



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Nayara dos Santos Souza

Método de descelularização de pele de tilápia (*Oreochromis sp*)

Juiz de Fora
2022



Nayara dos Santos Souza

Método de descelularização de pele de tilápia (*Oreochromis sp*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Coorientador: Profa. Dra. Michele Munk

Juiz de Fora
2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

dos Santos Souza, Nayara.

Método de descclularização de pele de tilápia (*Oreochromis sp.*) / Nayara dos Santos Souza. -- 2022.

48 p.

Orientador: Carlos Magno da Costa Maranduba

Coorientadora: Michele Munk Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2022.

1. Engenharia de tecidos. 2. Descclularização. 3. Queimaduras. I. Magno da Costa Maranduba, Carlos, orient. II. Munk Pereira, Michele, coorient. III. Título.

Nayara dos Santos Souza

Método de descelularização de pele de tilápia (*Oreochromis sp.*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em (16) de (Agosto) de (2022)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Mestre Marízia Trevizani
Universidade Federal de Juiz de Fora

Mestre Laís Lopardi Leal
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio durante a jornada da graduação e agradeço aos amigos que sempre me apoiaram e proporcionaram momentos únicos durante esses anos.

Não posso deixar de agradecer aos colegas de laboratório que me ajudaram muito, me ensinando e auxiliando sempre que possível.

Agradeço ao meu orientador Dr Carlos Magno por ter me aceito como aluna e me auxiliado nesse período. Agradeço também à Dra Michele Munk, minha co-orientadora, por ter me guiado durante a faculdade.

RESUMO

Nayara dos Santos Souza

Queimaduras são uma grande agressão no organismo que prejudicam a manutenção das características funcionais da pele e o tratamento, na rede pública, é realizado por meio da utilização do antimicrobiano tópico sulfadiazina de prata a 1%, até a completa reparação da lesão. Recentemente, tecidos biológicos de origem animal tais como, pele de porco, pericárdio bovino e pele de rã são comumente utilizados como curativos biológicos nas lesões por queimadura. Nesse contexto, visando o desenvolvimento de tratamentos que superem limitações financeiras e pensando em tratamentos mais eficazes, o estudo busca avaliar a eficiência dos processos de descclularização com a utilização SDS 1% e o Triton X-100 e determinar a integridade do tecido pela dosagem de colágeno. A eficácia da descclularização da pele de tilápia foi avaliada por meio da extração do DNA seguido por quantificação e eletroforese em gel de agarose e marcação nuclear com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). A matriz, após descclularização, foi avaliada pela dosagem de colágeno. Assim, o processo de descclularização tecidual alcançou redução de 95,1% do protocolo 1 e 84,29% do protocolo 2 da quantidade de DNA das amostras. Núcleos celulares não foram visíveis na coloração de DAPI, e foi observado a ausência de bandas de DNA no gel de agarose. O conteúdo do colágeno não apresentou grandes alterações estatísticas quando comparado ao tecido *in natura*, com a descclularização. Entretanto foi observado que o SDS 1% foi mais eficaz na descclularização em comparação ao Triton X-100. Em conjunto esses resultados prévios indicam que o protocolo desenvolvido utilizando apenas o SDS 1%, se apresenta como um meio para a descclularização da pele de tilápia, com potencial aplicação na regeneração de pele acometidas por queimaduras.

Palavras-chave: Queimaduras, Pele de Tilápia, Descclularização, Engenharia de Tecidos.

ABSTRACT

Nayara dos Santos Souza

Burns are a major aggression in the body that impair the maintenance of the functional characteristics of the skin and the treatment, in the public network, is performed by using the topical antimicrobial silver sulfadiazine 1% until complete repair of the lesion. Recently, biological tissues of animal origin such as pig skin, bovine pericardium and frog skin are commonly used as biological dressings in burn injuries. In this context, aiming at the development of treatments that overcome financial limitations and thinking about more effective treatments, the study seeks to evaluate the efficiency of decellularization processes using SDS 1% and Triton X-100 and to determine the integrity of the tissue by collagen dosage. The efficiency of decellularization of tilapia skin was evaluated by DNA extraction followed by quantification and electrophoresis in agarose gel and nuclear labeling with 4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI). The matrix, after decellularization, was evaluated by collagen dosage. Thus, the process of tissue decellularization achieved 95.1% of protocol 1 and 84.29% of protocol 2 reduction in the amount of DNA in the samples. Cell nuclei were not visible in the DAPI staining, and the absence of DNA bands was observed in the agarose gel. The collagen content did not show major statistical changes when compared to fresh tissue with decellularization. However it was observed that SDS 1% was more effective in decellularization compared to Triton X-100. Taken together, these previous results indicate that the protocol developed using only 1% SDS, presents itself as a means for the decellularization of tilapia skin, with potential application in the regeneration of skin affected by burns.

Keywords: Burns, Tilapia Skin, Decellularization, Tissue Engineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Epiderme.....	16
Figura 2: Camadas da epiderme.....	17
Figura 3: Derme.....	18
Figura 4: Corte histológico da hipoderme.....	19
Figura 5: <i>Oreochromis</i> sp.....	20
Figura 6: Corte histológico de <i>Oreochromis</i> sp.....	21
Figura 7: Corte histológico de <i>Oreochromis</i> sp: Derme.....	22
Figura 8: Pele <i>in natura</i> de Tilápia (<i>Oreochromis</i> sp).....	29
Figura 9: Pele descelularizada.....	30
Figura 10: Rendimento.....	36
Figura 11: Quantificação de DNA dos grupos experimentais.....	37
Figura 12: Eletroforese de DNA.....	38
Figura 13: Confirmação da descelularização com marcação nuclear através da coloração de DAPI.....	39
Figura 14: Quantificação do colágeno.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Peso das amostras.....	31
Quadro 2 :Quantificação do conteúdo de DNA.....	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COL-I	Colágeno tipo I
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	<u>Deoxyribonucleic acid</u>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
GAGs	Glicosaminoglicanos
HCl	Ácido clorídrico
H&E	Hematoxilina e Eosina
MEC	Matriz Extracelular
PBS	Tampão fosfato salino
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
UV	Ultraviolet radiation

LISTA DE SÍMBOLOS

%: percentual

°C: graus celsius

μL: microlitro

cm: centímetro

g: grama

M: molar ou mol/L

mA: miliampere

mg: miligrama

min: minuto(s)

mL: mililitro

mM: milimolar

m²: metro quadrado

n: número

ng: nanogramas

nm: nanômetro

p: significância

pb: pares de base

p/v: peso/ volume

x G: multiplicação pela aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO LITERÁRIA.....	15
	2.1 PELE.....	15
	2.1.1 Pele Humana.....	19
	2.1.2 Pele de Tilápia.....	20
	2.1 MATRIZ EXTRACELULAR	23
	2.2.1 Colágeno.....	23
	2.2 ENGENHARIA DE TECIDOS.....	24
	2.3.1 Descelularização.....	26
	2.3.2 Detergentes.....	27
3	OBJETIVOS	28
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
	4.1 COLETA DO MATERIAL.....	29
	4.2 PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO.....	29
	4.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	30
	4.4 ANÁLISE DE COLÁGENO.....	32
	4.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	32
	4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
	5.1 QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	34
	5.2 ANÁLISE DE COLÁGENO.....	39
6	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A queimadura é uma grande agressão no organismo, caracterizada por uma lesão devido a algum trauma de origem térmica que é visto desde pequenas bolhas até o estrago total da pele (queimaduras de terceiro grau) (LIMA-JUNIOR e cols, 2008).

Segundo Miranda e cols (2020), a lesão provocada pela queimadura é classificada de acordo com a sua profundidade, sendo de primeiro grau, quando apenas a epiderme for atingida, tendo como sintomas eritema e dor; de segundo grau, quando atinge a epiderme e parte da derme, provoca a formação de flictenas (bolhas); e por fim, de terceiro grau, quando envolve todas as camadas da pele, apresentando-se esbranquiçada ou negra, pouco dolorosa e seca. Para o tratamento, é válido considerar não apenas a profundidade da lesão, mas também a sua fase evolutiva (WHITNEY, 2005). As queimaduras de primeiro grau, dependendo da extensão, geralmente evoluem rapidamente, regenerando-se em até cinco dias, sendo indicado apenas uso de creme hidratante local.

No Brasil, entre 2008 e 2017, foram registradas mais de 170 mil hospitalizações e a incidência mostrou tendência a diminuição ($p=0,002$). As crianças de 0 a 9 anos tiveram a maior incidência anual (1,32 a 1,87 a cada 10.000 habitantes). A taxa de hospitalização acumulada foi de 8,94 por 10.000 habitantes, a média de permanência foi de 8 dias e o percentual de mortalidade hospitalar foi de 3,5%. (SBQ, 2019; CITRON e cols, 2018).

De acordo com o Sistema Único de Saúde (SUS), a cada ano no Brasil, um milhão de pessoas sofrem queimaduras e o gasto foi de 55 milhões anualmente para o tratamento destes pacientes (MIRANDA. B.J.M, 2018).

Em nosso país, na rede pública, o tratamento convencional com curativos se dá: nas queimaduras de segundo grau, mediante banho diário com clorexidina a 2% e o curativo é feito com o antimicrobiano tópico sulfadiazina de prata a 1%, até a completa reparação da lesão (2º grau superficial em torno de 12 dias e profundo entre 21 e 25 dias); nas lesões de terceiro grau, é realizado o desbridamento do tecido necrótico em várias etapas, feito o curativo com sulfadiazina de prata a 1%, até a preparação do leito da ferida para a enxertia (ALVES et.al, 2015). Já na rede privada, em nosso país, este cenário se diferencia e, dependendo do tipo de convênio ou das condições financeiras do paciente, são usados curativos bio sintéticos e peles artificiais, todos importados e de elevado custo (ALVES e cols, 2015).

Tecidos biológicos de origem animal tais como, pele de porco, pericárdio bovino e pele de rã são comumente utilizados como curativos biológicos nas lesões por queimadura. A pele da tilápia do Nilo, por sua vez, vem surgindo como um possível subproduto, com aplicabilidade clínica de novos biomateriais utilizáveis para a bioengenharia (LIMA VERDE e cols, 2021).

