

PAULO ROBERTO FERREIRA GELSI

**Uso tópico de componentes da matriz extracelular canina provenientes de
derme para cicatrização de ferimentos**

SÃO PAULO

2022

PAULO ROBERTO FERREIRA GELSI

**Uso tópico de componentes da matriz extracelular canina provenientes de
derme para cicatrização de ferimentos**

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 Obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Dra. Paula Fratini

Coorientadora:

Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama

SÃO PAULO

2022

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4173 FMVZ	Gelsi, Paulo Roberto Ferreira Uso tópico de componentes da matriz extracelular canina provenientes de derme para cicatrização de ferimentos / Paulo Roberto Ferreira Gelsi. – 2022. 63 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2022. Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Paula Fratini. Coorientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama. 1. Cicatrização de feridas. 2. Reparo de tecidos. 3. Pele. 4. Epitélio. 5. Creme. I. Título.
-----------------	--

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB8-7070, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso tópico de componentes da matriz extracelular canina provenientes de derme para cicatrização de ferimentos", protocolada sob o CEUA nº 2790190220 (ID 008143), sob a responsabilidade de **Paula Fratini e equipe; Paulo Roberto Ferreira Gelsi** - 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 08/07/2020.

We certify that the proposal "Topical use of canine extracellular matrix components from the dermis for wound healing", utilizing 12 Dogs (males and females), protocol number CEUA 2790190220 (ID 008143), under the responsibility of **Paula Fratini and team; Paulo Roberto Ferreira Gelsi** - 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 07/08/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2020](#) a [02/2022](#) Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Fêmeas	idade:	1 a 6 anos	N:	6
Espécie:	Cães			Peso:	8 a 20 kg		
Linhagem:	não há preferência por raça						
Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 10 anos	N:	6
Espécie:	Cães			Peso:	2 a 35 kg		
Linhagem:	não há preferência por raça						

Local do experimento: FMVZ-USP Setor de Anatomia dos Animais domésticos e silvestres - preparação dos scaffolds utilizados no tratamento Clínica Veterinária Ponta Porã - cirurgias e acompanhamento dos animais

São Paulo, 18 de janeiro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GELSI, Paulo Roberto Ferreira

Título: ***Uso tópico de componentes da matriz extracelular canina provenientes de derme para cicatrização de ferimentos***

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 Obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me ajudar a enfrentar todas as dificuldades que tive durante esse trabalho.

A minha esposa (Ana Luiza) e meu filho (João Pedro) por compreenderem minha ausência durante os dias que me dediquei ao meu crescimento profissional.

Agradeço à minha orientadora Paula Fratini e a minha co-orientadora Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama por toda ajuda e conselhos que me passaram para elaboração do projeto.

Agradeço também a ajuda que tive da Dra. Aracy Oliva, Dr. Aloísio Gelsi, Dr. Gabriel Conelian, Dra. Bianca Barbon, Dr. Henrique Teixeira Mendes, Nael e a empresa DrogaVet por colaborarem na execução desse trabalho.

Ao Gustavo Matias pela amizade e conselhos que certamente fizeram diferença durante esses dois anos.

Agradeço aos animais que participaram desta dissertação, e aos seus tutores.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Agradeço à agência FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio recebido pelo Projeto Temático (2014/50844-3) para realização deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres onde pude desenvolver meu projeto de mestrado.

RESUMO

GELSI, P. R. F. ***Uso tópico de componentes da matriz extracelular canina provenientes de derme para cicatrização de ferimentos***. 2022. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

As lacerações cutâneas na espécie canina são queixas normais na rotina clínica veterinária. Lesões cutâneas graves, como queimaduras extensas, traumas e úlceras crônicas, requerem uma cobertura que proporcione e restaure a função do tecido. Essa cobertura geralmente corresponde ao enxerto de pele. Porém, a retirada de pele para cobertura é uma ação invasiva e dolorosa para o paciente, sendo em alguns casos impossível a obtenção do enxerto, como em pacientes com queimaduras extensas. Tendo em vista os avanços recentes na área da engenharia de tecidos que possibilitaram o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas para reparar lesões com perda de tecido, esta dissertação objetivou avaliar o uso de componentes da matriz extracelular (MEC) para aplicação em feridas caninas para promover a progressão do processo de cicatrização. Inicialmente, peles caninas cadavéricas foram descelularizadas por 12 dias pela ação do detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS) a uma concentração de 0,5% sob agitação orbital. As análises histológicas, de microscopia eletrônica de varredura e de quantificação de DNA genômico demonstraram redução do conteúdo celular e material genético nas amostras após o processo de descelularização, validando os *scaffolds* para confecção de creme com derme descelularizada. Subsequentemente, visando avaliar a eficácia do creme de derme canina descelularizada, um total de cinco cadelas (SRD, idade 1-2 anos), que seriam submetidas à cirurgia de esterilização (OSH) eletiva, foram utilizadas para o estudo experimental, sendo que foram realizadas duas pequenas rupturas epiteliais (*punch*) de aproximadamente 8mm cada, próximas ao local da incisão cirúrgica na linha média. Estas foram avaliadas em quatro tempos (T1-T4) para observação do processo de cicatrização avaliado. Na ruptura mais caudal foi aplicado diariamente durante 8 dias, um creme não iônico (Polawax™) como veículo e desprovido de qualquer outro componente (grupo controle), e na ruptura mais cranial foi aplicado o mesmo creme acrescido com componentes da MEC de derme canina descelularizada (grupo experimental). Apesar da MEC apresentar papel fundamental na cicatrização de feridas, o seu uso tópico como um creme com veículo Polawax™, não evidenciaram alterações visíveis, no que diz respeito ao tempo de cicatrização e aparência da ferida, comparada a ferida não tratada com creme a partir da MEC descelularizada.

Palavras-chave: cicatrização de feridas, reparo de tecidos, pele, epitélio, creme

ABSTRACT

GELSI, P. R. F. *Topical use of canine extracellular matrix components derived from the dermis for wound healing*. 2022. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Cutaneous lacerations in canine species are normal complaints in the veterinary clinical routine. Severe skin injuries, such as extensive burns, trauma, and chronic ulcers, require a covering that provides and restores tissue function. This coverage usually corresponds to the skin graft. However, the removal of skin for coverage is an invasive and painful action for the patient, and in some cases, it is impossible to obtain the graft, such as in patients with extensive burns. Thus, in view of recent advances in tissue engineering that have enabled the development and improvement of repair lesions techniques applied to tissue loss, this dissertation aimed to evaluate the use of extracellular matrix (ECM) components for application in canine wounds to promote the healing process. First, cadaveric canine dermis was decellularized for 12 days by the action of the ionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) at a concentration of 0.5% under orbital agitation. Histological, scanning electron microscopy and genomic DNA quantification analyzes revealed a cellular content reduction in the samples after the decellularization process, confirming the scaffolds capability to produce the canine decellularized dermis cream. Second, to evaluate the decellularized canine dermis cream effectiveness, a total of five bitches (SRD, age 1-2 years), who would undergo elective sterilization surgery (OSH), were used for the experimental study, and were two small epithelial ruptures (punch) of approximately 8 mm each were performed, close to the surgical incision site in the midline. These were evaluated at four times (T1-T4) to observe the healing process evaluated. In the most caudal rupture, a non-ionic cream (Polawax™) was applied daily for 8 days as a vehicle and devoid of any other component (control group), and in the most cranial rupture, the same cream was applied plus components of the decellularized canine dermis ECM (experimental group). Although ECM has a fundamental role in wound healing, its topical use as a cream with Polawax™ vehicle, did not show visible changes in terms of healing time and appearance of the wound, compared to the wound not treated with cream to from the decellularized ECM.

Keywords: lacerations; wound healing, skin, epithelium, cream

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC - (*Antigen Presenting Cells*) - Células Apresentadoras de Antígenos
ATB - Antibiótico
BSA - Albumina de soro bovino
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CL - Célula de Langerhans
DNA - (*Deoxyribonucleic Acid*) - Ácido Desoxirribonucleico
DS - Dermatan Sulfato
EB - Estrato basal
EC - Estrato córneo
ECM - *Extracellular matrix*
EDTA - (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EE - Estrato espinhoso
EG - Estrato granuloso
EGF - Fator de crescimento epidérmico
FGF - Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
FN - Fibronectina
FLG - Filagrina
FLK - Fentanil-Lidocaína-Cetamina
FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GAGs - Glicosaminoglicanos
gDNA - DNA genômico
HA - (*Hyaluronic Acid*) - Ácido Hialurônico
HE - Hematoxilina-Eosina
KCl - Cloreto de potássio
KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico
LN - Laminina
MEC - Matriz Extracelular
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
mM - Milimolar
MMPs - Metaloproteinases de Matriz
Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico
NaCl - Cloreto de sódio

OSH - Ovariosalpingohisterectomia

PBS - (*Phosphate Buffered Saline*) – Tampão Fosfato Salino

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PFA - Paraformaldeído

PG - Proteoglicano

rpm - Rotação por minuto

SDS - (*Sodium Dodecyl Sulfate*) – Dodecil Sulfato de Sódio

TGF- α - Fator de crescimento de transformação alfa

TGF- β 1 - Fator de crescimento de transformação beta 1

UV – Radiação ultravioleta

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICO E TABELA

Figura 1. Estrutura da pele (derme) canina.	15
Figura 2. Estrutura tridimensional da matriz extracelular (MEC)	27
Figura 3. Fluxograma do protocolo de descelularização dos scaffolds de pele (derme) canina durante 10 dias e produção do produto para aplicação tópica.	38
Figura 4. Avaliação macroscópica da derme canina submetida ao protocolo de descelularização.....	42
Figura 5. Avaliação histológica da pele canina descelularizada comparado ao tecido controle.	43
Figura 6. Fluorescência por DAPI e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos scaffolds de pele (derme) canina.	44
Gráfico 1. Quantificação de DNA genômico na derme canina nativa e descelularizada submetida ao protocolo de descelularização com o detergente SDS.	45
Figura 7. Processo de confecção do creme de MEC da derme descelularizada canina.....	47
Figura 8. Fotodocumentação em série a um ponto fixo nos intervalos estabelecidos (T1 a T4) para análise do processo cicatricial.	48
Tabela 1. Relação de tratamento dos animais submetidos as análises experimentais.	49
Gráfico 2. Tratamento das feridas com creme à base de MEC.....	50

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1.	Sistema Tegumentar	15
2.2.	Embriologia da pele	16
2.2.1.	<i>Epiderme</i>	16
2.2.2.	<i>Derme</i>	17
2.2.3.	<i>Hipoderme</i>	17
2.2.4.	<i>Apêndices epidérmicos</i>	18
2.3.	Histologia	19
2.3.1.	<i>Epiderme</i>	19
2.3.2.	<i>Elementos celulares da epiderme</i>	22
2.3.3.	<i>Derme</i>	23
2.3.4.	<i>Hipoderme</i>	23
2.4.	Pelos	24
2.5.	Glândulas Sudoríparas	24
2.5.1.	<i>Glândulas sudoríparas apócrinas (epitríquias)</i>	25
2.5.2.	<i>Glândulas sudoríparas merócrinas</i>	25
2.5.3.	<i>Glândulas sebáceas</i>	26
2.6.	Matriz Extracelular (MEC)	26
2.6.1.	<i>Composição da MEC</i>	28
2.6.1.1.	<i>Colágenos</i>	28
2.6.1.2.	<i>Proteoglicanos (PGs)</i>	29
2.6.1.3.	<i>Glicoproteínas</i>	30
2.6.1.4.	<i>Elastina</i>	30
2.7.	Scaffolds	30
2.7.1.	<i>Descelularização da tecidos</i>	35
2.8.	Cicatrização	33
2.8.1.	<i>Fase inflamatória</i>	33
2.8.2.	<i>Fase proliferativa</i>	34
2.8.3.	<i>Fase de remodelação</i>	34
2.8.4.	<i>Tipos de cicatrização</i>	34
3.	OBJETIVOS	36
3.1.	<i>Objetivo Geral</i>	36
3.2.	<i>Objetivos Específicos</i>	36
4.	MATERIAS E MÉTODOS	37
4.1.	<i>Amostras biológicas</i>	37
4.2.	<i>Descelularização de pele (derme) canina</i>	37
4.3.	<i>Análise dos tecidos de pele descelularizado / controle</i>	39
4.4.	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	39
4.5.	<i>Quantificação de DNA genômico</i>	40
4.6.	<i>Confecção do creme de MEC descelularizada</i>	40

4.7.	<i>Avaliação do Processo Cicatricial</i>	40
5.	RESULTADO	42
6.	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas do século XX, uma expansão intensa na área da biotecnologia proporcionou a aquisição de novos conhecimentos, ocasionando no desenvolvimento de processos tecnológicos e de sua aplicação na área de produção de insumos para a área de saúde (BOROJEVIC; MCT, 2002).

Com uma sequência de inovações tecnológicas quase ininterrupta que direciona os serviços médicos, os profissionais de engenharia se envolveram intimamente em muitas pesquisas médicas. Como resultado, a disciplina de engenharia biomédica emergiu como um meio de integração para duas profissões dinâmicas: medicina e engenharia (RAMÍREZ, 2013).

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa tem contribuído positivamente para o avanço de tratamento de múltiplas patologias, que podem suprir a alta demanda de órgãos e tecidos para transplantes. Na engenharia de tecido utiliza-se materiais biodegradáveis sintéticos ou naturais, que podem ser conjugados com tipos celulares, para regenerar a forma ou a função de um tecido ou órgão danificado. Neste contexto, a engenharia pode ser identificada como o conjunto de ferramentas, usadas para executar a medicina regenerativa, isto porque nem toda medicina regenerativa usa a engenharia de tecidos como ferramenta de recurso (SHARPLES, 2002).

