

Padronização do processo de descélularização de ovários suínos para a produção de scaffolds biológicos

Letícia Beatriz Mazo Pinho

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida

Profa. Dra. Michelle Silva Araujo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo

mazoleticia@hotmail.com

Objetivos

Este estudo teve como objetivo estabelecer e padronizar um protocolo eficiente para descélularização de ovários suínos com base na perfusão de solvente e uso de ultrassom para obter estruturas funcionais de ovário inteiro para aplicação em engenharia de tecido ovariano.

Métodos e Procedimentos

As amostras foram obtidas no frigorífico da FZEA-USP, campus Pirassununga. Os ovários (n = 5 por grupo) foram coletados de porcas pré-púberes com aproximadamente 6 meses de idade. Esta pesquisa foi realizada em conformidade com as normas do Comitê de Ética Institucional (protocolo CEUAx nº 6278221121).

Os ovários foram canulados através da artéria ovariana e perfundidos com o auxílio de uma bomba de perfusão ORCA Bioreactor™ (Harvard Apparatus). A sequência de perfusão ocorreu em três etapas: (1) 2 horas de água deionizada (dH₂O) e 2 horas de tampão fosfato de sódio (PBS) 1x a uma taxa de 1ml/min; (2) descélularização – dodecil fosfato de sódio (SDS) 0,5% por 48 horas, Triton X-100 1% por 5 horas a uma taxa de 1ml/min; (3) os folículos ovarianos foram rompidos com injeção e água deionizada foi perfundida a uma taxa de 3ml/min no banho ultrassônico (SOLIDSTEEL) por 5 horas. Em seguida, os *scaffolds* foram armazenados em PBS 1x a 4°C para posterior análise (Fig. 1). A eficiência de descélularização foi avaliada por coloração DAPI e quantificação de DNA genômico total. A avaliação morfológica da MEC ovariana foi realizada por análise histológica por microscopia de luz e análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura. A composição físico-química da MEC foi avaliada

por meio de análises espectroscópicas, via FTIR e Raman.

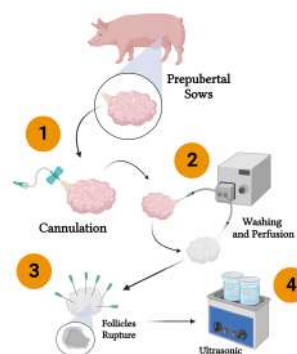


Figura 1: Esquema representativo mostrando o percurso metodológico do estudo.

Resultados

A eficiência de descélularização do processo foi atestada pela coloração DAPI, Hematoxilina e Eosina (HE), e quantificação do DNA total, que revelaram ausência de núcleos e diminuição de 97% do conteúdo de DNA, respectivamente (Fig. 2).

A caracterização morfológica foi realizada para verificar se os principais componentes da MEC ovariana foram preservados após a descélularização. As colorações Tricrômico de Masson, Picrosirius Red, Alcian blue e Fucsina-Resorcina de Weigert atestaram que o conteúdo de colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs) e fibras elásticas estavam preservados (Fig.3).

Os resultados da análise ultraestrutural mostraram que mesmo após o processo de descélularização, a organização do estroma ovariano foi preservada, corroborando os achados histológicos, e demonstrando que os *scaffolds* produzidos tiveram sua estrutura tridimensional preservada (Fig. 4).

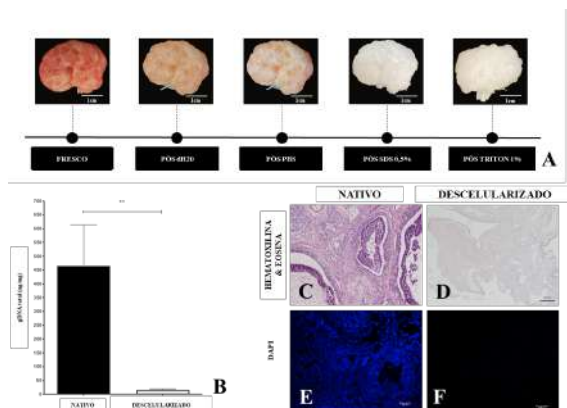


Figura 2: Aspecto macroscópico dos ovários perfundidos (A). Quantificação de DNA (B) e avaliação histológica de amostras submetidas à decelularização perfusão (D, F) em comparação com amostras nativas (C, E). *P < 0,05.