Tendo em vista, que estudos histológicos da pele da tilápia demonstraram uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno, ela tem sido um método de tratamento eficaz para queimados (LIMA VERDE e cols, 2021).

Em trabalhos recentes (MIRANDA; BRANDT, 2019) foi observado que a utilização da pele de tilápia para o tratamento de queimadura vem sendo utilizada com protocolo de descontaminação rudimentar, pensando em quais reações imunológicas o paciente poderá apresentar com a aplicação direta do material sem uma etapa prévia de descelularização, o presente trabalho explora as propriedades da pele de tilápia descelularizada como potencial método de aplicação na regeneração de pele humana acometida por queimadura.

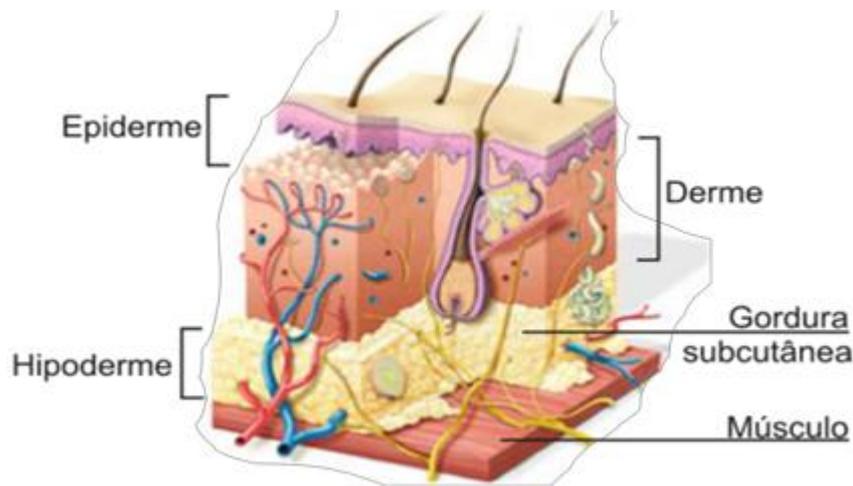
2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 PELE

A pele é um órgão complexo composto por diversos tecidos, tipos celulares e estruturas especializadas. Constitui o corpo humano pelo meio externo, exercendo funções cruciais para a vida, como termorregulação, vigilância imunológica, sensibilidade e proteção do indivíduo contra agressões externas, de natureza química, física ou biológica, e contra a perda de água e de proteínas para o exterior.

É considerado o maior órgão do corpo humano e representa 15% do peso corpóreo, com variações estruturais ao longo de sua extensão. É composta por três camadas interligadas: a epiderme, mais externa; a derme, intermediária; e a hipoderme (BLANK.I.H, 1952).

Figura 1 – Epiderme.



Fonte: SCP Cestari (2018).

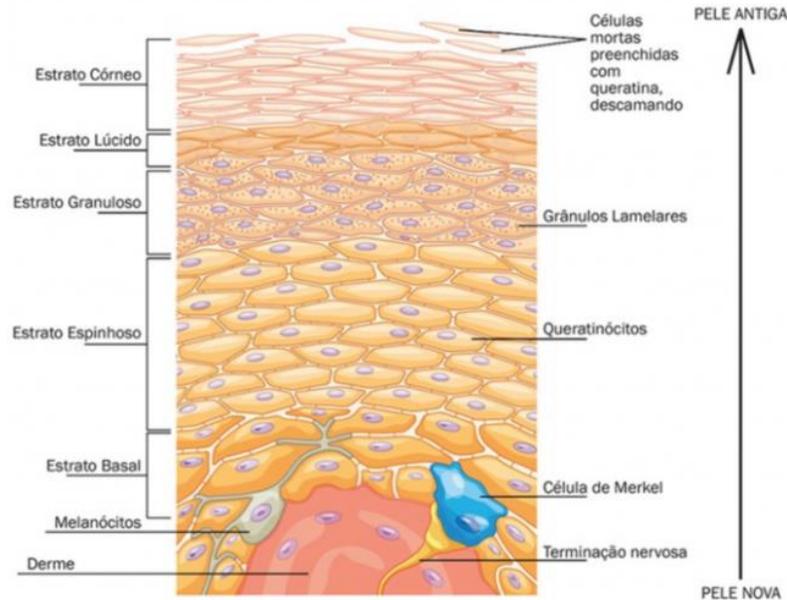
A epiderme é a camada superficial, formada por tecido epitelial pluriestratificado pavimentoso, avascular e apresenta células com funções variadas como os melanócitos, que são células responsáveis pela produção de melanina, o pigmento da pele. A camada celular mais profunda desse epitélio é denominada germinativa, cujas células passam por contínuas divisões mitóticas, produzindo novas células para substituição das superficiais, que morrem constantemente (TORTORA, 2002).

Peixes e anfíbios aquáticos apresentam glândulas mucosas na epiderme. Nos invertebrados, a epiderme é uniestratificada, possui uma única camada de células, ao contrário dos vertebrados, que, especialmente os terrestres, possuem as células mais superficiais mortas, devido à total impregnação da proteína queratina, substância impermeável que confere proteção ao animal, principalmente contra desidratação (TORTORA, 2002).

De forma mais aprofundada, a epiderme possui 5 camadas, sendo elas a camada basal com a presença de células cubóides que são responsáveis pela renovação do tecido. A segunda camada é a espinhosa com células ligeiramente achatadas que se expandem através dos desmossomos, especialização da membrana celular que permite a junção das células. Em continuidade, a camada granulosa apresenta células poligonais com núcleo central que secretam corpos lamelares, substância fosfolipídica associada a glicosaminoglicanos (GAGs), que conferem a impermeabilidade do tecido. A próxima é a camada lúcida com células achatadas que apresentam no seu interior filamentos de queratina. Por fim, a camada córnea, superficial com células achatadas, mortas, sem núcleo e sem organelas. A membrana celular é

bem espessa e o citoplasma cheio de queratina, células essas que são removidas no processo de descamação natural da pele (GARTNER; HIATT, 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 2 - Camadas da epiderme



Fonte: Histologia Interativa UNIFAL-MG, 2022. Disponível < <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/pele-e-anexos/>>. Acesso em: 14/09/2022.

A derme é a camada situada logo abaixo da epiderme, formada por denso tecido fibroelástico de tecido conectivo em meio a uma substância fundamental, que serve de suporte para extensas redes vasculares e nervosas, e anexos cutâneos que derivam da epiderme (GARTNER; HIATT, 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

Os principais componentes da derme incluem o colágeno (70 a 80%) para resistência, a elastina (1 a 3%) para elasticidade e os proteoglicanos, que constituem a substância amorfa, tecido sem orientação definida, em torno das fibras colágenas e elásticas (GARTNER; HIATT, 2007; SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

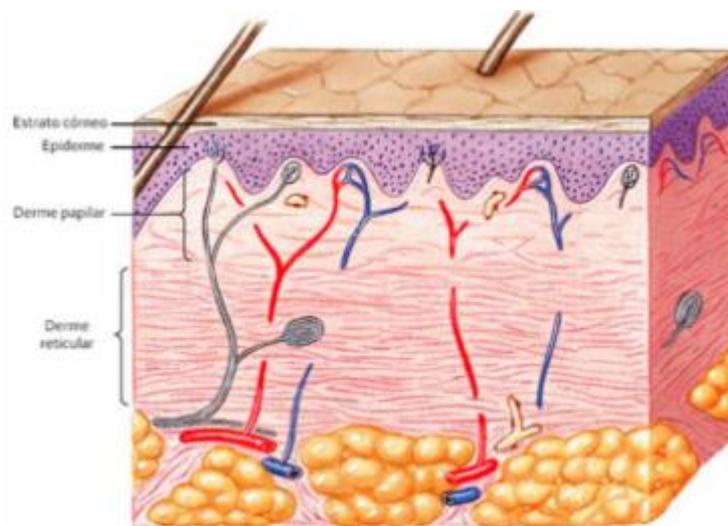
A derme contém população mista de células, incluindo fibroblastos, fibrócitos, macrófagos teciduais, melanóforos, mastócitos e leucócitos sanguíneos (como neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos).

A derme divide-se em papilar, camada mais externa, e reticular, camada mais interna. A derme papilar é mais delgada, altamente vascularizada, constituída de tecido conjuntivo frouxo e é formada por feixes delicados de fibras colágenas (principalmente do tipo III) e

elásticas. A derme reticular compõe a maior parte da espessura da derme é constituída de fibras colágenas (principalmente do tipo I) entrelaçadas, além de fibras elásticas que estão dispostas paralelamente à superfície da pele. (PARKER, 2003; RIVITTI, 2007).

O sistema elástico, que permeia as fibras colágenas das dermes papilar e reticular, é responsável pela elasticidade cutânea, ou seja, capacidade da pele de retornar à posição original quando submetida ao estiramento (PARKER, 2003; RIVITTI, 2007).

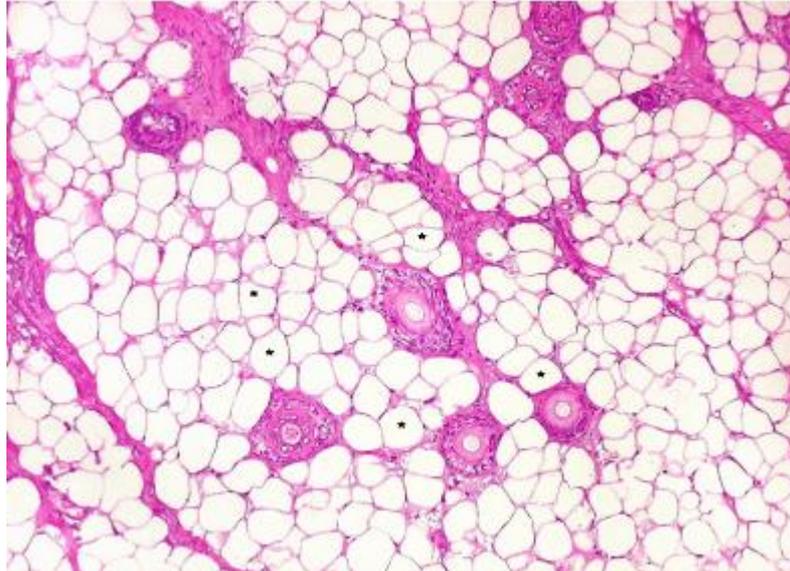
Figura 3 - Derme



Fonte: Histologia Interativa UNIFAL-MG, 2022. Disponível < <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/pele-e-anexos/>>. Acesso em:14/09/2022.

