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering. Xenotransplantation. 2018;

HILL R. C. et al.. Quantification of Extracellular Matrix Proteins from a Rat Lung Scaffold to Provide a Molecular Readout for Tissue Engineering. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, vol. 14, pg. 961-973. 2015;

HYTTEL, P. et al.. Embriologia Veterinária. Elsevier, p.317, 2012.

HIRATA L. L.; SATO M. E.; SANTOS C. A. M.. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. Acta Farm. Bonaerense. Vol. 23, pg. 418 – 424. 2004;

HUSSEIN K. H. et al.. Biocompatibility Evaluation of Tissue-engineered Decellularized Scaffolds for Biomedical Application. Elsevier B.V. 2016;

HOGANSON D. M. et al.. Preserved extracellular matrix components and retained biological activity in decellularized porcine mesothelium. *Biomaterials*, vol. 31, pg. 6934-6940. 2010;

JANK B. J. et al.. Engineered Composite Tissue as a Bioartificial Limb Graft. *Biomaterials*, vol. 61, pg. 246-256. 2015;

JARVELAINEN H. et al.. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 61, pg. 198-223, 2009;

JOZSEF B. et al.. [Pig skin xenograft in burns. I. Technology, laboratory studies. II. Clinical experience]. *Magyar Traumatologia, OrthopaediaesHelyreallitoSebeszet*, vol. 19, pg. 138-145. 1976;

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 10^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KEANE T. J., SWINEHART I. T., BADYLAK S. F. *Methods of tissue decellularized on used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance*. Elsevier 2015.

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*, vol. 5, pg. 1-17. 2014;

KUMAR N. et al.. *Extraction Techniques for the Decellularization of Rat Dermal Constructs*. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, vol. 27, pg. 102-107. 2013;

KWON T.; MOON K. H.. *Decellularization. Clinical Regenerative Medicine in Urology*. Pg. 125 – 141. 2018;

LABUS W. et al.. *Atomic force microscopy in the production of a biovital skin graft based on human acellular dermal matrix produced in-house and in vitro cultured human fibroblasts*. *Society for Biomaterials*. Vol. 106, pg. 726 – 733. 2017;

LEE L. T. et al.. Removal of unbound sodium dodecyl sulfate (SDS) from proteins in solution by electrophoresis through triton x-100-agarose. *J Immunol Methods*. 1978;

LEONEL L. C. P. C. et al. Decellularization of placentas: establishing a protocol. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*;51(1): e6382, 2018

LIEM P. H. et al.. Autologous skin reconstruction by combining epidermis and acellular dermal matrix tissue derived from the skin of giant congenital melanocytic nevi, *Journal of Artificial Organs*. Vol. 16, pg. 332-342. 2013;

LIU H. et al.. CXCR4 antagonist delivery on decellularized skin scaffold facilitates impaired wound healing in diabetic mice by increasing expression of SDF - 1 and enhancing migration of CXCR4 - positive cells. *Wound Repair and Regeneration*, vol. 25, pg. 652-664. 2017;

LUTOLF M. P.; HUBBELL J. A.. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*. Vol. 23, pg. 47 – 55. 2005;

MAHARLOOEI M. K. et al.. A Comparison Between Different Existing Methods Used to Separate Epidermal from Skin Biopsies for Autologous Transplantation. *Indian Journal Dermatology*, vol. 56, pg. 666-669. 2011;

MASDEH M. M. et al.. Human Split-Thickness Skin Allograft: Skin Substitute in the Treatment of Burn. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, vol. 4, pg. 96-101. 2013;

MATTEI G. et al.. Decellularized Human Liver Is Too Heterogeneous for Designing a Generic Extracellular Matrix Mimic Hepatic Scaffold. *Artificial Organs*. 2017;

MATSUSHIMA R. et al.. Decellularized dermis–polymer complex provides a platform for soft-to- hard tissue interfaces. *Materials Science and Engineering*, 2013.

MENDONÇA R. S. C.; RODRIGUES G. B. O.. As Principais Alterações Dermatológicas em Pacientes Obesos. *Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva*, vol. 24, pg. 68-73. 2011;

MIN J. H. et al.. The Use of Matriderm and Autologous Skin Graft in the Treatment of Full Thickness Skin Defects. *Archives of Plastic Surgery*, vol. 41, pg. 330-336. 2014;

MOORE M. A. et al.. Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review. *Cell and Tissue Banking*, vol. 16, pg. 249-259. 2015;

MORRIS A. H.; CHANG J.; KYRIAKIDES T. R., Inadequate Processing of Decellularized Dermal Matrix Reduces Cell Viability In Vitro and Increases Apoptosis and Acute Inflammation In Vivo. *BioResearch*, vol. 5.1. 2016;

NYEME T. T.; Chiang H. A.; Orgill D. P.. Clinical Applications of Skin Substitutes. *Surgical Clinics of North America*, vol. 94, pg. 839-850. 2014.;

OBENG M. D. et al.. Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. *Burns*. 27:267-71, 2001;

OBERWALLNER B. et al.. Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium. *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 102, pg. 3263-3272. 2014.