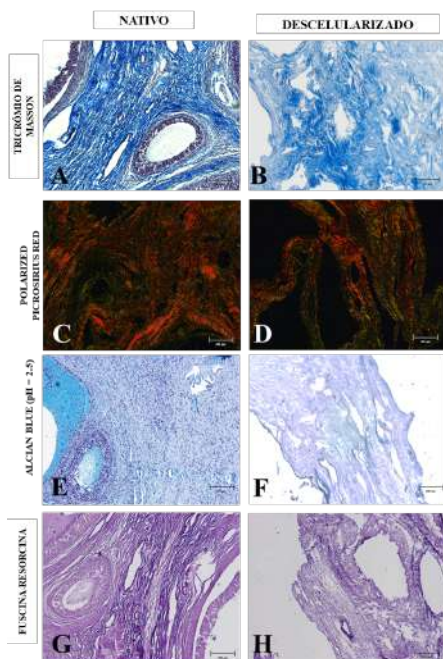


Figura 3: Análise morfológica da MEC ovariana de ovários nativos e decelularizados.

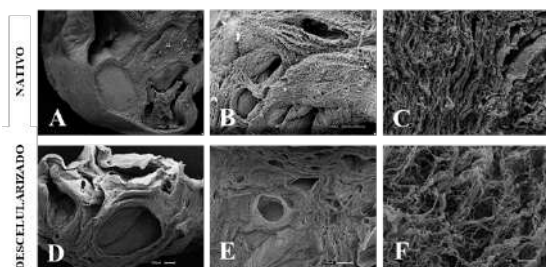


Figura 4: Micrografias eletrônicas de varredura representativas de tecido ovariano nativo e decelularizado.

Tanto o FTIR-ATR (Fig. 5) quanto a espectroscopia Raman (Fig. 6) foram utilizados quimicamente na matriz extracelular de amostras

para avaliar as alterações físico-químicas na matriz extracelular de amostras nativas e decelularizadas. Os resultados mostraram que não foram detectadas variações nos componentes da matriz extracelular após o protocolo de decelularização.

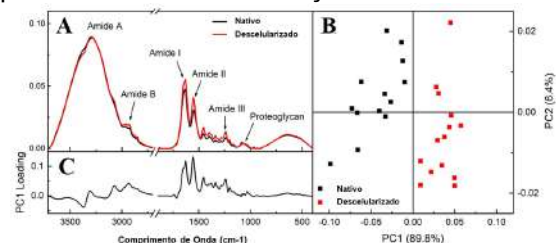


Figura 5: Espectro FTIR-ATR médio das regiões das amostras nativas e decelularizadas.

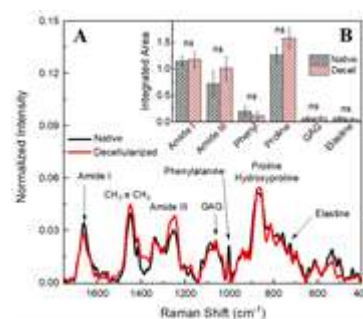


Figura 6: Média do espectro Raman para amostras de ovário suíno nativo e decelularizado (A). Integral de áreas relacionadas ao conteúdo de colágeno (amida I e amida III), fenilalanina, prolina, hidroxiprolina, glicosaminoglicanos e elastina em amostras nativas e decelularizadas (B). ns (não significativo).

Conclusões

O protocolo de decelularização proposto produziu *scaffolds* de ovários inteiros com a composição da MEC altamente preservada e com grande potencial de aplicação na engenharia de tecidos.