Por fim, a hipoderme considerada um órgão endócrino, camada responsável pelo deslizamento da pele sobre estruturas na qual se apoia, é constituída por adipócitos e possui funções como armazenamento de reserva energética, proteção contra choques, formação de uma manta térmica e de modelar o corpo (RIVITTI, 2007).

Figura 4 – Corte histológico da hipoderme



Fonte: Histologia Interativa UNIFAL-MG, 2022. Disponível < <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/pele-e-anexos/>>. Acesso em: 14/09/2022.

2.1.1 Pele Humana:

A pele humana é um órgão importante no quesito sobrevivência humana pensado, em um adulto, aproximadamente 4 kg , recebe aproximadamente 1/3 da circulação sanguínea do corpo, possui a espessura de apenas alguns milímetros sendo $2,97 \pm 0,28$ mm, a pele separa a rede de circulação sanguínea e os demais órgãos do corpo do ambiente externo, ajudando a manter a temperatura corporal, e outras funções variadas, tais como a foto proteção, e barreira física contra choques mecânicos. Além disso, a pele humana é uma grande protagonista da resposta imune, auxiliando na imunidade inata e adaptativa, por intermédio das células dendríticas e macrófagos residentes que têm como função a apresentação de antígenos e fagocitar patógenos (GRATIERI e cols, 2008).

A pele humana apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, conhecida como epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo em continuidade com a derme está a hipoderme, que apenas serve de suporte e união com os órgãos subjacentes (GRATIERI e cols, 2008).

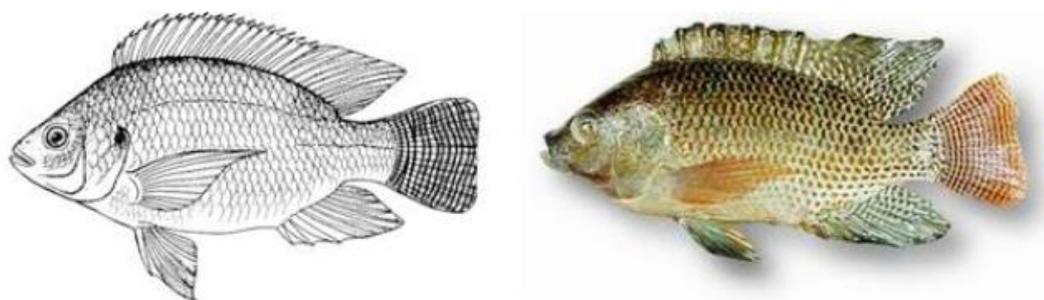
Existem mecanismos que permitem que este tecido regule o próprio crescimento e diferenciação através da interação com as citocinas liberadas por linfócitos T CD4, que dependendo do perfil inflamatório ou anti-inflamatório, orientam as modificações na espessura da pele. A desregulação nos mecanismos de tolerância imune em relação às estruturas da pele promove uma resposta de defesa destrutiva do próprio tecido. Isto ocorre principalmente em patologias como a dermatite atópica e a psoríase (ARMSTRONG ; READ, 2020; HÄNEL e cols, 2013; SHWAYDER; AKLAND, 2005).

Feridas causadas por quedas, queimaduras, radiação e procedimentos cirúrgicos, causam rupturas na continuidade do tecido e o avanço da idade, são fatores que prejudicam a manutenção das características funcionais da pele. (BOATENG, 2008).

2.1.2 Pele de tilápia:

Originária da África Oriental da bacia do Nilo, a Tilápia do Nilo conhecida cientificamente *Oreochromis* sp, pertence à família Cichlidae, de origem africana e sua distribuição geográfica se dá em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2010 (FAO), o peixe, por ter características favoráveis ao cultivo, foi introduzido em outras áreas do planeta na década de 1960, e no Brasil em 1971 (LIMA-JÚNIOR et. al, 2017). No Brasil, essa espécie é mais abundante no Estado do Ceará (nordeste brasileiro), cultivado em pisciculturas presentes no rio Castanhão (ALVES, 2018).

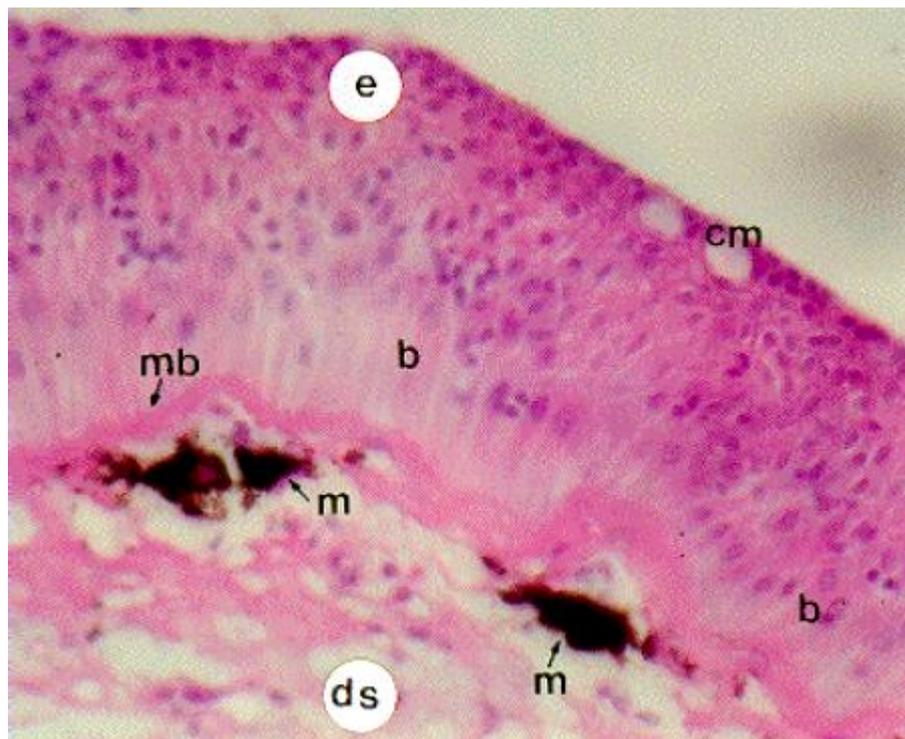
Figura 5 - *Oreochromis* sp.



Fonte: Fao, 2010.

Segundo Rodrigues de Souza e cols (1997), histologicamente, a pele da tilápia do Nilo demonstrou ser constituída por duas camadas teciduais, a epiderme e a derme. De acordo com Lagler e cols (1978) epiderme da pele de tilápia é constituída por células epiteliais pavimentosas estratificada pouco espessa, dispostas em camadas que contêm células produtoras de muco e de pigmentos e a derme é formada por uma espessa camada de tecido conjuntivo. Na tilápia, separando-se a epiderme da derme, existe uma membrana basal bem distinta e espessa que pode variar entre as espécies de peixes de acordo com Dourado e cols (1996).

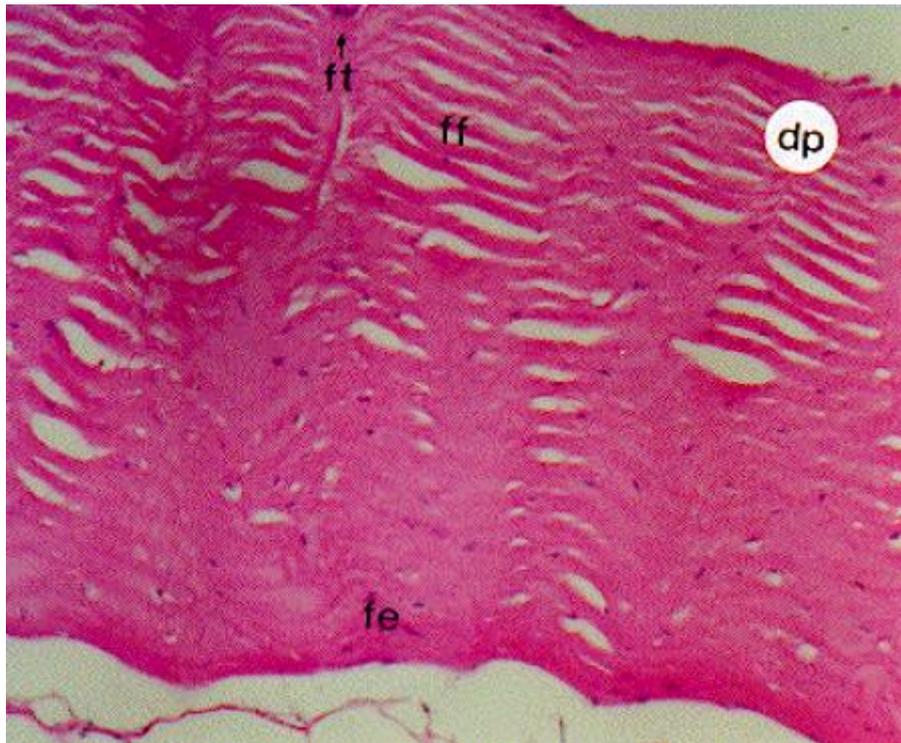
Figura 6 – Corte histológico de *Oreochromis* sp. Mostrando a epiderme (e) com células mucosas (cm) e células basais (b); membrana basal (mb); derme superficial (ds) com melanócitos (m). Coloração HE. Objetiva 40 x.



Fonte: Rodrigues de Souza e cols ,1997.

A derme superficial é formada por um tecido conjuntivo e a derme profunda, um tecido conjuntivo denso, espesso e rico em fibras colágenas. Além disso, a pele da tilápia apresenta uma característica própria: na derme, as camadas de fibras colágenas se sobrepõem, ocorrendo uma “amarração” entre elas, formando feixes de fibras muito longos e bem orientados conferindo uma elevada resistência ao tecido.

