

Descelularização de segmentos intestinais suínos para produção de curativos biológicos: aplicação da engenharia tecidual no reparo do trato urinário inferior

Cesar Monteiro Konno

**Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida, Ana Claudia Oliveira
Carreira**

Maria Angelica Miglino

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo

cesar.konno@hotmail.com

Objetivos

Produzir e caracterizar scaffolds biológicos a partir de segmentos jejunais descelularizados que possam ser utilizados como biocurativos do trato urinário de felinos.

Métodos e Procedimentos

O material biológico foi doado pelo Frigorífico Experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, SP.

Os fragmentos foram imersos no detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) em concentrações de 0,25, 0,5 e 1% por 36 horas, sendo trocados a cada 3 horas nas primeiras 12 horas, seguido de Triton X-100 durante 24 horas. Após a descelularização, foram feitas novas lavagens com dH₂O por 24 horas, sendo trocadas a cada 2 horas e PBS 1X por mais 24 horas, sendo trocados a cada 2 horas. Por fim, os fragmentos foram armazenados em dH₂O dentro da geladeira para serem analisados posteriormente.

Os fragmentos foram fixados e processados para análises histológicas e de microscopia eletrônica de varredura. Foram realizadas as colorações de Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, Picrosirius e Alcian Blue para avaliar a integridade dos componentes da matriz extracelular, fluorescência por DAPI para avaliar a presença ou ausência de núcleos e microscopia eletrônica de varredura para

avaliar a ultraestrutura dos scaffolds produzidos.

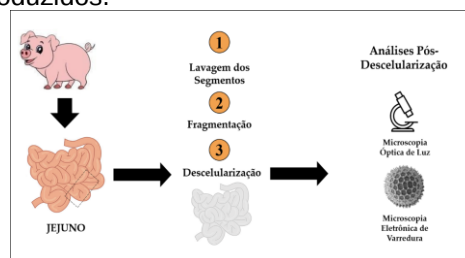


Figura 1: Esquema representativo mostrando o design metodológico do estudo.

Resultados

Os fragmentos intestinais foram submetidos a três protocolos de descelularização (0,25, 0,5 e 1% de SDS) por imersão e agitação orbital para escolha da combinação mais promissora (Figura 2). O protocolo baseado em 1% de SDS foi capaz de retirar os núcleos do tecido, porém causou danos a matriz extracelular (Figuras 2G e 1H), mostrando-se ineficiente para a descelularização dos fragmentos intestinais. O protocolo baseado em 0,25% de SDS mostrou-se a menos eficiente entre os protocolos, pois degradou componentes da MEC (Figura 2C e 2D) e não foi capaz de promover uma remoção significativa do conteúdo celular, o que foi atestado pela presença intensa de núcleos intensos por análise de DAPI. Fragmentos expostos a 0,5%

de SDS mostraram preservação da estrutura e ausência de núcleos celulares (Figura 2E e 2F). A combinação baseada em 0,5% foi a escolhida para descelularizar os segmentos intestinais.

Na coloração Tricrômio de Masson, observamos que o conteúdo de colágeno total, corado em azul, foi preservado sem aparente desarranjo dos feixes de fibras colágenas nas amostras descelularizadas (Figura 3B) em relação ao tecido nativo (Figuras 3A).

Também foi utilizada a coloração Picrosirius Red, que cora o conteúdo de colágeno total em vermelho (Figuras 3C e 3D), porém, quando exposta à luz polarizada, distingue colágeno maduro (avermelhado e tons amarelados) do colágeno imaturo (tons esverdeados) de acordo com a birrefringência. Os resultados mostraram que as amostras descelularizadas (Figuras 3D e 3F) apresentaram o mesmo padrão de preservação para ambos os tipos de colágeno semelhantes às amostras de ovário nativo (Figura 3C e 3E).

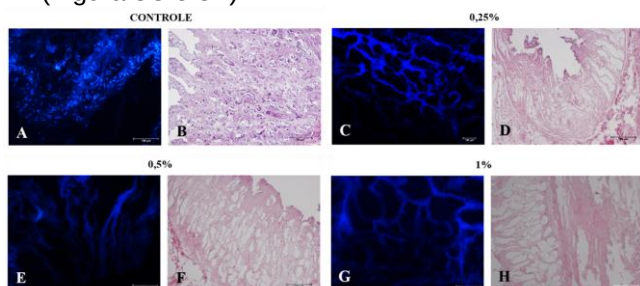


Figura 2: Avaliação histológica (coloração HE e DAPI) de amostras submetidas a protocolos de descelularização.

O conteúdo de GAGs foi demonstrado pela coloração com Alcian Blue, que cora as regiões que contêm esses componentes em tons azulados. Os resultados mostraram que o tecido descelularizado manteve os glicosaminoglicanos após o processo de descelularização (Figura 3H) em relação ao tecido nativo (Figuras 3G).