O desenvolvimento de métodos que promovam a regeneração de tecidos tornou-se o atual esforço de muitas instituições científicas e clínicas em todo o mundo, em busca do desenvolvimento e da aplicação de terapias médicas inovadoras focadas na regeneração de tecidos lesados. Algumas das terapias regenerativas atuais incluem o uso de substitutos de tecidos acelulares como fonte promissora para auto enxerto, aloenxerto e xenoenxerto, além de fatores de crescimento, citocinas e biomaterial baseado em *scaffolds* ou suas combinações (LANGER; VACANTI, 1993, 2016; DALY; CAMPBELL; CAMPBELL, 2006).

A obtenção de tecidos e órgãos acelulares na engenharia de tecidos faz-se pela técnica de descelularização. O objetivo da descelularização é remover os fatores imunomoduladores pela remoção de células do tecido/órgão, ao mesmo tempo que mantêm a estrutura bi/tridimensional e moléculas da matriz extracelular (MEC) preservadas. Após a descelularização, o *scaffold* com suas propriedades

matriciais preservadas pode uma fonte promissora para criação de produtos de aplicação tópica em forma de cremes e biogéis da matriz descelularizada, que poderão ser assim utilizados como produtos para criar e/ou reparar tecidos e órgãos danificados (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Nesse sentido, esta dissertação objetivou avaliar o uso de um creme à base de MEC de derme canina descelularizada para aplicação em feridas caninas avaliando a progressão do processo de cicatrização em feridas cirúrgicas.

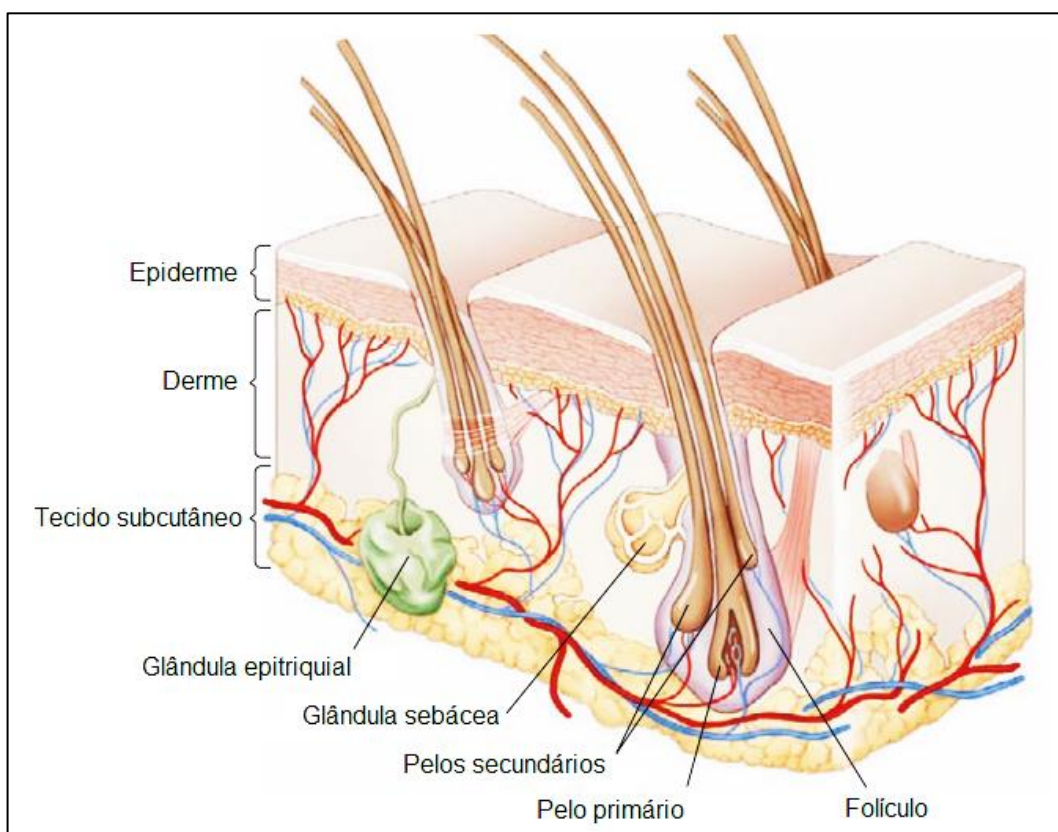
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema Tegumentar

O sistema tegumentar compreende a pele com seu revestimento de pelos e uma variedade de glândulas cutâneas, assim como regiões mais especializadas como garras, cascos e cornos (**Figura 1**) (DYCE; WENSING, 2010).

A pele é o maior órgão e mais visível dos órgãos, e funciona como uma barreira anatômica e fisiológica entre o indivíduo e o meio ambiente (GRAHAM, 2014).

Figura 1. Estrutura da pele (derme) canina.



Fonte: GELSI, P. R. F. (2022). Adaptado de (GRAHAM, 2014).

Legenda: Anatomia microscópica da pele com a presença de suas estruturas mais importantes.

As principais funções e propriedades da pele são: possibilitar um ambiente interno protegido para todos os outros órgãos, mantendo uma barreira eficaz para a perda de água, eletrólitos e macromoléculas; excluir agentes prejudiciais externos (químicos, físicos e microbiológicos); proporcionar movimento e forma por meio da sua flexibilidade, elasticidade e resistência; produzir estruturas anexas (glândulas, músculos eretores do pelo, e unhas); regular a temperatura corporal através da cobertura pilosa, regulação do suprimento de sangue cutâneo e da função das glândulas sudoríparas; armazenar água, eletrólitos, vitaminas, gordura, carboidratos e proteínas; contribuir para a identidade física e sexual; papel de imunovigilância através de queratinócitos, células de Langerhans, e os linfócitos; processos na pele (formação da melanina, vascularidade e queratinização) ajudam a prevenir danos da radiação solar e serve a muitas outras funções; propriedades antibacterianas e antifúngicas fornecidas por lipídios, ácidos orgânicos, lisozimas e peptídeos antimicrobianos; funciona como o órgão primário de percepção sensorial para toque, pressão, dor, prurido, calor e frio; funciona como órgão secretor, através dos produtos das glândulas sebáceas e sudoríparas e excretor (de forma limitada); participa na produção de vitamina D (GRAHAM, 2014). A pele é considerada um importante indicador de saúde geral, doenças e os efeitos de substâncias aplicadas topicamente ou tomadas por via oral.

2.2. Embriologia da pele

Histologicamente, a pele tem duas camadas principais: I. a epiderme; II. derme com uma camada subcutânea chamada hipoderme (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014). A camada superficial ou epiderme, é formada por um epitélio escamoso estratificado que se desenvolve a partir da superfície ectoderma. As camadas mais profundas, derme e hipoderme, consistem em tecido conjuntivo originado do mesoderma (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

2.2.1. Epiderme

A epiderme origina-se das células ectodérmicas, cobrindo o embrião após a conclusão da neurulação. As células deste ectoderma de camada única começam a

proliferar no embrião e formar uma segunda camada protetora - a periderme ou camada de cobertura (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

A periderme é uma cobertura temporária que é eliminada uma vez que as camadas internas se diferenciam até formar a verdadeira epiderme. Com uma maior proliferação das células da camada basal, uma terceira camada intermediária é formada. Finalmente, a epiderme adquire seu arranjo definitivo e quatro camadas podem ser distinguidas: camada basal ou camada germinativa (estrato basal); camada espinhosa (estrato espinhoso); camada granular (estrato granuloso) e camada cornificada (estrato córneo) (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

2.2.2. *Derme*

A derme é derivada de várias fontes. No tórax, a derme dorsal origina-se dos dermatômeros dos somitos, enquanto na parte ventral e lateral, bem como a derme dos membros, derivam do mesoderma lateral. Uma porção considerável da derme da cabeça e da porção anterior do pescoço deriva da crista neural (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

A derme se forma a partir de células mesenquimais, estreitamente interligadas por zonas de oclusão que secretam uma matriz intercelular rica em ácido hialurônico e glicoproteínas. Mais tarde, estas células diferenciam-se em fibroblastos, que produzem quantidades crescentes de colágeno (tipos I e III) e de fibras elásticas (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

O desenvolvimento dérmico é caracterizado por um aumento na espessura e número de fibras, uma diminuição na substância fundamental e a transição de células mesenquimais para fibroblastos. Fibras de elastina são produzidas mais tardiamente do que as fibras de colágeno. Histiócitos, células de Schwann, e os melanócitos dérmicos também se tornam reconhecíveis (GRAHAM, 2014).

2.2.3. *Hipoderme*

O tecido conjuntivo frouxo da hipoderme forma-se a partir de uma camada mais ou menos espessa de células mesenquimais presente na maior parte das regiões do corpo. Além de fibroblastos e de outras células livres, a hipoderme

contém feixes irregulares de fibras de intercaladas com fibras elásticas e adipócitos. Feixes de fibras musculares esqueléticas desenvolvem-se em regiões específicas, como o tórax e a região cervical (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

2.2.4. Apêndices epidérmicos

Na pele estão presentes diversos apêndices cutâneos especializados, como pelos, glândulas e coberturas falangeais terminais (garras e cascos). Os apêndices epidérmicos resultam de uma série de interações entre a epiderme e o mesênquima (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

Os pelos são estruturas especializadas, formadas a partir da epiderme em resposta a um estímulo da derme. Os primeiros fios de pelo que aparecem no feto são vibrissas ou táteis que se desenvolvem na região mentoniana, periorbital e lábio superior como pontos brancos ligeiramente levantados na pele lisa (GRAHAM, 2014).

Mais tarde os primórdios dos pelos aparecem na generalidade da pele, com exceção de algumas regiões anatómicas que permanecerão glabras, como a trufa, as almofadas palmares e plantares e as junções mucocutâneas (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Os pelos surgem primeiro na cabeça e vão progredindo caudalmente gradativamente (GRAHAM, 2014).

Os brotos capilares consistem inicialmente em uma área de aglomeração de células basofílicas na camada basal da epiderme. Posteriormente, essas áreas tornam-se conhecidas como "placóides epidérmicos" Abaixo de cada ponto desse encontra-se um grupo de células mesenquimais, denominadas como condensado dérmico, a partir do qual a papila capilar dérmica é mais tarde formada. O placóides epidérmico se desenvolve em três cilindros epiteliais. O cilindro mais interno forma a haste do pelo, o cilindro mais externo forma a bainha externa da raiz, o cilindro do meio forma a bainha interna da raiz (GRAHAM, 2014).

Conforme o fio do pelo se alonga e se desenvolve em um folículo capilar e cabelo, três protuberâncias aparecem. A mais baixa (mais profunda) das protuberâncias desenvolve-se na fixação do músculo eretor do pelo; a protuberância do meio se diferencia na glândula sebácea; e a protuberância superior evolui para a glândula sudorípara epitriquial. Estes apêndices se desenvolvem no lado cranial dos

folículos capilares primários; folículos capilares secundários se desenvolvem no lado caudal. Em geral, os primeiros fios de cabelo que aparecem no feto são vibrissas ou pelos dos seios da face que se desenvolvem no queixo, sobrancelhas e lábio superior como pontos brancos ligeiramente levantados na pele lisa e nua (GRAHAM, 2014).

As unhas são compostas por uma camada dura, queratinizada, de pele modificada, que encerra a falange distal. Durante o desenvolvimento embrionário inicial, encontram-se cristas dérmicas nas unhas de cães e gatos. Assume-se que estas cristas dérmicas são a forma básica de um corpo papilar, que consiste numa estruturação de epiderme e derme mais externa, com forma estriada. O desenvolvimento de um pequeno corpo papilar providencia uma zona de contato derme epidérmica, servindo principalmente para possibilitar a difusão de nutrientes para as células epiteliais (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

2.3. Histologia

A pele é constituída por tecido epitelial e tecido conjuntivo, epiderme e derme, respectivamente. Abaixo e em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo. Segundo JOSE CARNEIRO, L. C. JUNQUEIRA, (2018), a hipoderme não faz parte da pele. Já outros, como GRAHAM, (2014) consideram a hipoderme como uma das camadas que constituem a pele.

A junção entre a epiderme e a derme é irregular. A derme possui projeções, chamadas de papilas dérmicas, que se encaixam em reentrâncias da epiderme, chamadas de cristas epidérmicas, aumentando a coesão entre essas duas camadas. Essa coesão é muito importante, porque a pele está constantemente sujeita a agressões mecânicas (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

2.3.1. Epiderme

A epiderme é composta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, onde as células mais abundantes são os queratinócitos ($\approx 85\%$). Apresenta ainda melanócitos ($\sim 5\%$), células de Langerhans (3% a 8%) e células de Merkel ($\sim 2\%$) (GRAHAM, 2014).

A epiderme é continuamente renovada pela proliferação de células-tronco e a diferenciação de sua progênie. Essas células passam por diferenciação à medida que saem da camada basal e se movem em direção à superfície, onde morrem e descamam (ROIG-ROSELLO; ROUSSELLE, 2020).

A espessura desses estratos, gerada pelo número de células que cada um deles dispõe, varia conforme a região da pele. A pele espessa, encontrada nos animais em regiões desprovidas de pelos e onde há mais atrito com ambiente, como coxins digitais, plantares e palmares, além do plano nasal (carnívoros) ou nasolabial (ruminantes), possui estratos com maior número de camadas celulares. Na pele fina, a quantidade de estratos e sua posição são as mesmas que na pele espessa, porém há menos células por estrato (BLAZQUEZ, 2016).

O estrato basal (EB) é constituído por células prismáticas ou cuboides, ligeiramente basófilas, que repousam sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme, sendo rico em células-tronco da epiderme, e chamado de camada germinativa. Apresenta atividade mitótica, sendo responsável, junto com a camada seguinte (estrato espinhoso), pela constante renovação da epiderme (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

Sob o estímulo de vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento epitelial (EGF), o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento de transformação beta-1 ($TGF\beta-1$) e alfa-1 ($TGF-\alpha1$), interleucinas 1 e 6, ácido retinoico e cálcio, estas células dividem-se, algumas delas tornam-se diferenciadas, ainda em contato com a membrana basal. As células diferenciadas dividem-se, perdem contato com a membrana basal e migram para estratos superiores (BLAZQUEZ, 2016).