Figura 7 – Corte histológico de *Oreochromis* sp. Mostrando a derme profunda (dp), apresentando as fibras colágenas transversais (ft), fibras colágenas finas e separadas (ff) e fibras colágenas espessas e juntas (fe). Coloração HE. Objetiva 20x.



Fonte: Rodrigues de Souza e cols ,1997.

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a produção de tilápia representa 45,4% da produção total de peixes no Brasil, o que equivale a 68 mil toneladas. A produção cresceu 223% entre 2005 e 2015, evidenciando a fartura da matéria prima (de OLIVEIRA e cols, 2007).

A pele desse animal foi escolhida para a condução do estudo de novos cicatrizantes para queimaduras, porque tem uma resistência característica e ser riquíssima em colágeno (LIMA-JÚNIOR e cols, 2017), além do fácil acesso a esta matéria-prima que se dá, como citado acima, devido a sua produção que é farta por todo território brasileiro. É considerado também, um subproduto de descarte e cerca de 1% é empregado em artesanato (LIMA-JÚNIOR e cols, 2017). A sua resistência e sensibilidade para a confecção de acessórios

despertou nos pesquisadores a possibilidade de sua utilização como substituta da pele humana no tratamento de pacientes queimados (FRANCO e cols, 2013).

Ademais, estudos com a pele do animal afirmaram que a pele da tilápia é promissora como material curativo biológico, visto que possui disponibilidade relativamente alta, boa qualidade, baixo custo e apresentava muitas semelhanças com a pele humana, bastante maleável e resistente à tração (ALVES e cols, 2015). Além disso, a imunogenicidade do colágeno é extremamente baixa. Por essa razão a pele da tilápia é considerada uma boa alternativa para a substituição da produção de colágeno, normalmente realizada a partir de subprodutos de origem bovina ou suína (DUAN e cols., 2009).

2.2 MATRIZ EXTRACELULAR

A MEC é composta por componentes não celulares que se organizam em uma rede altamente organizada e presente em todos os órgãos e tecidos. Sua função vai desde ser um suporte físico à uma estrutura dinâmica que fornece sinais a células adjacentes determinando suas funções, abrangendo a diferenciação, migração e proliferação celular. (THEOCHARIS e cols, 2016). A MEC é considerada uma estrutura não estática que é constantemente remodelada devido ao fato de que as interações que as proteínas presentes nela, com os receptores de superfície celular e iniciam vias de transdução de sinais (LATIF e cols, 2005).

Sua composição é basicamente água, proteínas e polissacarídeos, porém a proporção e distribuição de tais elementos pode variar muito entre um tecido e outro e até mesmo dentro de um mesmo tecido, sendo dessa maneira uma estrutura altamente heterogênea. É justamente essa heterogeneidade de moléculas a responsável pelas propriedades físicas e bioquímicas de um órgão, de forma que a matriz cria especificidades de resistência, elasticidade e tração de um tecido (FRANTZ e cols, 2010).

2.2.1 Colágeno

O colágeno é considerado uma proteína de valor alto uma vez que possui função estrutural e sua abundância no tecido animal (representa cerca de 20-30% do total de proteínas corporais) (SAMPAIO; RIVITTI, 2007; SHANMUGAM; SHANMUGAM, 2017; ZEUGOLIS; RAGHUNATH, 2011). Dentre os tecidos animais utilizados, se destaca a pele do peixe devido a sua alta disponibilidade, alto rendimento e baixo risco de transmissão de doenças (SHANMUGAM; SHANMUGAM, 2017)

O colágeno é formado pela polimerização de tropocolágeno (unidades moleculares alongadas) consistindo em 3 subunidades dispostas em tríplice hélice (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Essa estrutura permite a rigidez, elasticidade e força de tensões variáveis. Todos os aminoácidos dessa proteína possuem uma sequência repetitiva denominada a [Gly-X-Y] n, sendo o X comumente ocupado pela prolina (Pro) e o Y ocupado pela hidroxiprolina (Hyp) (ZEUGOLIS; RAGHNATH, 2011)

O colágeno do tipo I é o biopolímero mais abundante no corpo de mamíferos e por isso, é vastamente utilizado na área da engenharia de tecidos. É encontrado em pele, ossos, tendões, ligamentos, fâscias, dente e córnea em forma de fibrilas, fibras e feixes. Já o colágeno do tipo III é encontrado em tecido fetais, estroma de órgãos e glândulas, órgãos linfóides e hematopoiéticos em forma de fibras reticulares. (SAMPAIO; RIVITTI, 2007; GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; CHUNG; UITTO, 2010).

Biopolímeros produzidos a partir do colágeno vem sendo utilizado na produção de materiais com aplicações biomédicas com células através de domínios específicos de reconhecimento (PIRES, BIERHALZ; MORAES, 2015). É o principal componente da matriz extracelular, orientando e estimulando a formação tecidual. Ainda, somam-se a abundância, biocompatibilidade, estabilidade, alta porosidade, facilidade de combinação com outros materiais, processamento fácil, baixa antigenicidade e capacidade de absorção no corpo, tornando essa proteína preferida para a produção de biomateriais de diferentes formas e aplicações (PATI, D. A, 2010).

Colágenos isolados ou associados a outros compostos podem constituir matéria-prima para a produção de suturas, agentes hemostáticos, substituição e/ou regeneração tecidual de vasos, ossos, cartilagens, pele, sangue, traqueia e esôfago. Cirurgia plástica de lábios e pele, além de oxigenador de membrana, contraceptivos, matrizes biodegradáveis, implantes, bandagem da córnea e lentes de contato (FERREIRA, G. C, 2012).

2.3 ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos é a área da biotecnologia que busca desenvolver/manipular moléculas, células, tecidos, ou órgãos para a produção de tecidos em laboratório (DALEY e cols, 2008). Um dos pontos principais que deve ser ressaltado inclui o tipo de célula e de substrato que será usado para “criar o tecido artificial”. Muitas estratégias utilizam arcabouços biológicos com a MEC preservada, a fim de facilitar a organização e diferenciação das células

ali cultivadas para finalmente formar tecidos tridimensionais funcionais (DALEY e cols, 2008).

O requisito primordial para um material ser utilizado para fins de engenharia de tecidos é a biocompatibilidade e a biofuncionalidade do material (KANANI e cols, 2010).

Pode-se definir biofuncionalidade como a capacidade de um dispositivo funcionar com resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica. Esta definição relaciona a biofuncionalidade a um conjunto de propriedades que dá a determinado dispositivo a capacidade de realizar uma função semelhante à daquela do material que está sendo substituído (BOSCHI, 1996). Já a biocompatibilidade, desempenha um papel de extrema importância, uma vez que é o que garante que os materiais são seguros para uso dentro do corpo humano e nos fluidos endógenos (VANDEVORD e cols, 2002).

Lesões neste órgão, tais como queimaduras são extremamente recorrentes, segundo Miranda et. Al (2018), cerca de 1 milhão de pessoas no Brasil sofrem queimaduras a cada ano. E, segundo estudos, o curativo ideal para essas lesões é aquele que é de fácil obtenção, boa flexibilidade e aderência, resistência ao estiramento, fácil manipulação, capacidade de suprimir a dor, baixo custo, seja de armazenamento simples e, que previna as perdas hidroeletrolíticas, a contaminação bacteriana, favoreça a epitelização das queimaduras e propicie formação do adequado tecido de granulação, para os casos de enxertia.

Pensando nisso, vários materiais foram sugeridos como coberturas biológicas para a ferida de queimadura, tais como porco pericárdio e pele, peritoneal bovino e amniótico membrana e outros (ALVES e cols, 2015). Entretanto, recentemente, a pele de tilápia também foi sugerida como um possível material biológico, uma vez que ela possui uma semelhança histológica, colágena e mecânica com a pele humana e outros materiais biológicos (FRANCO e cols, 2013).

Para ser utilizado na área biomédica, nas cirurgias reconstrutivas o material deve ser biocompatível, definido como material que não produza reação adversa e deve ter a habilidade de desencadear em um organismo resposta apropriada para uma aplicação específica (VANDEVORD e cols, 2002).

Para garantir a biocompatibilidade do material e produzir menor efeito adverso ao tecido biológico são utilizadas técnicas como a descellularização, que consiste em procedimentos físicos-químicos e enzimáticos que tentam remover completamente os componentes celulares do material (RIBEIRO e cols, 2009) no almejo de desenvolver biomateriais com menor antigenicidade.

2.3.1 Descelularização

A descelularização é considerada importante devido à potencial resposta imune adversa provocada por epítomos da membrana celular, DNA alogênico ou xenogênico e moléculas associadas a padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (GILBERT e cols, 2009). No entanto, critérios quantitativos da descelularização não haviam sido descritos até que, em 2011, Crapo e cols sugeriram que para um tecido ser considerado descelularizado ele deveria seguir os seguintes pontos: possuir quantidade de DNA de dupla fita menor que 50 ng por mg de peso seco de tecido; ter fragmentos de DNA menores que 200 pares de bases; e ausência de material nuclear visível nas colorações de DAPI ou H&E.

A descelularização é uma técnica da engenharia de tecidos que consiste na remoção do material celular e nuclear, preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da MEC remanescente (GILBERT e cols, 2006; CRAPO e cols, 2011).

O uso da MEC derivada de tecidos descelularizados é cada vez mais frequente nas estratégias da medicina regenerativa e engenharia de tecidos. Segundo estudos de CRAPO e cols, 2011, foi demonstrado que a MEC possui influência na mitogênese e quimiotaxia celular, diferenciação e respostas de remodelamento tecidual. Porém, evidências indicam que o material celular residual tem uma influência negativa sobre a vantagem criada pelos *scaffolds* no processo de remodelação no *in vivo*. Portanto, os métodos de processamento do tecido, incluindo a descelularização, são determinantes críticos para o sucesso do experimento (CRAPO e cols, 2011).

Entre os métodos mais comumente utilizados estão os detergentes iônicos, que são detergentes bastante fortes e capazes de romper a membrana celular completamente. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Triton X-100 estão entre os mais usados nos protocolos de descelularização, visto que dissolvem eficientemente as membranas e lipídios da célula (KEANE e cols, 2015).