Foi realizada uma análise ultraestrutural de amostras nativas (Figuras 4A, 4C e 4E) e descelularizadas (Figuras 4B, 4D e 4F) caracterizar a da estrutura tridimensional dos scaffolds. Os resultados na menor ampliação mostraram que mesmo após o processo de descelularização, a estrutura da matriz

extracelular intestinal foi preservada, assim como a organização das camadas intestinais (Figura 3B). A microscopia eletrônica de varredura também mostrou que tanto as fibras colágenas mais densas e resistentes quanto as mais finas e delicadas estavam preservadas, corroborando os achados histológicos e demonstrando que os scaffolds produzidos tiveram sua estrutura tridimensional preservada.

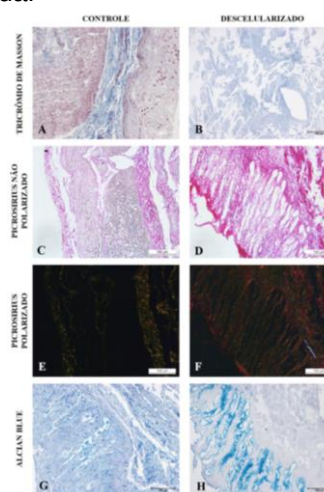


Figura 3: Análise morfológica da MEC intestinal nativo e descelularizado.

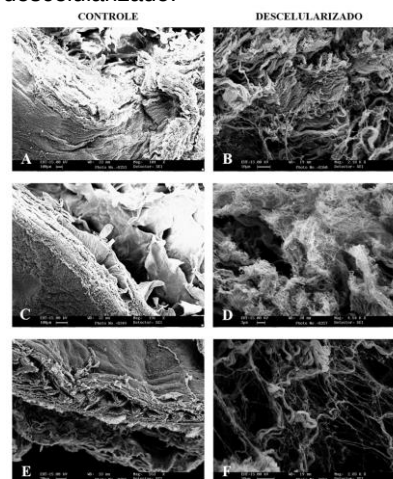


Figura 4: Micrografias eletrônicas de varredura representativas de tecido intestinal nativo (A, C, E) e descelularizado (B, D, F).

Conclusões



Pode-se atestar que o protocolo de descelularização proposto baseado em SDS 0,5% foi capaz de gerar scaffolds acelulares, com a estrutura tridimensional preservada.

Decellularization of porcine intestinal segments for the production of biological dressings: application of tissue engineering in lower urinary tract repair

Cesar Monteiro Konno

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida, Ana Claudia Oliveira Carreira

Maria Angelica Miglino

Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo

cesar.konno@hotmail.com

Objectives

To produce and characterize biological scaffolds from decellularized jejunal segments that can be used as biocuratives for the feline urinary tract.

Materials and Methods

The Experimental Slaughterhouse of the Faculty of Animal Science and Food Engineering of the University of São Paulo, campus of Pirassununga, donated the biological material SP.

The fragments were immersed in sodium dodecyl sulfate (SDS) detergent at concentrations of 0.25, 0.5 and 1% for 36 hours, being changed every 3 hours for the first 12 hours, followed by Triton X-100 for 24 hours. After decellularization, new washes were performed with dH₂O for 24 hours, being changed every 2 hours and PBS 1X for another 24 hours, being changed every 2 hours. Finally, the fragments were stored in dH₂O inside the refrigerator to be analyzed later.

The fragments were fixed and processed for histological and scanning electron microscopy analyses. Hematoxylin and Eosin, Masson's Trichrome, Picrosirius and Alcian Blue stains were performed to assess the integrity of the extracellular matrix components, DAPI fluorescence to assess the presence or absence of nuclei and scanning electron microscopy to assess the ultrastructure of the scaffolds produced.

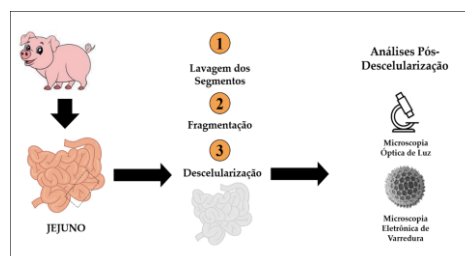


Figure 1: Representative scheme showing the methodological design of the study.