O estrato espinhoso (EE) é formada por células cuboides ou ligeiramente achatadas, com volume maior que o das células da camada basal, de núcleo central e citoplasma com feixes de filamentos de queratina (tonofilamentos). Nessa camada os queratinócitos estão unidos entre si por inúmeras junções intercelulares do tipo desmossomo. Em preparações histológicas, essas junções aparecem como pequenas projeções celulares, o que confere a cada célula um aspecto espinhoso. Ao microscópio eletrônico, verifica-se que os tonofilamentos terminam inserindo-se nos espessamentos citoplasmáticos dos desmossomos (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

Duas proteínas, as pacoglobinas e as desmoplaquinas ligam os filamentos de queratina às membranas celulares. Os desmossomos de queratinócitos vizinhos são unidos por proteínas transmembrânicas do tipo das caderinas (BLAZQUEZ, 2016). Os filamentos de queratina e os desmossomos têm importante papel na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

O estrato granuloso (EG) é constituído por células alongadas e estreitas repletas de grânulos basófilos, corados intensamente pela hematoxilina. As células do estrato granuloso já estão em processo de queratinização. Acumulam em seu citoplasma dois componentes: os grânulos de querato-hialina, irregulares e sem membrana, e os corpos lamelares, envolvidos por membranas fosfolipídicas. Os corpos lamelares são formados por membranas fosfolipídicas que se enovelam no seu interior, formando uma vesícula preenchidas por lamelas que lembra ao microscópio eletrônico uma cebola cortada, daí seu nome (BLAZQUEZ, 2016).

O ápice desta jornada é a formação de um envelope cornificado impermeável através de uma forma altamente especializada de morte celular programada, denominada cornificação, que é distinta em muitos aspectos das vias apoptóticas clássicas (MACK; ANAND; MAYTIN, 2005).

A função de barreira da pele é em grande parte dependente do estrato córneo. No EC, os queratinócitos são achatados e desnucleados (então chamados de corneócitos) e, simultaneamente, as membranas celulares desses corneócitos são substituídas por uma estrutura de barreira específica chamada envelope cornificado (EGAWA; KABASHIMA, 2018).

Os grânulos de querato-hialina produzidos no estrato granuloso contêm componentes intracelulares do estrato-córneo, como filagrina (FLG), loricrina e filamentos de queratina, enquanto os corpos lamelares que também são produzidos no estrato granuloso contêm componentes extracelulares como lipídios, corneodesmossomos e calicreínas (EGAWA; KABASHIMA, 2018).

Na transição do SG para o SC, corpos lamelares são secretados no espaço intercelular de corneócitos preenchendo-o com lipídios. Essa combinação de estruturas é frequentemente descrita como tijolos (corneócitos) e argamassa (lipídios intercelulares) (EGAWA; KABASHIMA, 2018).

2.3.2. *Elementos celulares da epiderme*

Outros tipos celulares de origem mesenquimal também são encontrados na epiderme: os melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (BLAZQUEZ, 2016).

2.3.2.1. *Melanócitos*

Os melanócitos, representam o segundo tipo de célula encontrada na camada basal da epiderme, além de também serem encontrados na bainha folicular externa dos folículos pilosos, nos ductos de glândulas sebáceas e sudoríparas, e em menor quantidade na derme superficial (GRAHAM, 2014).

A função do melanócito é sintetizar melanina e transportá-la para o citoplasma dos queratinócitos (GOMES, ROSALINE KELLY; DAMAZIO, 2017). Os melanócitos tem por função pigmentar os pelos e a pele, contribuindo para a tonalidade cutânea, e pela proteção direta da pele contra os danos ocasionados pela radiação UV (MIOT et al., 2009). Por outro lado, a melanina fica armazenada em estruturas intracitoplasmáticas específicas denominadas melanossomas (MIOT et al., 2009). Por sua vez, os melanossomas são organelas endocíticas dos melanócitos, mais precisamente lisossomas secretórios e que contêm a melanina (RAPOSO; MARKS, 2007).

2.3.2.2. *Células de Langerhans*

As células de Langerhans (CLs) tem a função de célula apresentadora de antígenos (APC) residente na pele, que desempenham um papel sentinela na manutenção da barreira imunológica da pele como as primeiras células do sistema imune a enfrentar os insultos ambientais na epiderme (DECKERS; HAMMAD; HOSTE, 2018).

2.3.2.3. *Células de Merkel*

As células de Merkel além de serem neuroendócrinas, são mecanorreceptores e recebem terminações nervosas aferentes, enviando os sinais

táteis ao sistema nervoso central. Estão localizadas no estrato basal, junto à membrana homônima (BLAZQUEZ, 2016).

2.3.3. *Derme*

A derme é o tecido conjuntivo em que se apoia a epiderme e que une a pele ao tecido subcutâneo, ou hipoderme. É constituída por duas camadas de limites pouco distintos: a papilar, superficial, e a reticular, mais profunda (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

A derme se une à epiderme pela membrana basal produzida pelas células epiteliais, que se ligam a ela por um complexo de união formado por filamentos intermediários e hemidesmossomo. As integrinas presentes na membrana celular de células basais ligam-se aos colágenos tipo IV e as lamininas (LN) presentes na membrana basal. A laminina então conecta-se ao colágeno tipo VII, presente no tecido conjuntivo, o qual serve de conexão entre a membrana basal e o colágeno tipo I, tipo este de colágeno mais presente na derme (BLAZQUEZ, 2016). Na zona papilar, a derme projeta-se para o interior da epiderme formando cristas que se interdigitam com papilas semelhantes da epiderme que penetram no interior da derme (BLAZQUEZ, 2016).

A camada papilar é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas. Os pequenos vasos sanguíneos observados nessa camada são responsáveis pela nutrição e oxigenação da epiderme (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

A camada reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso. Além dos vasos sanguíneos e linfáticos, e dos nervos, também são encontradas na derme as seguintes estruturas, derivadas da epiderme: folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

2.3.4. *Hipoderme*

A hipoderme é a camada mais profunda e geralmente a mais espessa da pele (GRAHAM, 2014). É formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira

pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

Por razões funcionais, essa camada não faz parte de algumas áreas (por exemplo, lábio, bochecha, pálpebra, orelha externa, ânus); nessas áreas, a derme está em contato direto com musculatura e a fáscia (GRAHAM, 2014). Mais ainda, a hipoderme pode ter uma camada variável de tecido adiposo, que, quando desenvolvida, constitui o panículo adiposo. Este modela o corpo, é uma reserva de energia e proporciona proteção contra o frio (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

2.4. Pelos

Pelos, unhas, glândulas sudoríparas, sebáceas e mamárias são estruturas anexas da pele, também chamados de apêndices epidérmicos. Primeiramente, o pelo, que é característico dos mamíferos, é importante no isolamento térmico, na percepção sensorial e na função de barreira contra lesões químicas, físicas e microbianas na pele (GRAHAM, 2014). Além disso, os pelos estão associados a outras estruturas da pele formando a unidade folicular que é composta por pelo menos uma glândula sudorípara, uma glândula sebácea e um músculo eretor do pelo (BLAZQUEZ, 2016).

As unidades foliculares que possuem um único pelo, são chamadas de folículo simples, sendo encontradas em bovinos, equinos e bufalinos. Já em caninos e felinos, são chamadas de unidades foliculares compostas e possuem até 25 pelos, cujo folículos fundem-se até a superfície, abrindo-se na pele pelo mesmo óstio (BLAZQUEZ, 2016).

2.5. Glândulas Sudoríparas

As glândulas sudoríparas, são glândulas tubulares simples, enoveladas, que podem ser divididas em dois tipos diferenciados tanto funcionalmente como morfológicamente, as glândulas sudoríparas apócrina ou epitriquiaias, associadas aos

folículos pilosos, e as glândulas sudoríparas merócrinas, écrinas ou atriquiais, não associadas aos folículos pilosos (BLAZQUEZ, 2016).

2.5.1. Glândulas sudoríparas apócrinas (epitríquias)

As glândulas sudoríparas apócrinas (epitríquias) é o tipo mais frequente de glândula, cuja secreção é rica em glicogênio, lipídeos, albumina, globulinas séricas e ureia e estão minimamente envolvidas na termorregulação. As glândulas sudoríparas apócrinas, em geral estão associadas a folículos pilosos (daí sua denominação alternativa epitriquial), onde lançam sua secreção por meio de dutos secretores, na altura da abertura das glândulas sebáceas. Entretanto, o nome epitriquial não descreve tão bem está glândula porque também podem formar órgãos especiais na pele, não associados aos folículos pilosos, como as glândulas ceruminosas da orelha, glândulas anais, as glândulas prepuciais e os sacos anais dos cães. Seu nome deriva da maneira como as células secretam seu produto. A secreção é acumulada no ápice da célula e forma uma grande saliência na luz, sendo liberada de uma vez só (BLAZQUEZ, 2016).

2.5.2. Glândulas sudoríparas merócrinas

As glândulas sudoríparas merócrinas são glândulas tubulosas simples, porém sua porção secretora é intensamente enovelada. Abrem-se geralmente na superfície (diretamente na epiderme), entretanto podem se abrir nos folículos pilosos. Distingue-se um ducto e uma porção secretora. O ducto é revestido por duas camadas de células cúbicas. A essencial função da glândula sudorípara merócrina é auxiliar na manutenção da temperatura corpórea pela evaporação, porém, também, tem a função excretora porque elimina catabólicos e drogas (BLAZQUEZ, 2016).

Por não produzirem uma quantidade abundante de suor, cães e gatos desenvolveram a capacidade de vaporizar grandes volumes de água através das vias respiratórias (GRAHAM, 2014).

Nos animais domésticos estas glândulas formam aglomerados, localizados em regiões especiais da pele, diferentemente dos seres humanos, nos quais estas glândulas estão distribuídas por toda a pele (BLAZQUEZ, 2016).

Em cães, essas glândulas são encontradas na tela subcutânea dos coxins, com seus ductos formando canais por meio da derme espessa e cornificada (DYCE; WENSING, 2010).

2.5.3. Glândulas sebáceas

As glândulas sebáceas são acinosas, e geralmente vários ácinos desembocam em um ducto curto. Os ácinos são formados por uma camada externa de células epiteliais achatadas que repousam sobre uma membrana basal (ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, 2018).

A secreção oleosa (sebo) produzida pelas glândulas sebáceas tende a manter a pele macia e flexível, formando uma emulsão que se espalha pela superfície do estrato córneo para reter a umidade e, assim, manter a hidratação adequada. As secreções de sebo proporcionam à pele e aos pelos proteção hidrofóbica contra umidade excessiva e pode ter um papel no isolamento térmico. A película de óleo também se espalha sobre os fios do pelo e dá eles um brilho lustroso (SMITH; THIBOUTOT, 2008).

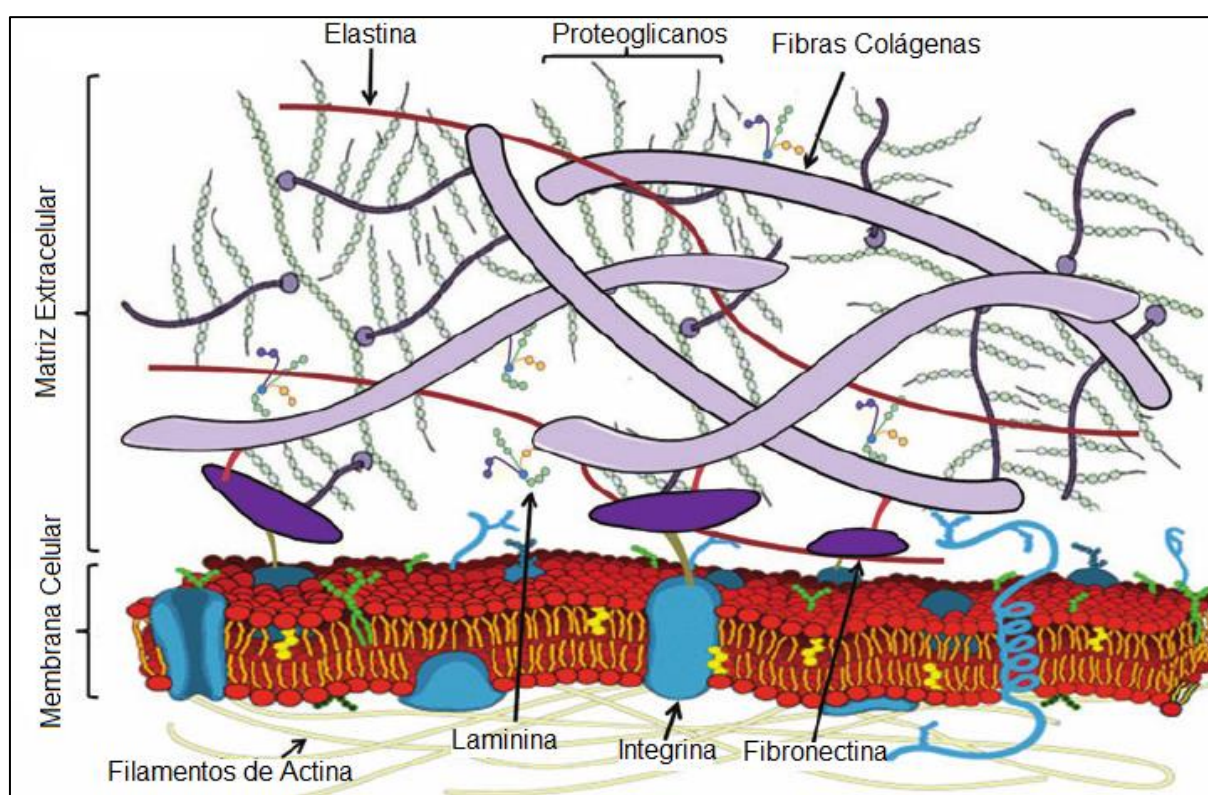
Assim como as glândulas sudoríparas apócrinas, as glândulas sebáceas, também, estão associadas aos folículos pilosos. Também podem formar aglomerados na pele, sem estarem associadas a folículos pilosos, formando órgãos secretores especiais que secretam diretamente na pele. Estas são as glândulas circum-anais dos carnívoros, as glândulas do órgão supra caudal de cães e gatos, o órgão submentoniano dos gatos e podem ser encontradas em região palpebral como as glândulas de Zeiss e Meibômio (BLAZQUEZ, 2016).