2.3.2 Detergentes

Os detergentes são classificados em detergentes iônicos, não iônicos, zwitterionic e sais ácidos. Os detergentes iônicos, podem ser carregados negativamente (aniônicos) e positivamente (catiônicos). Por exemplo, o SDS, que contém a carga negativa grupo sulfato, é um detergente aniônico enquanto Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), é um detergente catiônico. Além disso, os detergentes iônicos ou contêm uma cadeia de hidrocarbonetos, como em SDS e CTAB, ou uma estrutura esteroideal rígida mais complicada como no deoxicolato de sódio (BAIRI, 1997; ZHANG e cols, 2021).

Os detergentes não iônicos contêm grupos de cabeças hidrofílicas não carregadas, e em geral, os detergentes não iônicos tais como Triton X-100 e Polioxetileno dodecil éter, são mais adequados para quebrar interações lipídio-lipídeos e lipoproteínas do que as interações proteína-proteína. Assim, são considerados não desnaturantes e são amplamente utilizados no isolamento de membranas proteínas na sua forma biologicamente ativa (ZHANG e cols, 2021).

Os detergentes Zwitterionic como por exemplo o 3-propano sulfonato e o N-óxido de dimetil-dodecilamina, são únicos na medida em que oferecem as propriedades combinadas de detergentes iônicos e não iônicos. E, por isso, são mais eficientes em quebrar as interações proteína-proteína. (BAIRI, 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi elaborar o protocolo de descelularização da pele de tilápia (*Oreochromis sp*) para a possível aplicação na medicina regenerativa e para o tratamento de queimaduras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

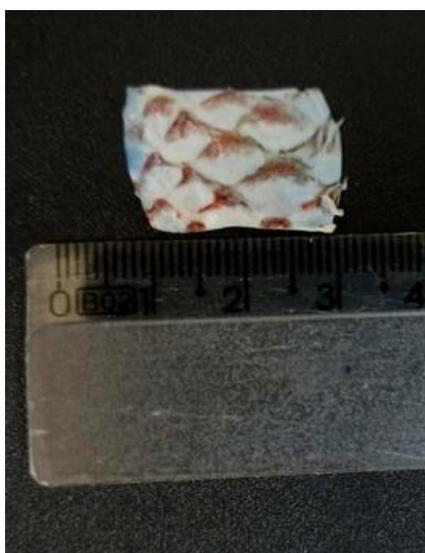
- a) Desenvolver protocolo de descelularização;
- b) Avaliar a eficiência do protocolo;
- c) Avaliar através de dosagens bioquímicas a MEC da pele de tilápia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL

Para o seguinte estudo, a pele de tilápia utilizada (Figura 4) foi obtida no restaurante Pesqueiro Pantanal, Bicas/ MG como produto de descarte. E a mesma pele foi cortada em 2 x 2 cm.

Figura - 8 Pele *in natura* de tilápia (*Oreochromis* sp).



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

3.2 PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO

As amostras foram separadas em 3 garrafas T25 de cultivo de células que foram descartadas posteriormente, contendo aproximadamente 2g de cada tecido. Duas delas foram destinadas aos protocolos 1 e 2 e a terceira para o. Foi estabelecido uma proporção de 25 mL de solução para cada 1g de tecido.

Os fragmentos de pele foram colocados em solução em EDTA 0,1% (p/v) e Tris-HCl 10mM sendo agitado no *shaker*. Logo após foi preparado uma solução contendo SDS 1% (p/v) e Tris- HCl 10mM que foi colocada na garrafa após o descarte da solução anterior, o

EDTA, e deixada *overnight* no *shaker* na rotação mais baixa do aparelho. No dia 2, a pele foi lavada com PBS 1X em 3 repetições de 10 min no *shaker* e logo após, foi adicionada ao PBS 1X com antibiótico (estreptomicina) 2% (v/v) e deixada *overnight* no *shaker*. No dia 3 o material foi seco em papel toalha, pesado e congelado a 4°C.

O protocolo 2, consistia em deixar o conteúdo da garrafa 2 por 2 horas em solução de EDTA 0,1% (p/v) e Tris-HCl 10mM sob agitação no *shaker*. Os fragmentos de pele foram adicionados ao SDS 1% (p/v) e Tris- HCl 10mM que, em seguida, foram colocados na garrafa e deixada *overnight* no *shaker* durante esse tempo. No dia 2, a pele foi lavada com PBS 1X em 3 repetições de 10 min no *shaker* e logo após, foi adicionada à uma solução de Triton X-100 (v/v) *overnight* e *shaker*. No dia 3, foi lavada com PBS 1X em 3 repetições de 10 min no *shaker* e logo após, foi adicionada ao PBS 1X com antibiótico 2% (v/v) e deixada *overnight* no *shaker*. No dia 4 o material foi seco em papel toalha, pesado e congelado a 4°C (Figura 4).

Figura 9- Pele de tilápia descelularizada



Fonte: Elaborada pela autora (2022)

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para conferir se o material foi descelularizado é necessário fazer a extração do Ácido desoxirribonucleico (DNA) para verificar a eficiência da descelularização e verificar se há DNA remanescente após a tentativa de remoção das células, para isso o material congelado foi liofilizado por 24 horas, ou seja, toda água do material foi retirada, pesada novamente e triturada no miniprocessador. O material foi pesado e foi constatado os seguintes pesos (Quadro 1):

Quadro 1 - Massa dos fragmentos de pele de tilápia durante os protocolos de descclularização.

DESCELULARIZAÇÃO		Massa inicial (g)	Massa descclularizado (g) *	Massa liofilizado (g)
Controle	n1**	3,0566	NA***	0,9226
	n2	2,021	NA	0,5594
	n3	2,01	NA	0,6772
Protocolo 1	n1	2	4,6747	0,6541
	n2	2,06	2,72	0,4749
	n3	2,01	2,259	0,603
Protocolo 2	n1	2	3,932	0,5738
	n2	2,1	2,41	0,5
	n3	2,08	2,657	0,6335

* massa descclularizada é a massa do material logo após submetido aos protocolos.

** n é o número da repetição

*** NA não existe a massa descclularizada do controle porque ele foi apenas pesado e congelado e retirado apenas no momento da liofilização.

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Para a extração do DNA, em aproximadamente 50,0 mg (peso seco) de cada grupo experimental (n=3) foram adicionados 700,0 µL de solução de lise [Tris-HCl 10mM (p/v), EDTA 0,1M (p/v) e SDS 0,1% (p/v), pH 8,0] e três *beads* de cerâmica em cada *eppendorf*. As amostras foram submetidas à maceração em Tissue Lyser II (Qiagen) com 4 ciclos de frequência 30/s cada. Em seguida, foram adicionados 20 µL de proteinase K (10,0 mg/mL; Thermo Fisher Scientific) e as amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C *overnight*. Para a remoção das proteínas, foi adicionado 1,0 volume de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Alphatec) (25:24:1) (m/m/m), seguido de centrifugação (Thermo Scientific Megafuge 16R, EUA) a 12.000 x G por dez minutos. Na fase aquosa foi adicionado 0,5 volume de acetato de amônio (Vetec) 7,5M (p/v) e 2,0 volumes de etanol absoluto (Nox Lab solutions) gelado e incubado a -20°C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x G por 15 minutos. Em seguida, o *pellet* de DNA foi

lavado com 700 μL de etanol 70% (v/v) gelado e centrifugado a 1700 x G por 2 minutos (essa etapa foi feita duas vezes). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi seco à temperatura ambiente por no máximo 10 minutos. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 100 μL de tampão TE (Tris HCL 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0).

A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Sigma) 1% (p/v) em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x utilizando o marcador de massa lambda (100 pb; Invitrogen). A eletroforese foi realizada em corrente constante de 80 mA por aproximadamente 50 minutos. A quantidade do DNA foi avaliada por espectrofotometria com o uso do NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) no comprimento de onda de 260/280nm.

3.4 ANÁLISE DE COLÁGENO

A quantidade de colágeno presente em cada grupo experimental (n=3) foi determinada por análise de hidroxiprolina segundo Osago e cols. (2018) modificado, onde 10 mg de amostra (peso seco) foi hidrolisado em 1 mL de HCl 9N (v/v) a 100°C por 15 horas para liberação de hidroxiprolina. Posteriormente, em 10 μL de amostra hidrolisada foram adicionados 200 μL de solução de cloroamina T [cloroamina T (Neon) 1,4% (p/v), isopropanol 10% (v/v) e acetato de sódio (Proquímio) 0,5M (p/v)] e deixados à temperatura ambiente por 25 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 μL de reagente de Ehrlich [p-DAB 1M (p/v) em isopropanol 70% (v/v) e ácido perclórico (Merck) 20% (v/v)] e incubado a 65°C por 20 minutos. A absorbância foi lida no espectrofotômetro a 550 nm e o conteúdo de colágeno foi calculado sabendo que hidroxiprolina corresponde a 14,3% (VISWANATH et al., 2016). Uma curva padrão foi construída usando concentrações conhecidas de hidroxiprolina (Sigma) de 0 – 10 $\mu\text{g/mL}$.

3.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As peles de tilápia foram congeladas em freezer a -20°C e seccionadas a 4 μm usando criostato (Lupetec, Brasil), em meio Tissue Tek freezing (Leica). Em seguida, o tecido foi marcado com DAPI (Thermo Fisher Scientific), intercalante de DNA, e visualizado em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51). As imagens foram adquiridas com o programa Olympus CellSens 2011.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados de DNA dos grupos experimentais foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as comparações entre os grupos experimentais foram feitas utilizando o teste de Tukey post hoc. Os dados de colágeno dos grupos experimentais foram analisados por Teste t-Student não-pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad software, Inc).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Com o objetivo de avaliar e confirmar este processo de descclularização na pele de tilápia, a quantidade remanescente de DNA nas amostras foi mensurada, e tal etapa, é de extrema importância, pois como já demonstrado por Zheng e cols (2005), a permanência de núcleos ou fragmentos de DNA no tecido descclularizado é um dos fatores que pode gerar reações pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. Reações inflamatórias estas que podem ser causadas pela forte tendência do DNA em se manter aderido à MEC (GILBERT e cols, 2006; ZHENG e cols, 2005). Sendo assim, a certificação da descclularização tecidual busca evitar reações imunogênicas nos pacientes com tais tecidos implantados e também no cultivo com outras linhagens celulares. (REF)

Um tecido é considerado descclularizado, segundo Crapo e cols (2011), quando apresentar menos de 50 ng de DNA por mg de tecido seco, fragmentos de DNA menores de 200 pb visualizados em gel de agarose e ausência de núcleo em cortes histológicos com coloração H&E ou DAPI. Sendo assim, foi possível observar pela quantificação do DNA (Figura 5), eletroforese (Figura 6) e coloração (Figura 7) que o processo de descclularização promoveu redução significativa na quantidade de DNA das amostras, se comparadas ao tecido nativo (Quadro 2). O conteúdo de DNA mensurado nas amostras de tecido descclularizado e tecido nativo estão apresentados no QUADRO 2.