Referências Bibliográficas

- 1 – BERGHOLT, Mads S.; SERIO, Andrea; ALBRO, Michael B. Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, [S. l.], v. 7, 2019. DOI: 10.3389/FBIOE.2019.00303. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31737621/>. Acesso em: 7 ago. 2022.
- 2 – SISTANI, Maryam Nezhad; ZAVAREH, Saeed; VALUJERDI, Mojtaba Rezazadeh; SALEHNIA, Mojdeh. Characteristics of a decellularized human ovarian tissue created by combined protocols and its interaction with human endometrial mesenchymal cells. *Progress in biomaterials*, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 195–206, 2021.

Standardization of the porcine ovaries decellularization process for the biological scaffolds production

Letícia Beatriz Mazo Pinho

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida

Profa. Dra. Michelle Silva Araujo

School of Veterinary Medicine and Animal Science/University of São Paulo

mazoleticia@hotmail.com

Objectives

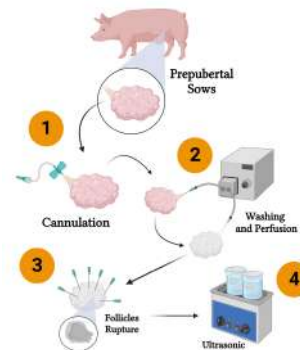
This study aimed to establish and standardize an efficient protocol for porcine ovaries decellularization based on solvent perfusion and use of ultrasonication to obtain functional whole-ovary scaffolds for ovarian tissue engineering application.

Materials and Methods

Samples were obtained from the slaughterhouse of FZEA-USP, Pirassununga campus. The ovaries (n = 5 per group) were collected from prepubertal sows with approximately 6 months of age. This research was conducted in compliance with the Institutional Ethics Committee regulations (CEUAX protocol No. 6278221121).

The ovaries were cannulated through the ovarian artery and perfused with the assistance of an ORCA Bioreactor™ (Harvard Apparatus) perfusion bomb. The perfusion sequence took place in three stages: (1) 2 hours of deionized water (dH₂O) and 2 hours of sodium phosphate buffer (PBS) 1x at a rate of 1ml/min; (2) decellularization – sodium dodecyl phosphate (SDS) 0.5% for 48 hours, Triton X-100 1% for 5 hours at a rate of 1ml/min; (3) the ovarian follicles were ruptured with injection then deionized water were perfused at a rate of 3ml/min in the ultrasonic bath (SOLIDSTEEL) for 5 hours. Then, the scaffolds were stored in PBS 1x at 4°C for further analysis (Picture 1). The decellularization efficiency has been evaluated by DAPI staining and total genomic DNA quantification. Ovarian ECM morphological evaluation was performed by histological analysis using light microscopy and ultrastructural analysis by scanning electron microscopy. ECM physico-chemical

composition was evaluated using spectroscopic analyses, via FTIR and Raman.



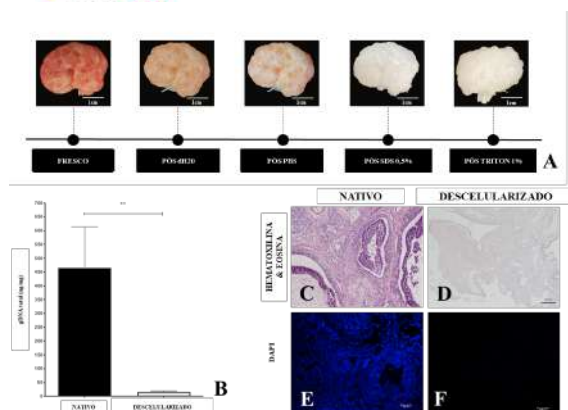
Picture 1: Representative scheme showing the study methodological pathway.

Results

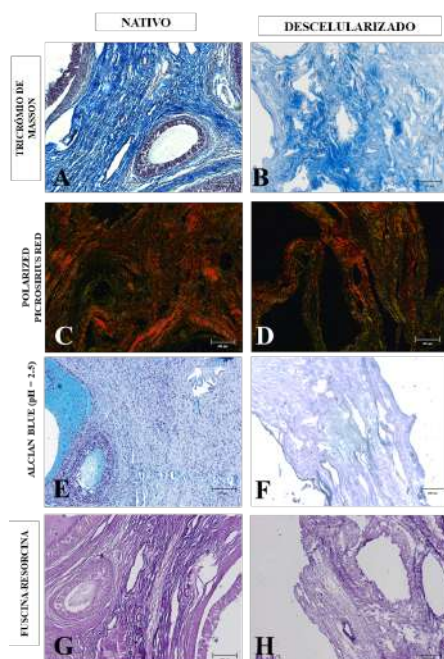
The decellularization efficiency of the process was attested by DAPI and HE staining and total DNA quantification, which revealed absence of nuclei and decrease of 97% of DNA content respectively (Picture 2).