2.6. Matriz Extracelular (MEC)

Todos os tecidos e órgãos contêm uma mistura de células e componentes não celulares, que formam redes bem organizadas chamadas MEC (THEOCHARIS et al., 2016). Adicionalmente, a MEC não fornece apenas estrutura física nos quais as células estão incorporadas, mas também regulam muitos processos celulares, incluindo crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

A composição e organização da matriz variam de tecido para tecido, porém a função básica de toda MEC é fornecer suporte para o tecido e ligantes para fixação celular (**Figura 2**). A relação entre as células e a MEC nos órgãos em desenvolvimento é uma interação complexa e contínua; as células sintetizam e depositam macromoléculas que influenciam o crescimento e a remodelação do órgão, e a MEC depositada apoia a sobrevivência, função e organização das células ao longo da vida (SACKETT et al., 2018).

Figura 2. Estrutura tridimensional da matriz extracelular (MEC)



Fonte: GELSI, P. R. F. (2022). Adaptado de (XUE; JACKSON, 2015).

Legenda: Principais componentes da matriz extracelular e suas interações entre si e com a membrana celular.

Existem dois tipos principais de MEC que diferem em relação à sua localização e composição: a matriz de tecido conjuntivo intersticial, que circunda as células e fornece *scaffolds* estruturais para tecidos; e a membrana basal, que é uma forma especializada de MEC que separa o epitélio do estroma circundante (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Além disso, a MEC é um elemento crítico no campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa (YI et al., 2017).

Recentemente, a MEC tem sido usada na engenharia tecidos como uma fonte promissora de materiais. Estudos emergentes demonstram que os *scaffolds* da matriz extracelular são capazes de criar um microambiente regenerativo favorável, promover a remodelação específica do tecido e atuar como um modelo indutivo para o reparo e reconstrução funcional da pele, osso, nervo, coração, pulmão, fígado, rim, pequenos intestinos e outros órgãos (YI et al., 2017). Existem diversos trabalhos na literatura que demonstram as propriedades benéficas da MEC utilizada como *scaffolds* descelularizado.

2.6.1. Composição da MEC

A matriz extracelular é composta por uma complexa malha de proteínas e polissacarídeos, que são produzidos pelas células residentes no tecido/órgão. A matriz extracelular inclui a matriz intersticial e a membrana basal. O primeiro é composto de polissacarídeos e proteínas fibrosas preenchidas nos espaços intercelulares, enquanto o segundo é um tecido não celular fino que separa o tecido externo (epitelial, mesotelial ou endotelial) do tecido conjuntivo subjacente (LU et al., 2011).

Os principais componentes encontrados na MEC são os colágenos, proteoglicanos / glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, LN e várias outras glicoproteínas. Os componentes da matriz ligam-se uns aos outros, bem como aos receptores de adesão celular, formando uma rede complexa na qual as células residem em todos os tecidos e órgãos (THEOCHARIS et al., 2016).

2.6.1.1. Colágenos

Os colágenos fornecem ao tecido resistência à tração e integridade estrutural (LODISH, A. BERK, 1369; GORDON; HAHN, 2010). São compostos por colágenos fibrilares, sendo o tipo mais comum quando comparado com os não fibrilares. Em vez de formar fibrilas, esses colágenos não fibrilares formam redes em forma de malha na MEC, como o colágeno IV encontrado nas membranas basais (EXPOSITO et al., 2010). Além disso, o colágeno é caracterizado como um biopolímero, sendo um dos principais constituintes da MEC, tornando-se um polímero interessante para o desenvolvimento de curativos de feridas (MBESE; ALVEN; ADERIBIGBE, 2021). Dessa forma, as interações entre colágeno e células são essenciais durante o processo de cicatrização de feridas porque o colágeno promove a manutenção e diferenciação de fenótipos celulares (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

Para muitos processos regenerativos naturais no corpo, as células devem ser direcionadas para reconstituir em um local de lesão, recrutar outros tipos de células e depositar MEC para restauração da função de órgãos após uma lesão. O colágeno participa do sequestro de fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização que auxiliam na regulação parácrina do comportamento celular (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

2.6.1.2. Proteoglicanos (PGs)

Os proteoglicanos consistem em um domínio de proteína central ligada a glicosaminoglicanos (GAGs). Eles são classificados em subtipos com base na estrutura dessas cadeias de carboidratos GAG, bem como na distribuição e densidade dessas cadeias ao longo da proteína central. Os principais GAGs são ácido hialurônico, heparan sulfato, sulfato de condroitina, dermatan sulfato (DS) e sulfato de queratina (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

O ácido hialurônico (HA), é um GAG comum que também é abundantemente expresso em todos os tecidos, mas tem propriedades únicas porque não se liga covalentemente aos peptídeos (LAURENT; FRASER, 1992).

O heparan sulfato devido à sua vasta diversidade estrutural são capazes de se ligar e interagir com uma ampla variedade de proteínas, tais como fatores de crescimento, quimiocinas, morfógenos, componentes da matriz extracelular e enzimas, entre outros (SCHULTZ; WYSOCKI, 2009; MENDE et al., 2016). O DS está

envolvido na regulação de múltiplas atividades fisiológicas e patológicas no organismo. Tem um importante papel nos processos de divisão celular, trombose, aterosclerose, morfogênese e nas interações com outras moléculas e células (FREITAS FILHO, 2017).

2.6.1.3. *Glicoproteínas*

As glicoproteínas são semelhantes aos proteoglicanos pois possuem unidades peptídicas e grupos de carboidratos ligados covalentemente. As glicoproteínas atuam dentro da matriz extracelular, elas contêm grupos funcionais que reconhecem e se ligam a outras moléculas da MEC, bem como a moléculas de adesão celular, fatores de crescimento secretados e morfógenos. A fibronectina (FN) e a LN são duas glicoproteínas predominantes e importantes encontradas no estroma da MEC (MUNCIE; WEAVER, 2018).

As FNs são dímeros de dois peptídeos similares que têm o papel de aderir as células (glicoproteína adesiva) a uma variedade de substâncias na MEC, exceto o colágeno IV, o qual utiliza a LN como molécula adesiva que ancora a superfície celular à lâmina basal (SUZUKI; YOKOYAMA; NOMIZU, 2005).

2.6.1.4. *Elastina*

A elastina é uma proteína estrutural única que confere, elasticidade aos tecidos como a pele e a vasculatura. Diferente do colágeno fibrilar que fornece resistência à tração contra deformação. Em suma a elastina fornece resiliência aos tecidos para que, quando esticados, possam retornar à sua conformação original (DEBELLE; TAMBURRO, 1999; SALESSE et al., 2018).

2.7. *Scaffolds*

Os *scaffolds* são suportes nos quais células, como por exemplo, as células tronco, podem ser cultivadas com o propósito de construir um tecido in vitro. A estrutura do *scaffold* fornece sustentação mecânica ao desenvolvimento celular bem como permite o transporte de nutrientes, metabólitos, fatores de crescimento e

outras moléculas regulatórias, tanto no sentido do meio extracelular para as células como o contrário (KEUN KWON; KIDOAKI; MATSUDA, 2005).

Um *scaffold* ideal precisa ter muitas propriedades arquitetônicas, mecânicas, físico-químicas e biológicas específicas. Ele deve ter uma estrutura esponjosa porosa para facilitar a adesão e migração celular e estimular a angiogênese e a troca metabólica, ter uma certa estabilidade de forma e propriedades mecânicas intrínsecas semelhantes às dos tecidos defeituosos, ser biocompatível com o corpo e biodegradável com uma taxa controlável no corpo. Também precisa mostrar pouca ou nenhuma imunogenicidade. Finalmente, o *scaffold* precisa ser capaz de incluir pistas biológicas e físicas que afetam o fenótipo celular e promovem o crescimento celular direcionado (CHAN; LEONG, 2008).

Os *scaffolds* de MEC podem ser preparados em muitas formas, incluindo folhas, pós e hidrogéis. Os hidrogéis de matriz extracelular oferecem vantagens como a injetabilidade, a capacidade de preencher um espaço de formato irregular e a bioatividade inerente da matriz nativa (BROWN et al., 2012; WOLF et al., 2012).

Hidrogéis derivados de tecido descelularizados tem a vantagem de fornecer às células todas as informações que precisam para seu crescimento e expansão (SAHELI et al., 2018). Os hidrogéis são definidos como polímeros altamente hidratados (>30% água em peso), que mantêm a integridade estrutural por interligações físicas e químicas entre cadeias de polímeros (DRURY; MOONEY, 2003). Diversos materiais têm sido empregados em defeitos intraósseos, como o enxerto mineralizado ou desmineralizado liofilizado, as cerâmicas biocompatíveis, os vidros bioativos e os polímeros (HERCULANI et al., 2000).

Um componente crítico da criação e renovação tecidual é a implantação de um número de células adequadas para ser obtida uma regeneração competente. Embora esses desafios permaneçam, células-tronco ou células progenitoras in natura ou cultivadas possibilitarão a expansão de linhagens celulares para o sucesso da engenharia tecidual, minimizando as complicações da regeneração do tecido ósseo (SOARES, 2005).

Lesões graves de pele, como queimaduras extensas, traumas e úlceras crônicas, exigem uma cobertura que proporcione a reparação e restauração da função do tecido. Esta cobertura, geralmente, corresponde ao enxerto autólogo de pele. Contudo, a remoção de pele saudável para a realização da cobertura é um

processo invasivo e doloroso para os pacientes, além de, em alguns casos, ser impossível a obtenção do enxerto, como em pacientes com queimaduras extensas (VARKEY; DING; TREDGET, 2015).

Em lesões que ultrapassam 30% a 40% da superfície corporal, a área doadora disponível e com viabilidade para enxertia geralmente é menor que a área lesionada e as condições clínicas do paciente não permitem a utilização da mesma (LEONARDI, 2008).

2.7.1 Descelularização de tecidos

A tecnologia de descelularização tem sido utilizada para remover componentes celulares em uma variedade de tecidos moles para produção de biomateriais para aplicação clínica. Os objetivos do processo de descelularização são remover material potencialmente imunogênico e fornecer uma estrutura biocompatível (NORTON; BABENSEE, 2009).

A maioria dos protocolos descreve o uso combinatório e sequencial de diferentes técnicas, como físicas, químicas e enzimáticas, como o propósito de alcançar a descelularização do tecido. Na maior parte dos casos, as técnicas químicas e enzimáticas são as principais responsáveis pelo sucesso da descelularização. As técnicas físicas são geralmente utilizadas para complementar técnicas químicas e enzimáticas e, portanto, aumentar os efeitos de descelularização (MENDIBIL et al., 2020).

Alguns protocolos já foram descritos com o objetivo de descelularização para vários tecidos, de várias espécies animais, como vesícula urinária, esôfago, traqueia, pulmão, músculo esquelético, coração, válvulas cardíacas, nervo periférico, medula espinhal, cartilagem e derme (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; URBANO et al., 2017; MATIAS et al., 2018; MARTINS et al., 2020; MIRANDA et al., 2020, 2021; SAKINA et al., 2020; NIETO-NICOLAU et al., 2021; DE SÁ SCHIAVO MATIAS et al., 2022).

2.8. Cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo complexo que integra as funções dos elementos contidos no sangue, na matriz extracelular, nas células do parênquima e mediadores solúveis. Em feridas não complicadas o processo de cicatrização ocorre seguindo uma sequência de tempo (PAVLETIC, 2018a, 2018b).

O processo cicatricial em mamíferos adultos resulta em formação de cicatrizes sem apêndices de pele (TAKEO; LEE; ITO, 2015).

A cicatrização depende de vários fatores, locais e gerais, como: localização anatômica, tipo da pele, raça e técnica cirúrgica utilizada (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A cicatrização normal da ferida envolve três fases sucessivas, mas sobrepostas, incluindo fase inflamatória (hemostasia), fase proliferativa (ou granulação) e fase de remodelação (ou maturação) (WANG; SUGAHARA; LI, 2016).

2.8.1. Fase inflamatória

A fase inflamatória, é a que ocorre logo após uma lesão, onde ocorre a liberação de substâncias vasoconstritoras, como tromboxano A₂ e prostaglandinas, pelas membranas celulares. O tecido lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação para promover a hemostasia (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a, 2006b).

A hemostasia primária e secundária ocorre através de duas vias mecanicamente e simultâneas emaranhadas. Na hemostasia primária, a agregação de plaquetas e a formação de tampões plaquetas são solicitadas pela exposição de colágeno dentro da matriz subendotelial. Na hemostasia secundária, ocorre a ativação da cascata de coagulação em que o fibrinogênio solúvel é alterado para fios insolúveis, resultando na formação de uma rede de fibrinas. Quando essa cascata é iniciada, grânulos são liberados pelas plaquetas, as quais contêm TGF- β e fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanos, que atraem neutrófilos à ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a, 2006b).

O coágulo é formado por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, aumentando seus efeitos. Assim, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a, 2006b).

2.8.2. Fase proliferativa

Durante a fase proliferativa ocorre a formação do estroma de tecido conjuntivo (fibroplasia/desmoplasia), de novo endotélio (angiogênese) e de novo epitélio (epitelização), para restaurar a estrutura e a função dos tecidos lesados (ACKERMANN, 2017).

A fase proliferativa é constituída por proliferação e migração de fibroblastos, com deposição de matriz extracelular no local da ferida, neovascularização, e proliferação e migração de células epiteliais. A atividade dos fibroblastos e a neovascularização resultam na formação do tecido de granulação (BOJRAB; MONNET, 2010).

2.8.3. Fase de remodelação

A última etapa da cicatrização é a fase de remodelação, que precisa de um equilíbrio preciso entre a apoptose das células existentes e a produção de novas células. A degradação gradual da MEC e do colágeno tipo III imaturo e a formação de colágeno tipo I maduro são importantes nessa fase, que continua por alguns meses e anos (WANG; SUGAHARA; LI, 2016).