Quadro 2 - Quantificação do conteúdo de DNA

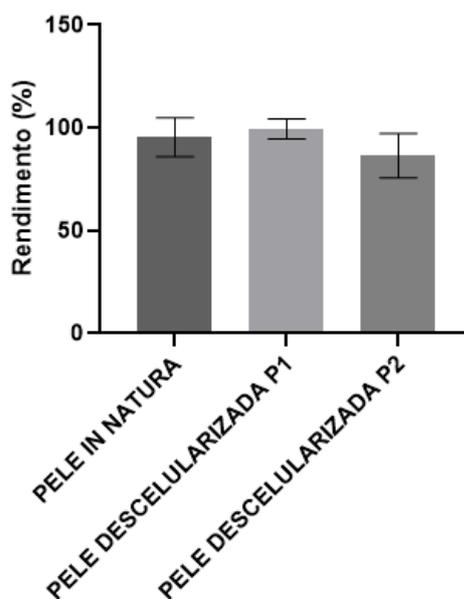
Amostra	Repetição	Massa descclularizado (g) *	DNA Nanodrop (ng/μL)	DNA (ng/mg tecido)
Controle	n1 **	NA***	1066,6	643,88
	n2	NA	609,9	337,63
	n3	NA	662,7	446,54
Protocolo 1	n1	4,6747	56,5	36,95
	n2	2,72	51,9	34,00

	n3	2,259	10,6	6,36
Protocolo 2	n1	3,932	87,8	50,37
	n2	2,41	71,3	33,95
	n3	2,657	181,4	110,49

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Foi observado a diminuição de DNA (Figura 11) no tecido descelularizado, entretanto, observou-se que as amostras que foram tratadas pelo protocolo 1 apresentaram uma maior descelularização em vista das que foram submetidas ao protocolo 2, sendo as médias de redução: protocolo 1: 95,1% e protocolo 2: 84,29%. Além disso, foi observado que o material apresenta um bom rendimento e não houve perda da amostra durante o processo de descelularização.

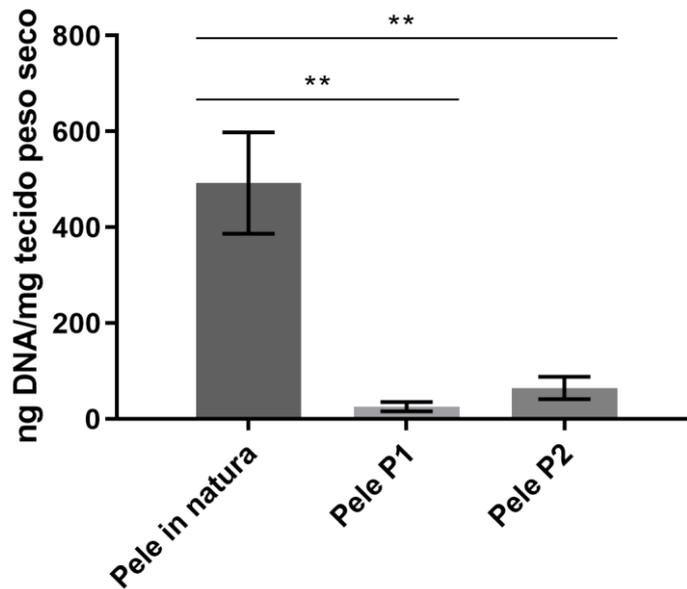
Figura 10 – Rendimento. Dados expressos como média \pm EPM. n=3.



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Segundo Baiari (1997) e Zhang e cols (2022), o SDS é um detergente que desempenha um papel crítico no processo de descélularização. Quanto mais alta concentração de SDS resulta em menor conteúdo de DNA, além disso a concentração de SDS leva a mais retenção de colágeno e menor desnaturação de proteínas da MEC (ZHANG e cols, 2022). No entanto, devido à interrupção de interações proteína-proteína, os detergentes iônicos têm um impacto nocivo sobre as estruturas da matriz extracelular e aos componentes bioativos. Além disso, SDS é difícil de remover devido às suas fortes interações com as proteínas da matriz, que podem conseqüentemente induzir a citotoxicidade à recelularização das células. Zhang e cols (2022), afirma que o Triton X-100 é um detergente não iônico que contém anéis aromático e por isso proporciona um tratamento mais suave para solubilizar as membranas celulares e dissociar o DNA das proteínas, quebrando as interações de lipídio-lipídio, proteína-lipídio, DNA-proteína, mas deixando as interações proteína-proteína conservadas (ZHANG e cols, 2022). Por causa da incapacidade de desnaturar proteínas, os detergentes não iônicos podem limpar o conteúdo celular sem danificar a estrutura e orientação do colágeno (ZHANG e cols, 2022). Entretanto, por serem detergentes não iônicos mais suaves, são insuficientes para remover nucleicos, DNA e a estrutura e orientação do colágeno (ZHANG e cols, 2022). Por conseguinte, estes detergentes necessitam sempre da assistência de outras soluções ou tratamentos físicos para assegurar a remoção completa dos componentes celulares. Se comparado a outros detergentes, o SDS detém o maior rendimento na remoção de restos nucleares e proteínas do citoesqueleto, como a vimentina. Porém, o detergente tende a danificar a estrutura nativa do tecido e causar uma diminuição na concentração de GAGs e perda de integridade do colágeno. No entanto, não parece que o SDS remova colágeno do tecido (GILBERT e cols, 2006). O Triton X-100 tem sido comumente usado em pesquisas, entretanto apesar de sua eficácia, no presente trabalho o SDS foi o mais eficaz na descélularização. E baseado em Baiari (1997) detergentes como Triton X-100 absorvem em a região ultravioleta. Podem interferir com a monitorização espectrofotométrica de proteínas a 280 nm. Baseado nessa informação, especulou-se nesse trabalho que o mesmo ocorreu de acordo com os dados apurados. Por essa razão, no presente trabalho não foi dada continuidade ao protocolo 2.

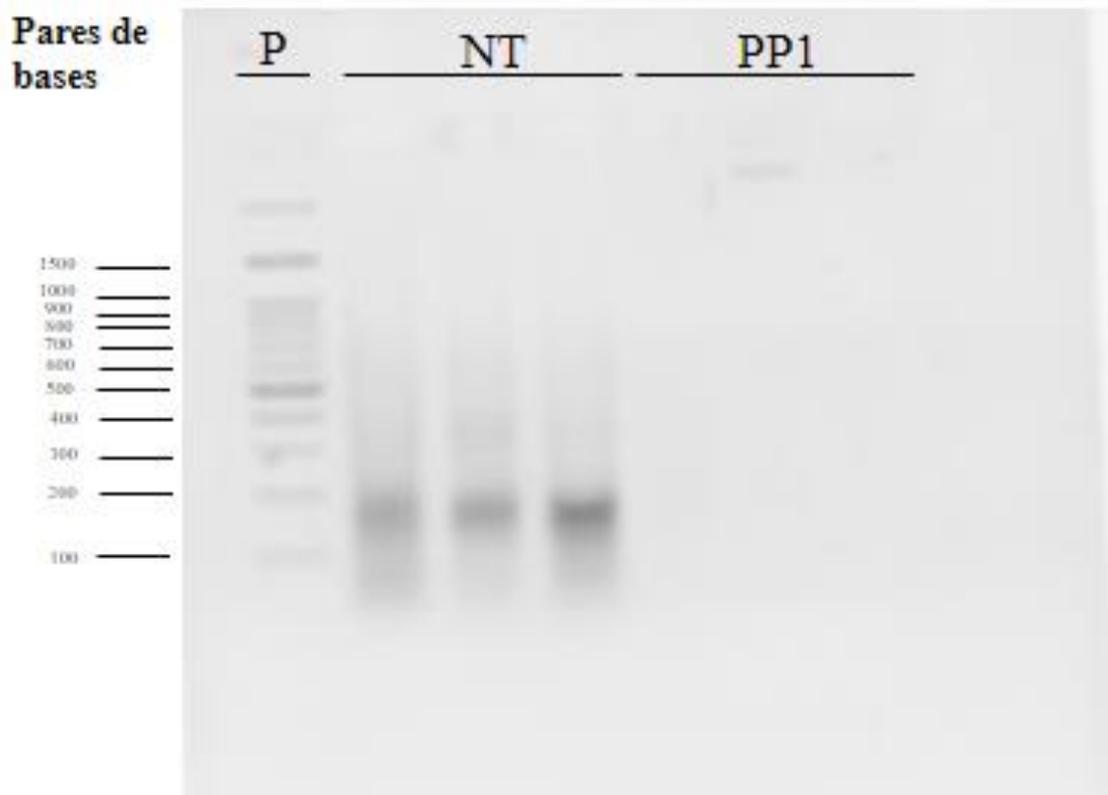
Figura 11 – Quantificação de DNA dos grupos experimentais. Dados expressos como média \pm EPM. n=3, **p < 0,05.



Fonte: Elaborada pela autora (2022)

A eletroforese em gel de agarose foi realizada para confirmar a presença e a qualidade de DNA nas amostras, como mostrado na Figura 6. Foi possível observar a ausência de bandas de DNA em todas as amostras de tecido descelularizado. Assim, podemos afirmar que o processo de descelularização utilizando solução de SDS 1% foi eficaz para a pele de tilápia.

