

BRUNA TÁSSIA DOS SANTOS PANTOJA

**A matriz extracelular pancreática canina e felina como plataforma
de estudo para a geração de pâncreas bioartificial**

São Paulo

2023

BRUNA TÁSSIA DOS SANTOS PANTOJA

**A matriz extracelular pancreática canina e felina como plataforma
de estudo para a geração de pâncreas bioartificial**

Tese 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 obtenção do título de Doutora em Ciências.

Departamento:

Cirurgia (VCI)

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama

São Paulo

2023

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pantoja, Bruna Tássia dos Santos
A matriz extracelular pancreática canina e felina como
plataforma de estudo para a geração de pâncreas bioartificial /
Bruna Tássia dos Santos Pantoja ; orientador Ana Claudia Oliveira
Carreira Nishiyama .-- São Paulo, 2023.
185 f. : il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos
Animais Domésticos e Silvestres - Departamento de Cirurgia) -
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
Paulo, 2023.

1. Descelularização. 2. Endocrinologia. 3. Engenharia de
Tecidos. 4. Matriz Extracelular. 5. Medicina Regenerativa. I.
Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

BRUNA TÁSSIA DOS SANTOS PANTOJA

The canine and feline pancreatic extracellular matrix as a study platform for the generation of bioartificial pancreas

Diabetes Mellitus is one of the primary disorders related to the pancreas, with a high prevalence in companion animals. To date, the treatment used for this disease is insulin therapy, diet, and exercise, which help with glycemic control, but do not offer the possibility of a cure. The pancreas is a gland attached to the digestive system and has an endocrine function of synthesis and secretion of hormones and an exocrine function of production and secretion of enzymes. In dogs and cats, the pancreas is located in the abdominal cavity and has a V shape. Several therapies have been developed to treat Diabetes Mellitus, due to the increase in prevalence in humans and animals. In this context, Bioengineering has presented the association of cell therapy with natural tissue scaffolds. The decellularization of tissues and organs has proven to be a promising field in the production of scaffolds applicable to Regenerative Medicine. This work presents four chapters, one of which is a literature review and three experimental chapters. In the first chapter, a literature review was carried out addressing the importance of using the extracellular matrix of the canine pancreas as a model for the study of diabetes mellitus and pancreatitis, in addition to the possibility of using the extracellular matrix in new regenerative techniques, such as decellularization and recellularization. The second chapter aims to standardize a decellularization protocol for the canine pancreas, through the association of chemical methods (SDS 0.5%; Triton X-100 1%; SDC 4% and; SDC 4% + FBS 12%) and physical (Agitation and Immersion). We established a canine pancreas decellularization protocol using SDC 4% + FBS 12%, which is the most effective in preserving tissue architecture and extracellular matrix components. Furthermore, a study was carried out using the immunohistochemistry technique to observe whether there are any changes in the extracellular matrix when the pancreas is affected by Diabetes Mellitus and Pancreatitis, we observed. the

pancreatic ECM of dogs affected by Diabetes Mellitus and Pancreatitis presents changes in the deposition of some ECM proteins. After establishing the canine pancreas decellularization protocol using SDC 4% + FBS 12%, we sought, in the third chapter, to verify whether the pancreatic scaffold would maintain ideal conditions for cell growth and differentiation through the cell adhesion assay, in which the pancreatic scaffold O acid has proven to be cytocompatible, providing support for cells as well as allowing cell growth and differentiation. Finally, in the last chapter, we aimed to decellularize and characterize the feline pancreas, in addition to isolating and characterizing cells derived from the fetal pancreas of cats between 50 and 60 days of gestation. In which we managed to preserve the characteristics of the ECM of the feline pancreas. Furthermore, cells derived from feline fetal pancreas had fibroblastoid morphology, elongated cytoplasm, and centralized nucleus. We conclude that the canine and feline pancreatic extracellular matrix can be used as a study model for Diabetes Mellitus and can be used in the future for studies involving the recellularization of these matrices, with the aim of mimicking diseases.

Keywords: Decellularization. Endocrinology. Tissue Engineering. Extracellular Matrix. Regenerative Medicine.

A matriz extracelular pancreática canina e felina como plataforma de estudo para a geração de pâncreas bioartificial

O Diabetes Mellitus é um dos distúrbios primários relacionado ao pâncreas, apresentando alta prevalência em animais de companhia. Até o momento, o tratamento utilizado para esta enfermidade é a insulino terapia, dieta e exercício, que auxiliam no controle glicêmico, porém, não oferecem possibilidade de cura. O pâncreas é uma glândula anexa ao sistema digestório e possui função endócrina de síntese e secreção de hormônios, e exócrina de produção e secreção de enzimas. Em cães e gatos, o pâncreas está localizado na cavidade abdominal e possui formato de V. Diversas terapias vêm sendo desenvolvidas com o intuito de tratar o Diabetes Mellitus, devido ao aumento na prevalência em humanos e animais. Neste contexto, a Bioengenharia tem apresentado associação de terapia celular com *scaffolds* de tecidos naturais. A descelularização de tecidos e órgãos tem se mostrado um campo promissor na

produção de *scaffolds* aplicáveis à Medicina Regenerativa. Este trabalho apresenta quatro capítulos, sendo um de revisão de literatura e três capítulos experimentais. No primeiro capítulo foi realizada uma revisão de literatura abordando a importância do uso da matriz extracelular do pâncreas canino como modelo para o estudo do diabetes mellitus e pancreatite, além da possibilidade do uso da matriz extracelular em novas técnicas regenerativas, como a descelularização e a recelularização. O segundo capítulo apresenta como objetivo a padronização de um protocolo de descelularização para o pâncreas canino, através da associação de métodos químicos (SDS 0,5%; Triton X-100 1%; SDC 4% e; SDC 4% + SFB 12%) e físicos (Agitação e Imersão). Estabelecemos um protocolo de descelularização para o pâncreas canino utilizando SDC 4% + SFB 12%, sendo o mais eficaz na preservação da arquitetura tecidual e componentes de matriz extracelular. Além disso, foi realizado estudo utilizando a técnica de imuno-histoquímica para observar se há alguma alteração na matriz extracelular quando o pâncreas é acometido por Diabetes Mellitus e Pancreatite, no qual observamos que a MEC pancreática dos cães acometidos por Diabetes Mellitus e Pancreatite apresentam modificações na deposição de algumas proteínas de MEC. Após o estabelecimento do protocolo de descelularização do pâncreas canino utilizando SDC 4% + SFB 12%, buscamos, no terceiro capítulo verificar se o *scaffold* pancreático manteria as condições ideais para o crescimento e diferenciação celular através do ensaio de adesão celular, no qual o *scaffold* pancreático se mostrou citocompatível fornecendo suporte para as células além de possibilitar o crescimento e diferenciação celular. Por fim, no último capítulo, objetivamos a descelularização e caracterização do pâncreas felino, além do isolamento e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal de gatos entre 50 e 60 dias de gestação. No qual, conseguimos preservar as características da MEC do pâncreas felino. Além disso, as células derivadas do pâncreas fetal felino, apresentaram morfologia fibroblastóide, citoplasma alongado e núcleo centralizado. Concluímos que, a matriz extracelular pancreática canina e felina podem ser utilizadas como modelo de estudo para o Diabetes Mellitus, podendo ser utilizadas futuramente para estudos envolvendo a recelularização dessas matrizes, com o objetivo de mimetizar os danos causados por esta enfermidade.

Palavras-chave: Descelularização. Endocrinologia. Engenharia de Tecidos.
Matriz Extracelular. Medicina Regenerativa.