2.8.4. Cicatrização

A cicatrização da pele pode ocorrer de 3 modos: por primeira intenção (quando as margens da ferida são apostas diretamente e cicatrizam rapidamente); por segunda intenção (quando não há aposição íntima entre os bordos da ferida) (ACKERMANN, 2017) e por terceira intenção (que corresponde ao encerramento

secundário, realizado após a formação de tecido de granulação) (PAVLETIC, 2018a).

O manejo de feridas é desafiador, principalmente para lesões crônicas, apesar da disponibilidade de vários tipos de *scaffold* no mercado. Alguns dos curativos que estão na prática clínica têm várias desvantagens, como má eficácia antibacteriana e antioxidante, más propriedades mecânicas, incapacidade de absorver excesso de exsudatos de feridas, requerem mudança frequente de curativo e não oferecem um ambiente úmido adequado para acelerar o processo de cicatrização da ferida (MBESE; ALVEN; ADERIBIGBE, 2021).

Existem alguns estudos recentes que relatam técnicas promissoras para o tratamento de feridas de pele à base de hidrogéis de MEC para queimaduras (STOICA; CHIRCOV; GRUMEZESCU, 2020) e cicatrização de outros tipos de feridas (VRIEND et al., 2021), substitutos de pele acelulares comerciais como curativos temporários, também são bastante utilizados (VARKEY; DING; TREDGET, 2015; VIG et al., 2017; REZAIE; MOMENI-MOGHADDAM; NADERI-MESHKIN, 2019).

Avanços na área de medicina regenerativa para cicatrização de feridas utilizando-se biomaterias e células são desejáveis e promissores.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Padronizar a descelularização dos *scaffolds* de derme cadavérica canina para a confecção de um creme a base de MEC, visando avaliar sua eficácia para o fechamento de feridas realizadas com *punch* em cadelas que foram submetidas ao procedimento cirúrgico eletivo de esterilização (OSH).

3.2. Objetivos Específicos

a) Padronizar os protocolos de descelularização das peles caninas a fim de obter um *scaffold* descelularizado com as estruturas da MEC preservadas para produção de um produto tópico;

b) Caracterizar os *scaffolds* descelularizados e controle por meio das análises histológicas (colorações de Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de Masson, *Alcian Blue* e Safranina O);

c) Analisar a ultraestrutura dos *scaffolds* descelularizados de pele canina e tecido nativo (Microscopia Eletrônica de Varredura);

d) Quantificar o valor residual de DNA genômico das amostras de pele canina descelularizada e tecido nativo;

e) Testar de eficiência do creme de MEC de derme canina descelularizada no processo de cicatrização de regiões de feridas induzidas de 8mm (*punch*) de cadelas submetidas a cirurgia de esterilização (OSH).

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Amostras biológicas

Pele cadavérica da região abdominal de cães adultos ($n^{\circ}=04$), foram coletadas para o estudo na Clínica Veterinária Ponta Porã, localizada na Rua Cerro Corá, 1438 no bairro do Alto da Lapa em São Paulo/SP. Esse grupo de animais foi escolhido aleatoriamente, sendo todos os animais: médio porte, sem raça definida (SRD), e fêmeas. As amostras de pele foram acondicionadas em caixas térmicas a 4°C e transportadas ao Laboratório de Engenharia Tecidual do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) e armazenadas em freezer -20°C para preservação das amostras. Após descongeladas, as peles caninas foram incisionadas em pequenos fragmentos de 1cm x 1cm, e submetidas ao processo de descclularização. Este projeto foi conduzido em conformidade aos regulamentos do Comitê de Ética Animal da FMVZ/USP (n° 2790190220).

4.2. Descclularização de pele (derme) canina

Inicialmente, os fragmentos de derme canina cadavérica (1cm x 1cm) foram lavados em solução de H₂O destilada com EDTA 1% (#197072, Synth) para remoção de sangue, e em tampão fosfato-salino ([PBS] 136,9 mM de NaCl, 26,8 mM de KCl, 14,7 mM de KH₂PO₄ e 8 mM de Na₂HPO₄, pH 7,2, LGC Bio) suplementadas com 0,5% de antibiótico (ATB, Penicilina-Streptomicina, #BR30110-01, LGC Biotecnologia) por três vezes durante 15 minutos sob agitação orbital (40 rotações por minuto, rpm) a temperatura ambiente. Os *scaffolds* de derme canina foram submetidos ao protocolo de descclularização durante 10 dias (**Figura 3**), e lavados diariamente em PBS para retirada do detergente e então armazenados em geladeira. Todos os processos foram conduzidos sob condições estéreis em fluxo laminar.

Figura 3. Fluxograma do protocolo de descelularização dos scaffolds de pele (derme) canina durante 10 dias e produção do produto para aplicação tópica.



Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: Protocolo de descelularização da derme canina. (A) Obtenção das amostras de pele (derme) canina cadavérica da região abdominal (nº= 04). As peles caninas foram incisionadas em pequenos fragmentos (1cm X 1cm); (B) Lavagem dos *scaffolds* por três vezes em 1% EDTA / PBS + 0,5% ATB; (C) Processo de descelularização das dermes caninas pela ação do detergente iônico SDS (Dodecil Sulfato de Sódio, LGC Biotecnologia, #13-1313-01) a uma concentração de 0,5% combinado à ação mecânica de agitação orbital (40 rpm). As peles foram imersas na solução descelularizante (SDS 0,5 %). Foram realizadas duas trocas diárias das soluções, sendo estas mantidas em agitação orbital (40 rpm) pelo período de 5 horas durante 12 dias de protocolo; (D') *Scaffolds* de derme canina descelularizada submetidos as análises histológicas, quantificação de DNA genômico e microscopia eletrônica de varredura (D'') Matriz de derme canina descelularizada para produção do creme de MEC para teste em feridas de procedimento cirúrgico.

4.3. Análise dos tecidos de pele descelularizado / controle

Scaffolds descelularizados e nativos (controle) de pele canina foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA, OH (CH₂O) nH, Synth) por 48 horas em temperatura ambiente, desidratadas em séries crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e 100% por 20 minutos cada) e diafanizadas em xilol por 40 minutos. Após serem embebidas em parafina, secções de 5µm em micrótomo (Leica, RM2125RT) foram transferidas para lâminas de vidro. Para avaliar a estrutura e os componentes da MEC (proteínas estruturais, GAGs e PGs) realizamos as colorações de Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricrômio de Masson, Alcian Blue (EasyPath, HistoKit) e Safranina O (NovaUltra, StainKit). As lâminas foram analisadas em microscópio Nikon Eclipse 80i. A fluorescência por DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) foi utilizada para certificar a ausência de núcleos celulares nos *scaffolds* descelularizados de pele canina. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS 1%, coradas em solução DAPI (1:10000) por aproximadamente 10 minutos e logo após lavadas novamente em PBS 1%. As lâminas foram analisadas e fotodocumentadas em microscópio Nikon Eclipse 80i.

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Scaffolds descelularizados e tecido nativo (controle) de pele canina foram fixadas em PFA 4%. Posteriormente, as amostras foram lavadas quatro vezes em H₂O destilada (trocada a cada lavagem) no banho ultrassom (25 kHz, 150 Watts) por cinco minutos. Estes foram desidratados em séries crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e 100% por cinco minutos cada), secos no ponto crítico (LEICA CPD 300) 1 hora e colados em *stubs* em metal com fita de carbono e metalizados com ouro. A leitura foi fotodocumentadas em um microscópio LEO 435 VP.

4.5. Quantificação de DNA genômico

O DNA genômico (gDNA) foi isolado a partir de 50mg de tecido provenientes dos *scaffolds* de pele (derme) canina descelularizada e do tecido nativo (controle) usando o *Illustra Tissue and Cells Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). As amostras foram digeridas com ProteinaseK e tampão de lise à 56°C por 4 horas. As amostras foram purificadas e analisadas por espectrofotometria a 260nm (Nanodrop, Thermo Scientific).

4.6. Confeção do creme de MEC descelularizada

Scaffolds descelularizados de pele canina foram fragmentados (0,2 – 0,3 cm²), congelados em nitrogênio líquido (NL₂) e macerados em cadinho (60-100mL), sob condições estéreis em fluxo laminar.

Uma proporção de 70% de MEC descelularizada de derme canina foi adicionada a 30% de creme Polawax™ e misturados, e armazenados em geladeira até a aplicação tópica.

4.7. Avaliação do Processo Cicatricial

Em um primeiro momento foi realizado um teste piloto com 2 cadelas submetidas a cirurgia de ovariosalpingohisterectomia (OSH) eletiva onde foram avaliadas a técnica cirúrgica para formação de feridas de maneira intencional bem como a escolha da região delas.

Como protocolo para a cirurgia, as medicações escolhidas como drogas pré-anestésicas foram acepromazina 0,02mg/Kg, cloridrato de tramadol 2,5ml/Kg, petidina 2,5mg/Kg e cetamina 2mg/ Kg. A Indução anestésica foi realizada com propofol 5mg/Kg e posterior manutenção com isoflurano e FLK (Fentanil 5ug/kg, lidocaína 0,5 mg/kg e cetamina 1 mg/kg). A analgesia no pós-operatório foi assegurada com Meloxicam na dose de 0,1mg/kg e dipirona na dose de 25mg/kg, a

cada 24hs e 12hs respectivamente por 7 dias. Todos os animais permaneceram com roupa de proteção cirúrgica durante todo o período do tratamento.

Posteriormente, realizou-se um estudo observacional longitudinal em 5 cadelas em anestro sem raça definida, com média de peso entre 4 - 9Kg e idade entre 1 - 3 anos, que também foram submetidas a cirurgia de OSH eletiva onde duas pequenas rupturas epiteliais de aproximadamente 8mm foram realizadas através de *punch*, próximas ao local da incisão cirúrgica.

Em uma ruptura mais caudal foi aplicado 1 vez ao dia durante oito dias de tratamento um creme não iônico (Polawax™) utilizado rotineiramente na indústria farmacêutica como uma base farmacológica para o carreamento de substâncias ativas de forma rápida para a pele, sendo um veículo e desprovido de qualquer outro componente como controle. Como grupo experimental, na ruptura mais cranial foi aplicado 1 vez ao dia durante oito dias de tratamento o mesmo creme acrescido com componentes da matriz extracelular provenientes da derme descelularizada canina.

Cada cadela foi avaliada através de fotodocumentação e medição da área lesada ao longo de um período de 08 dias, considerando 4 momentos de avaliação diferentes, nomeadamente: o pós-cirúrgico imediato (T1); 3 dias após a cirurgia (T2), 5 dias após a cirurgia (T3) e 8 dias após a cirurgia (T4).

5. RESULTADOS

Após a descelularização, as matrizes de derme canina submetidas ao protocolo de descelularização apresentaram uma aparência esbranquiçada e transparente, provavelmente devido à remoção dos componentes celulares do tecido (**Figura 4A**).

Figura 4. Avaliação macroscópica da derme canina submetida ao protocolo de descelularização.



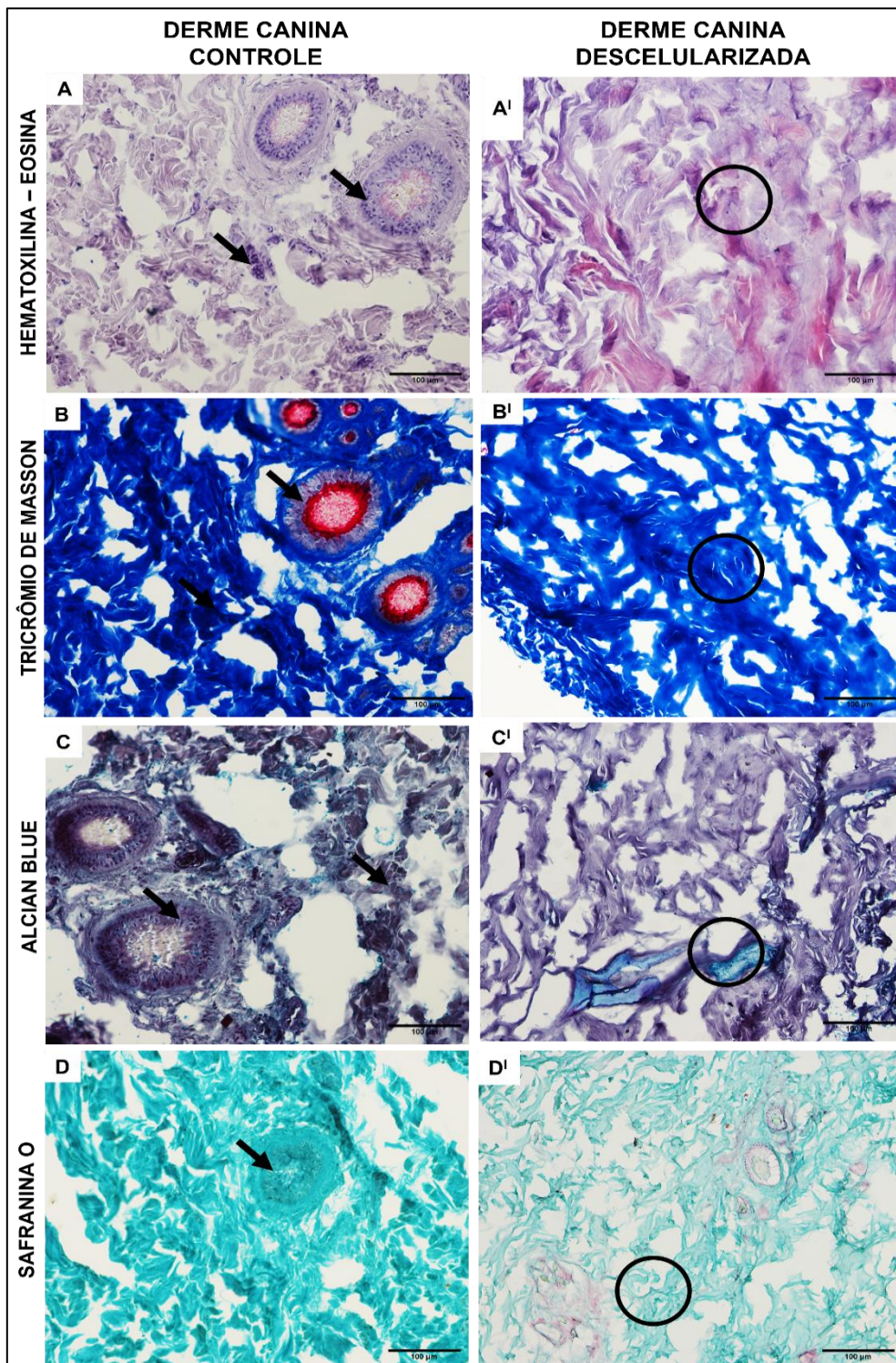
Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: Derme canina descelularizada (SDS 0,5%) com a estrutura tridimensional da MEC preservada após 12 dias de protocolo de remoção das células do tecido. Observar macroscopicamente coloração translúcida do tecido.