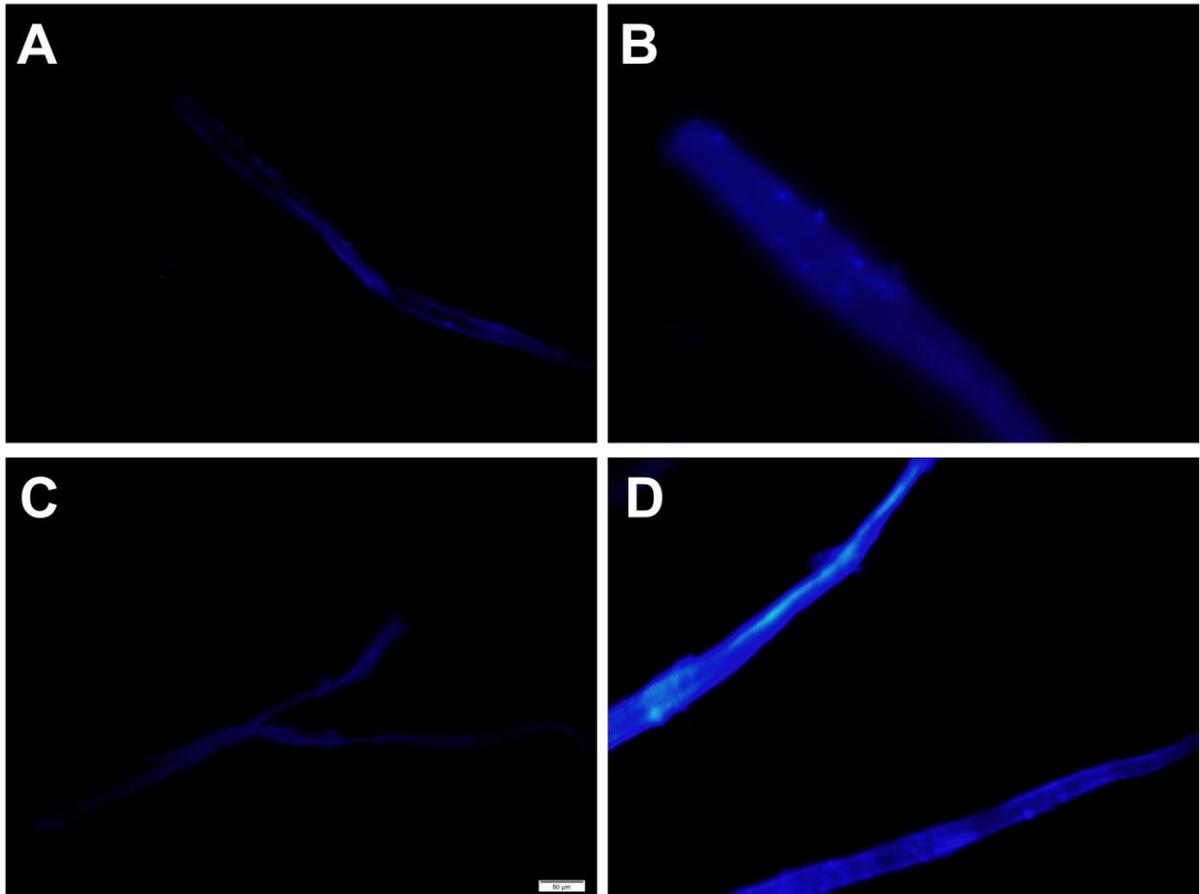
Figura 12 – Eletroforese de DNA. Eletroforese em gel de agarose 1% para DNA em tampão TBE 1x, extraídos das amostras de pele de tilápia descclularizadas em comparação ao tecido nativo. P: marcador de massa lambda; NT; grupo controle; PP1: grupo descclularizado do protocolo 1.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Os tecidos mostraram-se descclularizados na coloração de DAPI (Figura 7), em comparação ao tecido nativo, o qual exibiu marcação nuclear positiva em toda a sua extensão. A ausência de marcação dos núcleos celulares nas marcações histológicas é explicada pelo fato do corante DAPI se ligar apenas ao DNA íntegro, ou seja, de dupla-fita.

Figura 13- Microscopia de fluorescência dos grupos experimentais. Grupo *in natura*: A e B. Grupo descelularizado protocolo 1: C e D. Barra de escala 50 μm e 25 μm .



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A utilização das peles de tilápia para tratamento de queimadura é recente, por isso a descelularização é de grande importância. Keane e cols (2012) questionaram a ideia do potencial papel do DNA como gatilho da resposta imune através da avaliação das consequências de uma descelularização ineficiente na resposta imune do hospedeiro. Seus dados sugeriram que tanto a descelularização ideal proposta por Crapo e cols (2011) quanto outra de menor eficácia tiveram papéis similares no remodelamento imune *in vitro* e *in vivo*.

Os curativos biológicos devem prevenir as perdas hidroeletrólíticas, evitando a contaminação bacteriana e promovendo a epitelização nas queimaduras de segundo grau superficial e profundo e propiciando a formação de adequado tecido de granulação, para enxertia, nas lesões de terceiro grau (MIRANDA, 2018).

E, segundo Lima-Júnior e cols (2017), a pele da tilápia foi superior devido à sua capacidade de obstruir a ferida, minimizando o processo inflamatório prejudicial e a formação de crostas. Foi observado ainda reações inflamatórias de intensidade leve a moderada nas feridas recobertas pelas peles de tilápia, diferentemente da intensa resposta aguda observada nos grupos controle, interferindo positivamente no processo de cicatrização, confirmando o benefício de sua utilização a partir da descelularização.

4.2 ANÁLISE DO COLÁGENO

O colágeno, como componente primário da MEC, possui um papel importante na manutenção da sua integridade biológica e estrutural. Esta molécula tem uma estrutura tripla hélice (CEN e cols, 2008), com mais do que 29 tipos diferentes descritos na literatura. O colágeno tipo I (COL-I) é, em sua maioria normalmente encontrado em humanos no osso, pele, dentes, fibrocartilagem, e tendões e tem a capacidade única de formar fibrilas altamente resistentes (G'OMES-GUILL'EN e cols, 2011). A composição química e estrutura de este componente de MEC permite numerosas aplicações, especificamente na bioengenharia.

A COL-I tem sido utilizada em numerosas aplicações, tais como o fornecimento de medicamentos, substitutos de pele, sutura, e substratos de engenharia de tecidos (TANG; SAITO, 2015).

Espera-se que um bom arcabouço biológico mantenha a sua MEC descelularizada preservada, com conteúdo de fibras elásticas e colágenas comparável com o tecido nativo. Para avaliar tais parâmetros, a medição do COL-I foi realizada por meio de dosagem da hidroxiprolina e quantificação por espectrofotometria, após a descelularização.

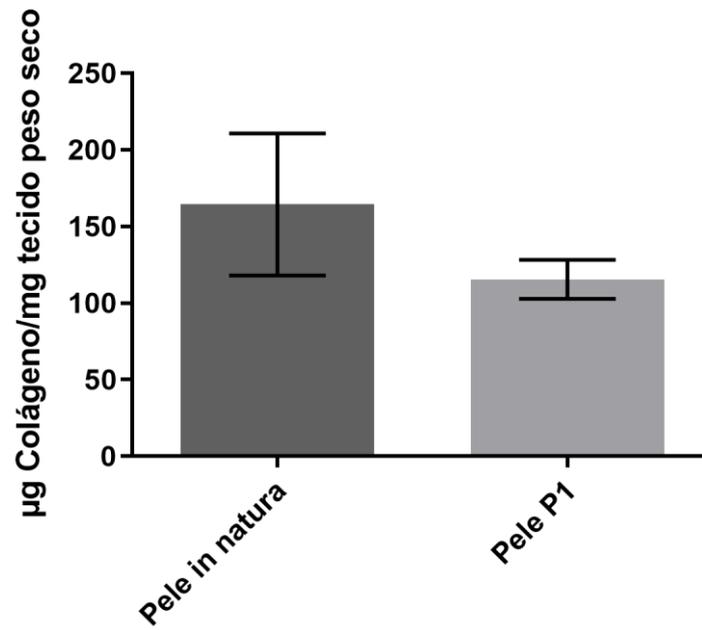
Após o tratamento foi observado que o conteúdo do COL-I foi preservado quando comparado ao tecido *in natura* (FIGURA 4.4).

Embora pareça lógico que a descelularização, por definição, afete a estrutura e composição da MEC, a intenção do processo é a preservação das propriedades mecânicas e biológicas da MEC o quanto for possível.

Figura 14- Quantificação de colágeno dos grupos experimentais. Dados expressos como

média \pm EPM.

n=3.



Fonte: Elaborada pela autora (2022)

5 CONCLUSÃO

Para pacientes com feridas crônicas extensas e pacientes queimados, seria ideal o uso dos aloenxertos, que são peles doadas de pacientes vivos ou já falecidos (ROWAN et al., 2015). Entretanto, a disponibilidade de pele humana é insuficiente para atender a demanda destes pacientes (ALVES et al., 2015; LIMA-JÚNIOR et al., 2017). Devido a isso, a melhor alternativa seria o desenvolvimento de novos tratamentos que substituam a necessidade do uso da pele humana, sendo mais econômicos e disponíveis (HERMANS et al., 2014).

A metodologia consiste em reagentes de fácil obtenção, simples de executar, exige menos tempo e é possível escalonar para uma produção industrial em larga escala a partir dos cálculos de rendimento realizado.

Materiais inovadores são necessários para se obter resultados superiores em terapia celular e Engenharia de tecidos. Assim, este trabalho avaliou um protocolo de descelularização da pele de tilápia para a possível utilização eficaz do material, e o protocolo desenvolvido neste trabalho para a descelularização apresentou um excelente rendimento, além da avaliação da integridade do colágeno submetido a esse processo com fim de aplicação para tratamento de queimaduras.

A quantificação de DNA revelou que o processo de descelularização promoveu redução do protocolo 1 de 95,1% e do protocolo 2 84,29% da quantidade de DNA das amostras e houve ausência de núcleos na coloração DAPI.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o material descelularizado com solução de SDS 1% pode ser considerado como um biomaterial promissor para o tratamento de queimados. O tecido mostrou-se com quantidade reduzida de material genético e sem perda significativa de quantidade de colágeno. Apesar do estudo atual considerar apenas o uso da pele de tilápia para queimados, o arcabouço também tem potencial para utilização em outros procedimentos biomédicos, como cirurgias, tratamentos de cicatrização de ferimentos de diabéticos e entre outros.