Morphological characterization was performed to verify if the main ovarian ECM components were preserved after decellularization. Masson's Trichrome, Picrosirius Red, Alcian blue and Weigert's Fucsin-Resorcin staining attested that collagen, glycosaminoglycans (GAGs) and elastic fibers content were preserved.

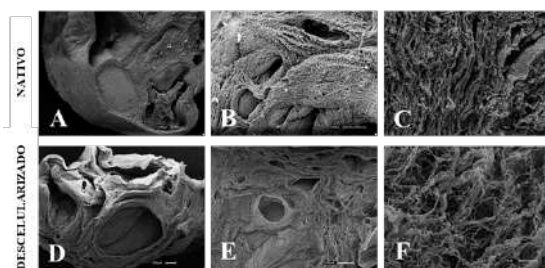
Ultrastructural analysis results showed that even after the decellularization process, ovarian stroma organization was preserved, corroborating the histological findings, and demonstrating that the produced scaffolds had their three-dimensional structure preserved (Picture 4).



Picture 2: Macroscopic aspect of perfused ovaries (A). DNA quantification (B) and histological evaluation of samples undergone perfused decellularization (D, F) compared to native samples (C, E). *P < 0.05.



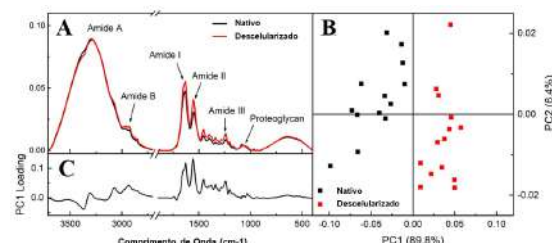
Picture 3: Morphological analysis of ovarian ECM from native and decellularized ovaries.



Picture 4: Representative scanning electron micrographs of ovarian native and decellularized tissue.

Both FTIR-ATR (Picture 5) and Raman spectroscopy (Picture 6) were used to evaluate

physico-chemical alterations in extracellular matrix from native and decellularized samples. Through these results, it is possible to infer that no variations were detected in the extracellular matrix components after the decellularization protocol.



Picture 5: Average FTIR-ATR spectrum from the regions of native and decellularized samples.

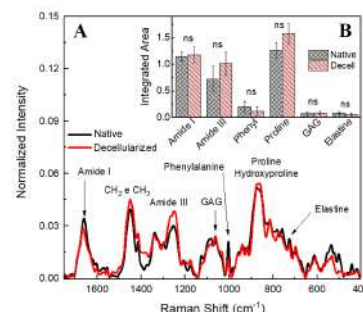


Figure 6: Mean of Raman spectrum for native and decellularized porcine ovary samples (A). Integral of areas related to collagen content (amide I and amide III), phenylalanine, proline, hydroxyproline, glycosaminoglycans and elastin in native and decellularized samples (B). ns (not significant).

Conclusions

The proposed decellularization protocol produced whole-ovaries scaffolds with the ECM composition highly preserved and with great potential application in tissue engineering.

References

- 1 – BERGHOLT, Mads S.; SERIO, Andrea; ALBRO, Michael B. Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 7, 2019. DOI: 10.3389/FBIOE.2019.00303. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31737621/>. Acesso em: 7 ago. 2022.
- 2 – SISTANI, Maryam Nezhad; ZAVAREH, Saeed; VALUJERDI, Mojtaba Rezazadeh; SALEHNIA, Mojdeh. Characteristics of a decellularized human ovarian tissue created by combined protocols and its interaction with human endometrial mesenchymal cells. *Progress in biomaterials*, v. 10, n. 3, p. 195–206, 2021.