Após o processo de descelularização, a análise da MEC pela coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) revelou a ausência dos núcleos celulares nas camadas da derme, e nas regiões dos folículos presentes na MEC no tecido descelularizado quando comparados ao tecido controle (**Figura 5 A- A'**). A principal histoarquitetura da composição de colágenos estruturais da pele permaneceu preservada após os protocolos de descelularização (**Figura 5 B- B'**) pela análise da coloração de Tricrômio de Masson.

As análises histológicas demonstraram a presença de GAGs, por meio da coloração de Alcian Blue, e de PGs, por meio das colorações de Safranina O, indicando que a composição de tais glicoproteínas foram preservados nos tecidos descelularizados, quando comparados ao tecido controle (**Figura 5 C- D'**).

Figura 5. Avaliação histológica da pele canina descelularizada comparado ao tecido controle.

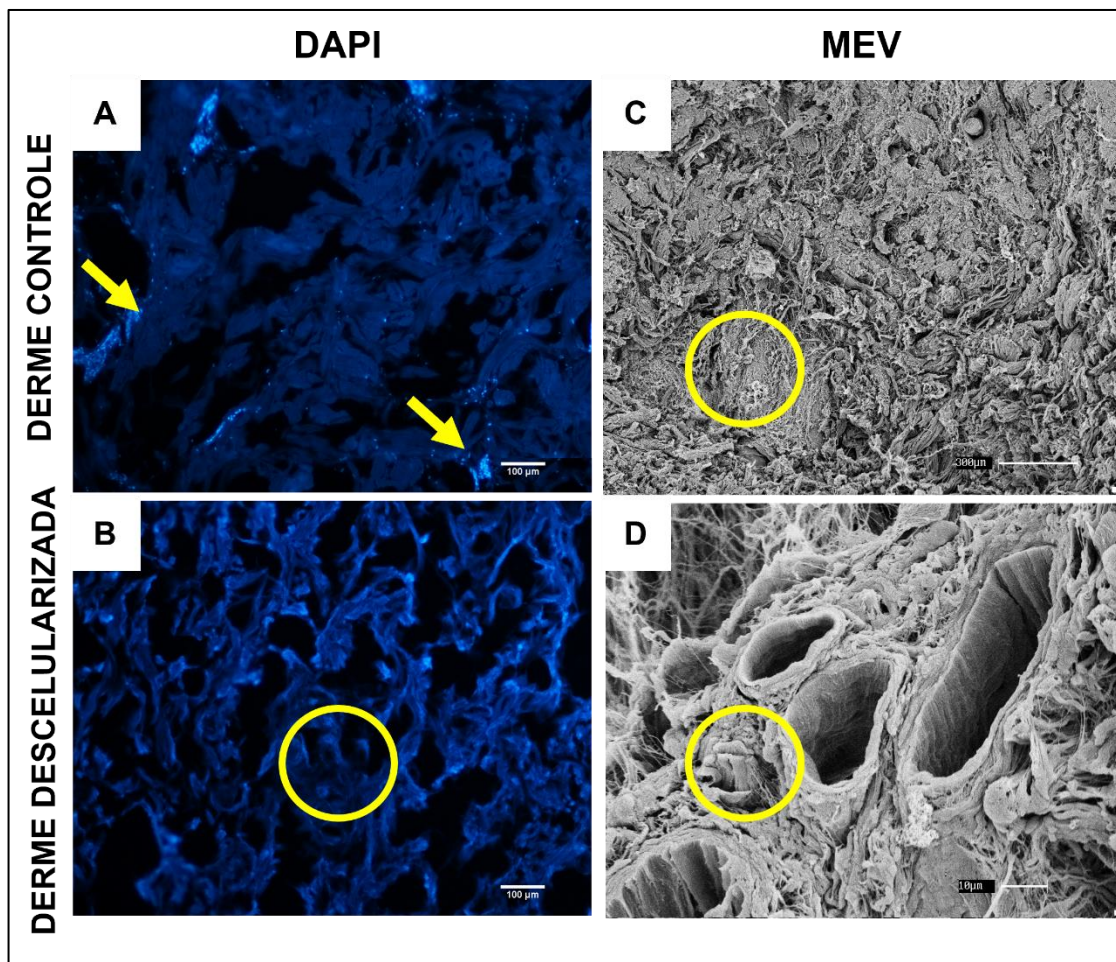


Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: (A- A') Coloração por H&E (B- B') Tricrômio de Masson. Em (A e B) os núcleos celulares são visíveis nas camadas da membrana basal da derme (seta), Em (A' e B'), derme caninas descelularizada (círculo) com estrutura da MEC preservada, com estruturas de fibras colágenas coradas em azul (B'). Em (C- C') Coloração de Alcian Blue para GAGs (azul turquesa) e núcleo (preto). Em (D- D') Coloração de Safranina O para proteoglicanos (núcleo: preto / citoplasma: verde azulado). Aumento: 100µm

A eficiência do processo de descelularização da derme canina foi observada através da presença de ácidos nucleicos, visualizados por fluorescência de DAPI, cuja marcação foi ausente no tecido descelularizado, demonstrando a ausência de núcleos celulares no *scaffold* quando comparado ao tecido controle (**Figura 6 A- B**). Da mesma maneira em que na análise ultraestrutural de microscopia eletrônica por varredura (MEV) foi observada a ausência de estruturas celulares no tecido descelularizado comparado ao tecido controle (**Figura 6 C- D**).

Figura 6. Fluorescência por DAPI e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos scaffolds de pele (derme) canina.

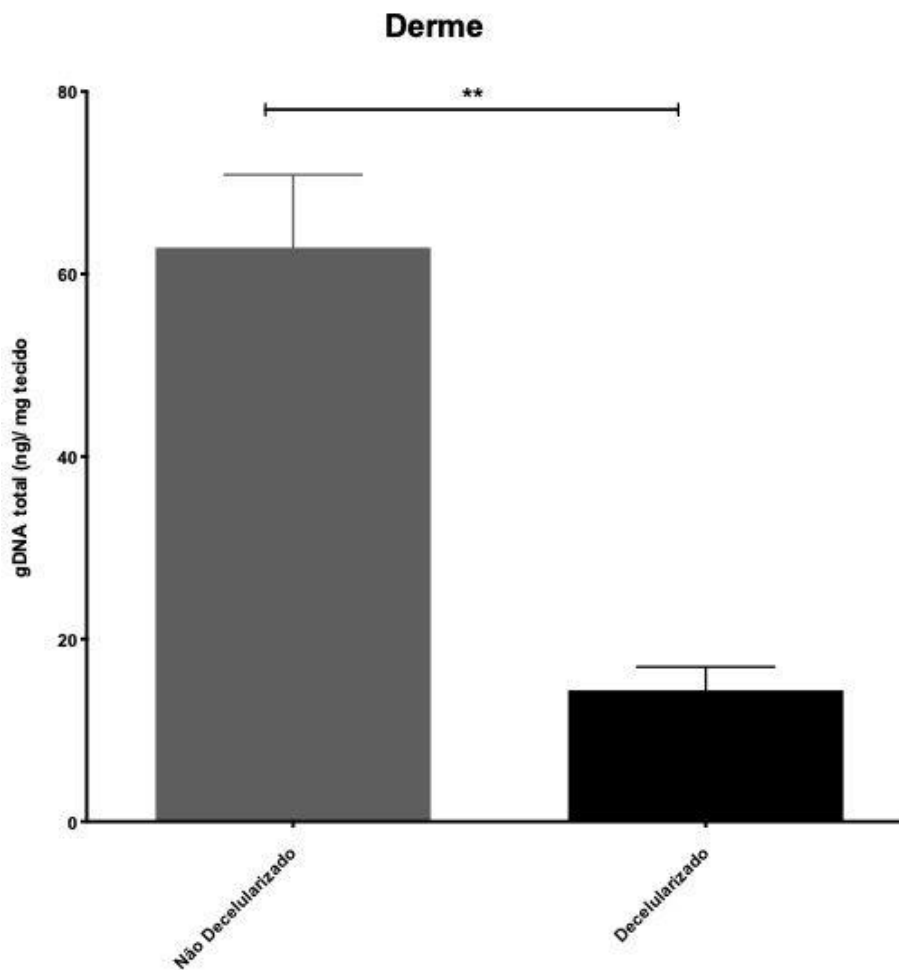


Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: Em (A), observar núcleos celulares evidentes da derme canina controle (seta). Comparativamente em (C), observar ultraestrutura do tecido (MEV), cujo tecido se apresenta de forma mais compacta pela presença das células ainda presentes no tecido (seta). Em (B), observar MEC descelularizada de derme canina com a estrutura preservada após 12 dias de descelularização e sem núcleos evidentes, conforme observado em (D) pela ultraestrutura do tecido, com fibras colágenas de diversos feixes presente. Aumento: (A-B) 300µm / (C) 300µm / (D) 10µm.

A quantidade de gDNA, para avaliar a eficácia do processo de descelularização dos scaffolds de pele (derme) canina, mostrou valores abaixo do critério de descelularização de tecidos de 50 ng/mg de tecido fresco (**Gráfico 1**).

Gráfico 1. Quantificação de DNA genômico na derme canina nativa e descelularizada submetida ao protocolo de descelularização com o detergente SDS.



Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: A concentração de gDNA da pele canina controle (62,90 ng/mg) comparada com a pele descelularizada (14,41 ng/mg). *Teste t student* ($p=0.0045$).

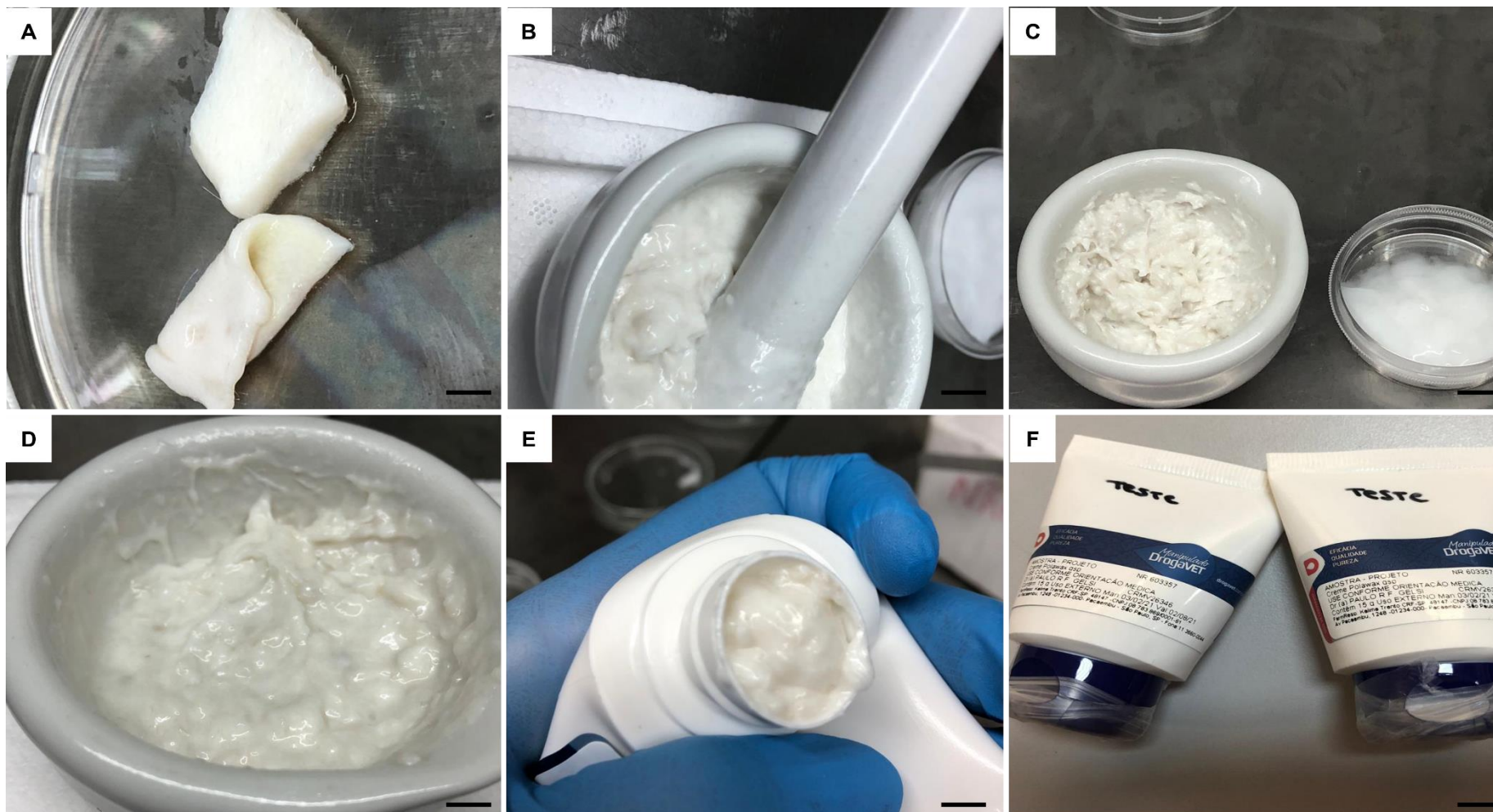
Para a preparação do produto tópico, a derme descelularizada (**Figura 7A**) foi fragmentada com bisturi, congelada em nitrogênio líquido e macerada em cadinho (**Figura 7B**), misturada à base de Polawax™ (**Figura 7C**), misturada e então armazenada em tubos (**Figuras 7E- F**) em geladeira até o momento de aplicação.