PAGANELLI A. et al.. In vitro Engineering of a Skin Substitute Based on Adipose-Derived Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 1:1-12; 2019

PALONE M. R. T.; SILVA T. R.; DALBEN G. S.. A Bioengenharia tecidual em favor da reabilitação de indivíduos com fissura labiopalatina. *Revista USP Medicina (Ribeirão Preto)*. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/99744>.

PORZIONATO A. et al.. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(12), 4117. 2018;

RAGHAVENDRA S. et al.. Tensile and compression properties of variously arranged porous Ti-6Al-4V additively manufactured structures via SLM. *Procedia Structural Integrity*. Vol. 13, pg. 149 – 154. 2018;

RANA D. et al.. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2015.

RASHTBAR M. et al.. Critical-sized full-thickness skin defect regeneration using ovine small intestinal submucosa with or without mesenchymal stem cells in rat model. Society for Biomaterials. Vol. 106, pg. 2177 – 2190. 2018;

REUS A. A. et al.. Development and characterization of an in vivo skin photomicronucleus assay in rats. Mutagenesis. Vol 25, pg. 407-416. 2010;

SADLER K. et al.. Divergent immune responses to synthetic and biological scaffolds. Vol. 192, pg. 405 – 415. 2019;

SANTOS A. A. M., em O modelo brasileiro para o controle das infecções hospitalares: após vinte anos de legislação, onde estamos e para onde vamos? 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/dissertacao_adelia.pdf. Acesso em 26 de junho de 2019;

SANTOS V. F., em: Transplante de pele. Disponível em: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/transplante-pele.htm> acesso em: 11 de junho de 2019;

SCARRIT M.; MURDOCK M.; BADYLAK S. F.. Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix for Regenerative Medicine. Principles of Regenerative Medicine. Pg. 613 – 626. 2019;

SCHAEFER L., SCHAEFER R. M.. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. Cell Tissue Res. 339, 237-246. 2010;

SILVA E. A.; MOONEY D. J.. Synthetic Extracellular Matrices for Tissue Engineering and Regeneration. Current Topics in Developmental Biology, vol. 64, pg. 181-205. 2004;

SIMSA R. et al.. Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels. Plos One. 17;13(12). 2018;

SMITH M. M.; MERLOSE J.. Proteoglycans in Normal and Healing Skin. Advances in Wound Care, vol. 4, pg. 152-173. 2015;

SOARES M. S. P. et al.. Methionine and/or Methionine Sulfoxide Alter Ectoenzymes Activities in Lymphocytes and Inflammatory Parameters in Serum from Young Rats: Acute and Chronic Effects. *Cell Biochem Biophys*. 76:243 – 253. 2018

STABLER C. T. et al.. Revascularization of decellularized lung scaffolds: principles and progress. *American Journal of Physiology*, vol. 309. 2015

STOCCO L. S.; SILVA S. F.; FARIA L. G.. Permeação Cutânea. II SIMPÓSIO DE ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, 2014, disponível em: <http://www.saocamilo-sp.br/novo/eventos-noticias/saf/resumo-23.pdf> acesso em 09 de outubro de 2017;

TAWEMA P. et al.. Antimicrobial effects of combined UV-C or gamma radiation with natural antimicrobial formulations against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and total yeasts/molds in fresh cut cauliflower. *Food Science and Technology*. Pg. 451 – 456. 2016;

TEREZINI M. et al.. Dermis mechanical behaviour after different cell removal treatments. Institute of Physics and Engineering in Medicine (IPEM), 2016.

THEOCHARIS A. D. et al.. Extracellular Matrix Structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 97, pg. 4-27. 2016.

VILLAPALOS L. J.; ELDARDIRI M.; DZIEWULSKIP..The use of human deceased donor skin allograft in burn care. *Cell and Tissue Banking*, vol. 11, pg. 99-104. 2010;

VILLAVEIRAN T. N. et al.. Donor skin allograft survival after bone marrow transplantation: Case report and systematic review of the literature. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 72, 23 – 34. 2019;

VOIGT C. D. et al.. The Skin Bank. *Total Burn Care*. E.2, pg. 158 – 166. 2018;

WALLIS J. W. et al. Comparative Assessment of Detergent-Based Protocols for Mouse Lung De-Cellularization and Re-Cellularization. *Tissue Engineering*, vol. 18, num. 6. 2012;

WHITE L. J. et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: aToF-SIMS study. *Acta Biomaterialia*, Vol. 50, pg. 207-219. 2017.

WU Z. et al. Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skinwounds. Springer Science+Business Media New York, 2015.

XU H. et al.. Comparison of Decellularization Protocols for Preparing a Decellularized Porcine Annulus Fibrosus Scaffold. PLOS ONE, vol. 9. 2014

ZHANG Q. et al.. Decellularized skin/adipose tissue flap matrix for engineering vascularized composite soft tissue flap. ActaBiomaterialia. Vol. 35, pg. 166-184. 2016;