Novos estudos são necessários para que futuramente possa ser utilizado clinicamente como hidrogéis, pomadas e curativos. Estudos esses como a avaliação da citotoxicidade, biocompatibilidade com células humanas e posteriormente realizar estudos in vivo, nos quais o remodelamento imune e o potencial de calcificação possam ser analisados com a implantação do enxerto da pele de tilápia descelularizada.

REFERÊNCIAS

ADORNO J. “Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ) e queimaduras no Brasil”. Revista Brasil Queimaduras, 2019.

ALVES, MATEUS GOULART, e cols. "Pele De Tilápia-Do-Nilo No Tratamento De Queimadura: Revisão Integrativa Da Literatura." Revista Atenas Higeia 2.4, 2020, 31-36.

ALVES, A. P. N. N. e cols. “Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo”. Revista Brasileira de Queimaduras, Fortaleza out./dez, 2015, v. 14, n. 3, p. 203-210.

ARMSTRONG AW, READ C. “Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis:” A Review. JAMA, London 05/2020, v. 323, n. 19, p.1945-1960.

BAIRI, Srirama M.; MOHAN, “Chandra. Detergentes”. Calbiochem-Novabiochem, 1997.

BERNARDO, A. F. C., SANTOS, K. D., & SILVA, D. P. D. “Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade.” Revista Saúde em foco, 2019, 1(11), 1221-33.

BLANK IH. “Factors which influence the water content of the stratum corneum.” J Invest Dermatol ,1952; 18(6):433-440.

BOATENG, J.S. e cols. “Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems:” A Review. Journal of Pharmaceutical Sciences, Glasgow, 2008, v. 97, n. 1, p. 2892–2923.

CEN, L., LIU, W., CUI, L., ZHANG, W., CAO, Y. “Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications.” Pediatr, 2008, Res. 63, 492–496.

CITRON I, AMUNDSON J, SALUJA S, GUILLOUX A, JENNY H, SCHEFFER M, SHRIME M, ALONSO N. “Assessing burn care in Brazil: An epidemiologic, cross-sectional, nationwide study.” Surgery.2018.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. “An overview of tissue and whole organ decellularization process.” *Biomaterials*, 2011, v. 32, n. 12, p. 1–21.

DALEY, W. P; PETERS, S. B; LARSEN, M. “Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine.” *Journal of cell science*, 2008, v. 121, p. 255–264.

DE MIRANDA, MARCELO JOSÉ BORGES. Viabilidade da pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como curativo biológico no tratamento de queimaduras. *Anais da faculdade de medicina de olinda*, 2018, 1.1: 49-52.

DE OLIVEIRA, E. G. e cols. "Produção de tilápia: mercado, espécie, biologia e recria." Embrapa Meio-Norte-Circular Técnica, 2007. (INFOTECA-E)

DUAN, LIAN, e cols. “As influências do 3,4-dihidroxibenzaldeído na microestrutura e estabilidade das fibrilas de colágeno.” *Degradação e Estabilidade do Polímero*, 2019, 161: 198-205.

FERREIRA, A.M., GENTILE, P., CHIONO, V. & CIARDELLI, G. “Collagen for bone tissue regeneration.” *Acta Biomaterialia*, 2012, 8: 3191-3200.

FRANCO MLRS, FRANCO NP, GASPARINO E, DORADO DM, PRADO M, VESCO APD. “Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: histologia, composição e resistência.” *Arch Zootec*. 2013.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. “The extracellular matrix at a glance.” *Journal of Cell Science*, 2010, v. 123, n. 24, p. 4195–4200.

GARTNER, L.P; HIATT, J.L “Tratado de Histologia em cores” 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, cap 14p, tegumento. p 253-266.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. “Decellularization of tissues and organs.” *Biomaterials*, 2006, v. 27, n. 19, p. 3675–3683.

GIMENEZ, CRISTHIAN ENMANUEL AYALA, e cols. “A pele da tilápia no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro graus, além de mais eficiente, é de baixíssimo custo.” *Revista Enfermagem Atual In Derme*, 2019, 87.25.

GRATIERI, T, GUILHERME M. G, RENATA F. V. L. “Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração de fármacos.” *Química Nova* 31, 2008, 1490-1498.

GUBITOSI A, DOCIMO G, PARMEGGIANI D, PIROZZI R, VITIELLO C, SCHETTINO P, e cols. “Acellular bovine pericardium dermal matrix in immediate breast reconstruction after Skin Sparing Mastectomy.” *Int J Surg*. 2014.

GÓMES-GUILLÉN, M.C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M.E., MONTERO, M. “Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review.” *Food Hydrocoll*, 2011, 25, 1813–1827.

HASLAM IS, ROUBOS EW, MANGONI ML, YOSHIKATO K, VAUDRY H, KLOEPPER JE, ET AL. “From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology”. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2014.

HÄNEL K. H e cols. “Cytokines and the skin barrier.” *Int J Mol Sci*. Aachen, mar. /2013, v. 14, n. 4, p. 6720-6745.

HERMANS M. H. “Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: is there a clinical difference? *Burns*.” Newtown, may/2014, v. 40, n. 3, p. 408-415.

“Histologia Básica.” Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 18, pele e anexos. p 358-370.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. “Histologia básica.” Rio de Janeiro, 2013, Brasil.

KANANI, A. G.; BAHARAMI, S. H.; TAFTEI. “Effect of Chitosan polyvinyl alcohol beend nanofibrous web on the healing of excision and incision full thickness wounds.” *IET Nanobiotech noly*, 2010, v.4, n. 4, p. 109-117.

KEANE, T. J.; LONDONO, R.; TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. “Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response.” *Biomaterials*, 2012, v. 33, n. 6, p. 1771–1781.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. “Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance.” *Methods*, 2015, v. 84, p. 25–34.

KUA EH, GOH CQ, TING Y, CHUA A, SONG C. “Comparing the use of glycerol preserved and cryopreserved allogenic skin for the treatment of severe burns: differences in clinical outcomes and in vitro tissue viability.” *Cell Tissue Bank*, 2012.

LATIF, N.; SARATHCHANDRA, P.; TAYLOR, P. M.; ANTONIW, J.; YACOUB, M. H. “Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves.” *Journal of Heart Valve Disease*, 2005, v. 14, n. 2, p. 218–227.

LETO BARONE AA, MASTROIANNI M, FARKASH EA, MALLARD C, ALBRITTON A, TORABI R, ET AL. “Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization.” *Burns*, 2015.

LIMA JÚNIOR EM, NOVAES FN, PICCOLO NS, SERRA MCVF. “Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo.” 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

LIMA-JUNIOR, E. M. e cols. “Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras.” *Revista Brasileira de Queimaduras*, Fortaleza, jun 2017, v. 16, n. 1, p. 10-17.

LIMA-JUNIOR, E. M. e cols. “Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion.” *Journal of Surgical Case Reports*, Fortaleza, mar. /2019, v. 2019, n. 6, p. 1-4.

MIRANDA, M. J.B. D, CARLOS T. B. “Xenoinxerto (pele da Tilápia-do-Nilo) e hidrofibra com prata no tratamento das queimaduras de II grau em adultos.” Rev. bras. cir. plást 34.1, 2019, 79-85.

PARKER F. “Estrutura e função da pele.” In: Cecil textbook of Medicine, 2003, 22. ed. Philadelphia: Saunders.

PATI, F, DHARA, S, ADHIKARI, B. “Fish Collagen: A Potential Material for Biomedical Application.” Proceedings of the 2010 IEEE Students' Technology Symposium, 3:34-38.

PIRES, A. L. R, BIERHALZ, A.C. K, MORAES, A.M. “Biomateriais: tipos, aplicações e mercado.” Química Nova, 2015, 38(7): 957-971.

RIBEIRO, M. P, ESPIGA, A., SILVA, D., BAPTISTA, P., HENRIQUES, J., FERREIRA, C. CORREIA, IJ. “Desenvolvimento de um novo hidrogel de quitosana para curativo.” Reparação e regeneração de feridas, 2009, 17 (6), 817-824.

ROWAN, M. P. e cols. “Burn wound healing and treatment: review and advancements.” Critical Care, Houston, jan/2015, v. 19, n. 1, p. 1-12.

SAMPAIO, S. A. P; RIVITTI, E.A. “Dermatologia”. 3.ed. São Paulo; Artes médicas, 2007. Cap 1, pele normal: anatomia e fisiologia. P. 1-37.

TANG, J., SAITO, T. “Biocompatibility of novel type I collagen purified from tilapia fish scale: an in vitro comparative study.” Biomed. Res. Int. 2015, 139476.

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. “Extracellular matrix structure.” Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, v. 97, p. 4–27.

TORTORA, Gerald J.; GRABOWSKI. “Princípios de Anatomia e Fisiologia.” 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

VANDEVORD, P. J.; MATTHEW, H. W.; DESILVA, S. P.; MAYTON, L.; WU, B.; WOOLEY, P. H. "Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice." *J Biomed Mater Res*, 2002, v.59, p. 585-90.

ZAIDI AH, NATHAN M, EMANI S, BAIRD C, DEL NIDO PJ, GAUVREAU K, ET AL. "Preliminary experience with porcine intestinal submucosa (CorMatrix) for valve reconstruction in congenital heart disease: histologic evaluation of explanted valves." *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014.

ZHANG, X., CHEN, X., HONG, H., HU, R., LIU, J., & LIU, C. "Scaffolds de matriz extracelular descelularizada: tendências recentes e estratégias emergentes em engenharia de tecidos." *Materiais bioativos*, 2022, 10, 15-31.

ZEUGOLIS, D.I, RAGHUNATH, M. "Collagen: Materials Analysis and Implant Uses." In: P. Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D. Grainger, C. Kirkpatrick (Eds.). *Comprehensive Biomaterials*, 2011, (pp. 261-278). Ed. Elsevier.

ZHENG, M. H.; CHEN, J.; KIRILAK, Y.; WILLERS, C.; XU, J.; WOOD, D. "Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: Possible implications in human implantation." *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 2005, v. 73, n. 1, p. 61–67.