Os 5 animais foram avaliados diariamente por um período de 8 dias até a remoção dos fios cirúrgicos. Além da medição da região das rupturas epiteliais através de régua cirúrgica foram realizadas fotografias para registro e estudo das imagens. Nenhum animal apresentou deiscência da sutura, assim como nenhum apresentou presença de infecção, hematoma, edema, corpos estranhos, tecido necrótico e ressecamento.

A mensuração da área da ferida (T1 a T4) permitiram de maneira objetiva e sistematizada obter os parâmetros que indicam melhora ou piora da cicatrização da ferida (**Figura 8**). Os registros fotográficos permitiram avaliar a cor do tecido e a condição da pele circunvizinha. Mais ainda, as fotografias em série foram capturadas por uma câmera digital, a um ponto fixo da imagem, para que possíveis mudanças no curso da cicatrização se tornassem evidentes.

Com os dados obtidos durante o processo de avaliação da cicatrização, demonstramos que os parâmetros observados e mensurados não sofreram alterações expressivas diante a utilização dos componentes da MEC nas condições em que foi colocada nesta pesquisa (**Tabela 1**).

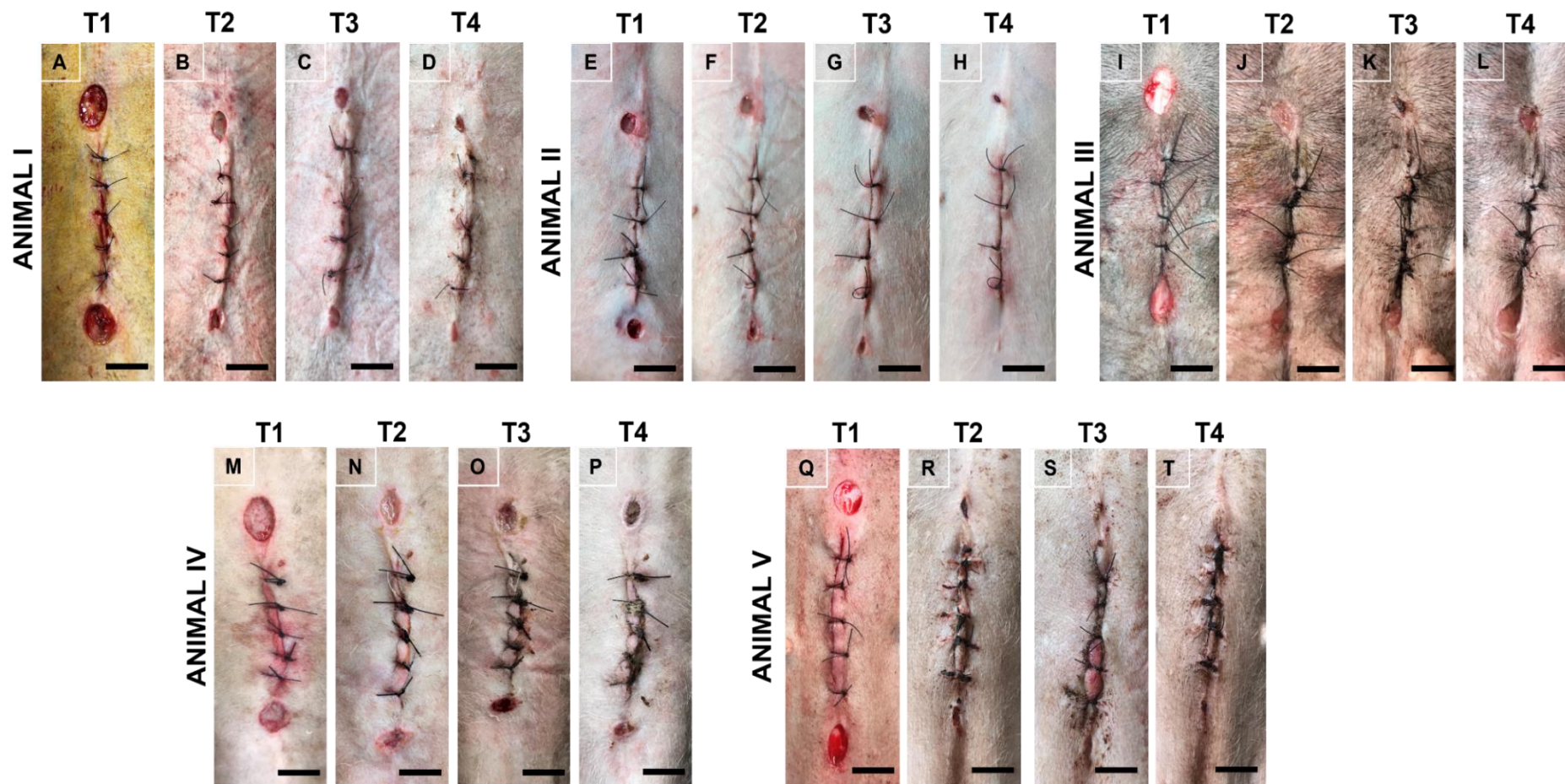
Figura 7. Processo de confecção do creme de MEC da derme descclularizada canina



Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: Em (A) observa-se a derme descclularizada. (B) MEC da derme descclularizada macerada em cadinho. (C) À esquerda, MEC da derme descclularizada macerada e à direita Polawax™. (D) Mistura da MEC da derme descclularizada e Polawax™ pronta para ser armazenada em tubos (E, F). Aumento: 1cm

Figura 8. Fotodocumentação em série a um ponto fixo nos intervalos estabelecidos (T1 a T4) para análise do processo cicatricial.



Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda Avaliação através de fotodocumentação e medição da área lesionada (*punch*) ao longo de um período de 08 dias para 5 animais, com 4 momentos de avaliação diferentes, nomeados: o pós-cirúrgico imediato (T1); 3 dias após a cirurgia (T2), 5 dias após a cirurgia (T3) e 8 dias após a cirurgia (T4). Aumento: 1cm.

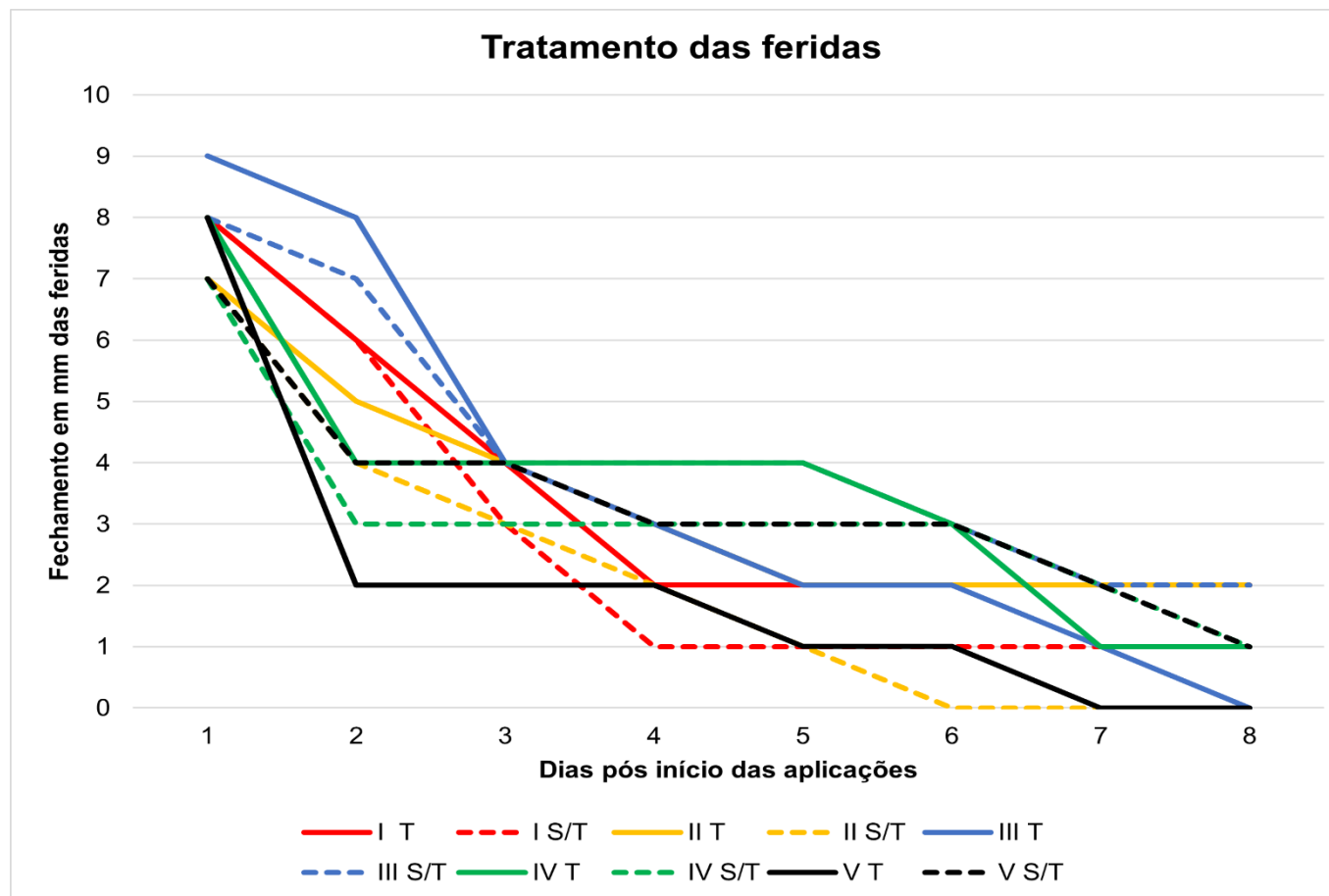
Tabela 1. Relação de tratamento dos animais submetidos as análises experimentais.

ANIMAIS	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8
ANIMAL I	8 mm (T)	6 mm (T)	4 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)
	8 mm (S/T)	6mm (S/T)	3 mm (S/T)	1 mm (S/T)	1 mm (S/T)	1 mm (S/T)	1 mm (S/T)	1 mm (S/T)
ANIMAL II	7 mm (T)	5 mm (T)	4 mm (T)	3 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)	1 mm (T)
	7 mm (S/T)	4 mm (S/T)	3 mm (S/T)	2 mm (S/T)	1 mm (S/T)	fechamento (S/T)	fechamento (S/T)	fechamento (S/T)
ANIMAL III	9 mm (T)	8 mm (T)	4 mm (T)	3 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)	1 mm (T)	fechamento (T)
	8 mm (S/T)	7 mm (S/T)	4 mm (S/T)	4 mm (S/T)	4 mm (S/T)	3 mm (S/T)	2 mm (S/T)	2 mm (S/T)
ANIMAL IV	8 mm (T)	4 mm (T)	4 mm (T)	4 mm (T)	4 mm (T)	3 mm (T)	1 mm (T)	1 mm (T)
	7 mm (S/T)	3 mm (S/T)	3 mm (S/T)	3 mm (S/T)	3 mm (S/T)	3 mm (S/T)	2 mm (S/T)	1 mm (S/T)
ANIMAL V	8 mm (T)	2 mm (T)	2 mm (T)	1 mm (T)	1 mm (T)	1mm (T)	fechamento (T)	fechamento (T)
	7 mm (S/T)	4 mm (S/T)	4 mm (S/T)	3 mm (S/T)	3 mm (S/T)	2mm (S/T)	2 mm (S/T)	1 mm (S/T)

Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: Medidas das feridas em fechamento com creme a base de MEC (T) e creme sem a MEC (S/T) após 8 dias de observação pós *punch* e início do tratamento com creme comparado ao controle.

Gráfico 2. Tratamento das feridas com creme à base de MEC.



Fonte: GELSI, P. R. F. (2022).

Legenda: Linhas cheias correspondem aos animais que receberam o creme à base de MEC em um dos pontos e linhas tracejadas o outro ponto do mesmo animal que recebeu somente o veículo (controle), acompanhados por 8 dias de tratamento. Foram tratados 5 animais inumerados de I a V.

6. DISCUSSÃO

A utilização do EDTA auxiliou na retirada do sangue residual da pele cadavérica. A utilização do detergente SDS proporcionou a lise e retirada de células da matriz extracelular, sendo este processo intensificado através do método físico de agitação orbital, desempenhando uma maior fricção do líquido no material e que o detergente seja mais bem distribuído entre os fragmentos de amostra como já comprovado em trabalhos que visavam a descclularização de outros tecidos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

A análise microscópica permitiu a visualização da ausência de células remanescentes através da coloração de hematoxilina e eosina. A hematoxilina demarcou os núcleos celulares enquanto a eosina é demarcou as fibras de colágeno. Também foi observada a ausência de celularidade através da imunofluorescência por DAPI. A quantificação do gDNA remanescente da derme canina descclularizada foi realizada através do método de gDNA. As amostras analisadas neste trabalho, apresentavam conteúdo de DNA entre 9,96 e 18,81 ng/mg de tecido analisado. Com esses dados obtidos pode-se considerar que o material foi descclularizado, visto que o nível de gDNA encontrado no tecido é menor que 50 ng/mg de tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011), o mesmo já observado em outro trabalho do grupo, onde foi realizada a descclularização de derme de rato (Martins, 2020)

Conforme já descrito por KALLIS; FRIEDMAN, (2018), o colágeno na cicatrização de feridas estimula e recruta células imunes e fibroblastos além de ser material para a degradação por MMPs (metaloproteinases de matriz), preservando assim a estrutura nativa da MEC e promovendo a cura. À vista disso, nosso trabalho utilizou um creme com componentes da MEC para avaliação de cicatrização que dentre os seus componentes há a presença de colágeno.

Outros componentes que desempenham papéis-chave na cicatrização de feridas são os proteoglicanos. Esse fato já relatado por ROUSSELLE; MONTMASSON; GARNIER, (2019) se deve ao seu envolvimento em processos de reparação dérmica, formação de cicatrizes e remodelação da MEC.

Segundo estudos conduzidos por ALMINE; WISE; WEISS, (2012), os autores descrevem que na cicatrização de feridas, a elastina é carente e apenas uma rede de fibras elásticas desorganizadas está presente após a formação da cicatriz. Refere também que a elastina transmite recuo e resistência e induz uma série de atividades celulares, incluindo migração e proliferação celular, síntese matricial e produção de proteases.

O uso de componentes de MEC com a intenção de promover cicatrização de feridas cutâneas, já foi avaliado por ZHOU, ZHI-QIANG et al. (2019). Nele, os pesquisadores utilizaram com êxito células-tronco derivadas de tecidos adiposos para serem induzidas pela matriz extracelular adiposa a diferenciarem em fibroblastos (ZHOU et al., 2018).

Alguns biomateriais que objetiva a cicatrização de ferimentos, já existem disponíveis até comercialmente, como por exemplo o produto Oasis®, o qual utiliza a matriz extracelular da submucosa de intestino delgado suíno e o MatrACELL® que é utilizado como um *scaffold* proveniente de derme humana.

Diversos trabalhos já foram publicados mostrando o uso de biomateriais como enxerto. Entre esses podemos citar um trabalho de DUISIT et al., (2018), que descelularizaram com sucesso enxertos faciais em roedores

Outro trabalho de DUISIT et al., (2018b) realizou a descelularização e posterior semeadura de células-tronco derivadas de tecidos adiposos para obtenção de *scaffolds* auriculares em humanos.

Até a presente data nenhum outro trabalho publicado avaliou a descelularização de derme canina e sua utilização da MEC a base de creme com o objetivo de promover a cicatrização de ferimentos, porém, existem trabalhos em andamento do grupo onde utilizou-se derme canina descelularizada para o tratamento de lesões.

É de referir que mais estudos envolvendo a elaboração de um creme com componentes de MEC com o objetivo de promover a cicatrização necessitam ser avaliados, como também o tamanho da área lesada a ser avaliada, propondo outras variáveis dentro do processo cicatricial. Isto posto, pode se dizer que nosso trabalho colabora com a viabilidade do uso de um *scaffold* biológico em medicina regenerativa.

7. CONCLUSÃO

A descelularização completa da derme foi realizada com sucesso e permitiu a manutenção da arquitetura e dos componentes da matriz extracelular, com total ausência celular. Com isto, este material torna-se viável para uso como um *scaffold* biológico proveniente de derme canina em medicina regenerativa.

Embora a matriz extracelular possua um papel importante na cicatrização de feridas, o uso da derme descelularizada canina como um creme com veículo Polawax™, não desempenhou alterações significativas no processo cicatricial em feridas de pele canina, no protocolo de aplicação delineado.

A utilização deste creme em outros tipos de feridas, de maiores diâmetros, com diferentes concentrações de MEC na sua composição, é de grande relevância para comprovar a eficácia desta técnica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto E Atlas**. 13|2017 ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2018.

ACKERMANN, M. R. Inflammation and Healing. In: **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 73-131.e2.

ALMINE, J. F.; WISE, S. G.; WEISS, A. S. Elastin signaling in wound repair. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 96, n. 3, p. 248–257, set. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdrc.21016>>.

ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3–13, jan. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X13000886>>.

BLAZQUEZ, L. Embriologia e Histologia do Tegumento. In: INTERBOOK (Ed.). **Tratato de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária**. 1 ed. ed. São Caetano do Sul: INTERBOOK EDITORIAL, 2016. p. 3-15.

BOJRAB, M. J.; MONNET, E. **Mechanisms of Disease in Small Animal Surgery**. [s.l: s.n.]

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 21 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm3904>>.

BOROJEVIC, R.; MCT, M. da C. e T.-. Biotecnologia na área de saúde humana e animal: bioengenharia e biomimética. 2002. Disponível em: <http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_tendencias_futuras_saude.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2022.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. **Wound healing: An overview** **Plastic and Reconstructive Surgery** Plast Reconstr Surg, , jun. 2006a. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16801750/>>. Acesso em: 13 ago. 2020.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. SUPPLEMENT, p. 12S-34S, jun. 2006b. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00006534-200606001-00005>>.

BROWN, B. N. et al. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 3, p. 978–987, mar. 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC4325370/>. Acesso em: 13 jul. 2021.

CHAN, B. P.; LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **European Spine Journal**, v. 17, n. S4, p. 467–479, 13 dez. 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00586-008-0745-3>.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, abr. 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211000895>.

DALY, C. D.; CAMPBELL, G. R.; CAMPBELL, J. H. Tissue Engineering. In: **Cardiovascular Research**. Boston, MA: Springer US, 2006. p. 207–220.

DE SÁ SCHIAVO MATIAS, G. et al. In vivo biocompatibility analysis of the recellularized canine tracheal scaffolds with canine epithelial and endothelial progenitor cells. **Bioengineered**, v. 13, n. 2, p. 3551–3565, 1 fev. 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kbie20>.

DEBELLE, L.; TAMBURRO, A. M. Elastin: molecular description and function. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 2, p. 261–272, fev. 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272598000983>.

DECKERS, J.; HAMMAD, H.; HOSTE, E. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, 1 fev. 2018. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00093/full>.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, nov. 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203003405>.

DUISIT, J. et al. Face Graft Scaffold Production in a Rat Model. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 141, n. 1, p. 95–103, jan. 2018a. Disponível em:

<<http://journals.lww.com/00006534-201801000-00021>>.

DUISIT, J. et al. Perfusion-decellularization of human ear grafts enables ECM-based scaffolds for auricular vascularized composite tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 73, p. 339–354, jun. 2018b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706118301995>>.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinaria**. 4ª ed. [s.l.] Elsevier, 2010.

EGAWA, G.; KABASHIMA, K. Barrier dysfunction in the skin allergy. **Allergology International**, v. 67, n. 1, p. 3–11, jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1323893017301557>>.

EXPOSITO, J.-Y. et al. The Fibrillar Collagen Family. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 407–426, 28 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/11/2/407>>.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 15 dez. 2010. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.023820>>.

FREITAS FILHO, L. H. de. **Análise dos efeitos do dermatan sulfato e da heparina em células progenitoras endoteliais e endoteliais maduras tratadas com tnf-alfa**. 2017. Universidade Estadual de Campinas, 2017.

GOMES, ROSALINE KELLY; DAMAZIO, M. G. **Cosmetologia: Descomplicando os princípios ativos**. 5ª edição ed. São Paulo: LMP, 2017.

GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 247–257, 20 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693541>>. Acesso em: 8 maio. 2019.

GRAHAM, D. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 62, n. 4, p. 234–234, 2014.

HERCULANI, P. P. et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**, v. 6, n. 2, p. 7–14, 2000.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animals embryology**. [s.l.: s.n.]

KALLIS, P. J.; FRIEDMAN, A. J. Collagen powder in wound healing. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 17, n. 4, p. 403–408, 2018.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, v. 84, p. 25–34, ago. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202315000997>>.

KEUN KWON, I.; KIDOAKI, S.; MATSUDA, T. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: Structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3929–3939, 2005.

LANGER, R.; VACANTI, J. Advances in tissue engineering. In: Journal of Pediatric Surgery, **Anais...**2016.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, 1993.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Hyaluronan 1. **The FASEB Journal**, v. 6, n. 7, p. 2397–2404, 1992.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1–2, p. 1–22, 2001.

LEONARDI, D. F. **Avaliação do uso associado de células-tronco e engenharia tecidual na regeneração e neovascularização de lesão cutânea em camundongos**. 2008. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2008.

LODISH, A. BERK, H. **Molecular Cell Biology - 8th edition**. [s.l: s.n.]

LU, P. et al. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, p. a005058–a005058, 1 dez. 2011. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3225943/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC3225943/?report=abstract)>. Acesso em: 1 dez. 2020.

MACK, J. A.; ANAND, S.; MAYTIN, E. V. Proliferation and cornification during development of the mammalian epidermis. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 75, n. 4, p. 314–329, dez. 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdrc.20055>>.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de**

Dermatologia, v. 78, n. 4, p. 393–408, 2003.

MARTINS, A. R. et al. Wistar rat dermis recellularization. **Research in Veterinary Science**, v. 131, p. 222–231, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528819308410>>. Acesso em: 14 jul. 2020.

MATIAS, G. de S. S. et al. Optimization of Canine Placenta Decellularization: An Alternative Source of Biological Scaffolds for Regenerative Medicine. **Cells Tissues Organs**, v. 205, n. 4, p. 217–225, 2018. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/492466>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

MBESE, Z.; ALVEN, S.; ADERIBIGBE, B. A. Collagen-Based Nanofibers for Skin Regeneration and Wound Dressing Applications. **Polymers**, v. 13, n. 24, p. 4368, 13 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4360/13/24/4368/htm>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

MENDE, M. et al. Chemical Synthesis of Glycosaminoglycans. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 14, p. 8193–8255, 27 jul. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.6b00010>>.

MENDIBIL, U. et al. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5447, 30 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5447>>.

MIOT, L. D. B. et al. **Fisiopatologia do melasma** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2009. .

MIRANDA, C. M. F. C. et al. Effects of chemical and physical methods on decellularization of murine skeletal muscles. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 2, 2021. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652021000300816&tlng=en>.

MIRANDA, C. M. F. de C. et al. Decellularization of Extracellular Matrix from Equine Skeletal Muscle. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 90, p. 102962, 1 jul. 2020.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 771–785, 5 dez. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm3902>>.

MUNCIE, J. M.; WEAVER, V. M. The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. In: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l: s.n.]130p. 1–37.

NIETO-NICOLAU, N. et al. Effective decellularization of human nerve matrix for regenerative medicine with a novel protocol. **Cell and Tissue Research**, v. 384, n. 1, p. 167–177, 20 abr. 2021. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-020-03317-3>>.

NORTON, L. W.; BABENSEE, J. E. Innate and Adaptive Immune Responses in Tissue Engineering. In: **Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 721–747.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery** . [s.l: s.n.]

PAVLETIC, M. M. Basic Principles of Wound Management. In: **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery** . [s.l: s.n.]

RAMÍREZ, E. **O que é Engenharia Biomédica?** Disponível em: <<http://www.uel.br/pessoal/ernesto/2ele048/engbio.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

RAPOSO, G.; MARKS, M. S. Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 786–797, out. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2258>>.

REZAIIE, F.; MOMENI-MOGHADDAM, M.; NADERI-MESHKIN, H.

Regeneration and Repair of Skin Wounds: Various Strategies for Treatment. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 18, n. 3, p. 247–261, 1 set. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31257948>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

ROIG-ROSELLO, E.; ROUSSELLE, P. The Human Epidermal Basement Membrane: A Shaped and Cell Instructive Platform That Aging Slowly Alters. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1607, 27 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/10/12/1607>>.

ROUSSELLE, P.; MONTMASSON, M.; GARNIER, C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. **Matrix Biology**, v. 75–76, p. 12–26, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X17303141>>.

SACKETT, S. D. et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10452, 11 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-28857-1>>.

SAHELI, M. et al. Three-dimensional liver-derived extracellular matrix hydrogel promotes liver organoids function. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 6, p. 4320–4333, jun. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.26622>>.

SAKINA, R. et al. Decellularization of porcine heart tissue to obtain extracellular matrix based hydrogels. In: **Methods in Cell Biology**. [s.l: s.n.]157p. 3–21.

SALESSE, S. et al. Elastin molecular aging promotes <sc>MDA</sc> -

<scp>MB</scp> -231 breast cancer cell invasiveness. **FEBS Open Bio**, v. 8, n. 9, p. 1395–1404, 2 set. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.12455>>.

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. **Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing** *Wound Repair and Regeneration*, 2009. .

SHARPLES, F. E. **Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2002.

SMITH, K. R.; THIBOUTOT, D. M. Thematic review series: Skin Lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 2, p. 271–281, fev. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520428482>>.

STOICA, A. E.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M. Hydrogel Dressings for the Treatment of Burn Wounds: An Up-To-Date Overview. **Materials**, v. 13, n. 12, p. 2853, 25 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1996-1944/13/12/2853>>.

SUZUKI, N.; YOKOYAMA, F.; NOMIZU, M. Functional Sites in the Laminin Alpha Chains. **Connective Tissue Research**, v. 46, n. 3, p. 142–152, 6 jan. 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03008200591008527>>.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound Healing and Skin Regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. a023267–a023267, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25561722/>>. Acesso em: 29 jan. 2022.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, fev. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15002574>>.

URBANO, J. J. et al. Effects of two different decellularization routes on the mechanical properties of decellularized lungs. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178696, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0178696>>.

VARKEY, M.; DING, J.; TREDGET, E. Advances in Skin Substitutes—Potential of Tissue Engineered Skin for Facilitating Anti-Fibrotic Healing. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 547–563, 9 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-4983/6/3/547>>.

VIG, K. et al. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 789, 7 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/789>>.

VRIEND, L. et al. Extracellular Matrix-Derived Hydrogels to Augment Dermal Wound Healing: A Systematic Review. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 30 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2021.0120>>.

WANG, S.; SUGAHARA, K.; LI, F. Chondroitin sulfate/dermatan sulfate sulfatases from mammals and bacteria. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, n. 6, p. 841–851, 15 dez. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10719-016-9720-0>>.

WOLF, M. T. et al. Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 33, n. 10, p. 2916–2925, abr. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212000087>>.

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 3, p. 119–136, 6 mar. 2015. Disponível em:

<<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/wound.2013.0485>>. Acesso em: 28 jan. 2022.

YI, S. et al. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 3, p. 233–246, 15 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-888X&volume=12&issue=3&spage=233>>.

ZHOU, Z. et al. Adipose extracellular matrix promotes skin wound healing by inducing the differentiation of adipose-derived stem cells into fibroblasts. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 2, 30 nov. 2018. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2018.4006>>.