Results

Intestinal fragments were submitted to three decellularization protocols (0.25, 0.5 and 1% SDS) by immersion and orbital agitation to choose the most promising combination (Figure 2). The protocol based on 1% SDS was able to remove the nuclei from the tissue, but caused damage to the extracellular matrix (Figures 2G and 1H), proving to be inefficient for the decellularization of intestinal fragments. The protocol based on 0.25% SDS proved to be the least efficient among the protocols, as it degraded ECM components (Figure 2C and 2D) and was not able to promote a significant removal of cellular content, which was attested by the presence intensity of intense nuclei by DAPI analysis. Fragments exposed to 0.5% SDS showed preservation of the structure and absence of cell nuclei (Figure 2E and 2F). The

combination based on 0.5% was chosen to decellularize the intestinal segments.

In Masson's Trichrome staining, we observed that the total collagen content, stained in blue, was preserved without apparent disarray of the collagen fiber bundles in the decellularized samples (Figure 3B) in relation to the native tissue (Figures 3A).

Picrosirius Red staining was also used, which stains the total collagen content in red (Figures 3C and 3D), however, when exposed to polarized light, it distinguishes mature collagen (reddish and yellowish tones) from immature collagen (greenish tones) according to with birefringence. The results showed that the decellularized samples (Figures 3D and 3F) presented the same preservation pattern for both types of collagen, similar to native ovary samples (Figure 3C and 3E).

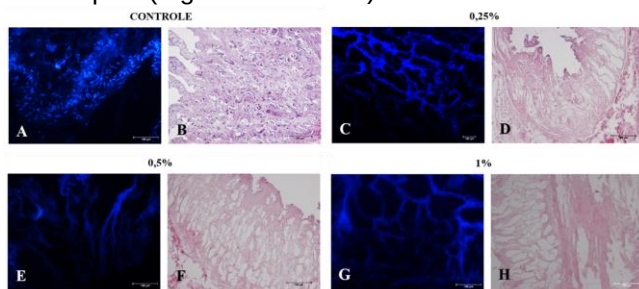


Figure 2: Histological evaluation (HE and DAPI staining) of samples submitted to decellularization protocols.

The content of GAGs was demonstrated by staining with Alcian Blue, which stains regions containing these components in bluish tones. The results showed that the decellularized tissue maintained the glycosaminoglycans after the decellularization process (Figure 3H) in relation to the native tissue (Figures 3G).

An ultrastructural analysis of native (Figures 4A, 4C and 4E) and decellularized samples (Figures 4B, 4D and 4F) was performed to characterize the three-dimensional structure of the scaffolds. The results at the lowest magnification showed that even after the decellularization process, the structure of the intestinal extracellular matrix was preserved, as well as the organization of the intestinal layers (Figure 3B). Scanning electron microscopy also showed that both the denser and more resistant collagen fibers and the thinner and more

delicate ones were preserved, corroborating the histological findings and demonstrating that the scaffolds produced had their three-dimensional structure preserved.

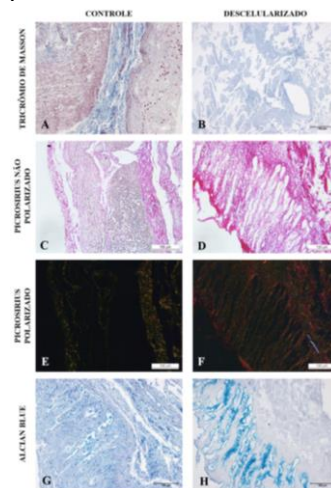


Figure 3: Morphological analysis of native and decellularized intestinal ECM.

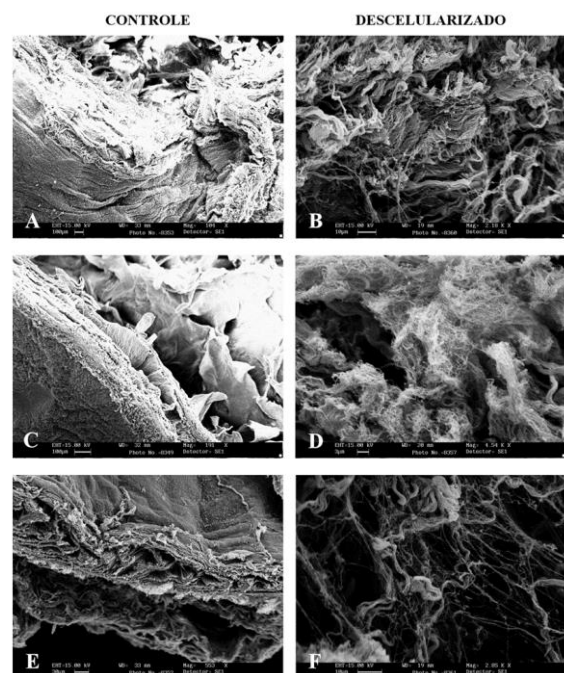


Figure 4: Representative scanning electron micrographs of native (A, C, E) and decellularized (B, D, F) intestinal tissue.

Conclusions



It can be attested that the proposed decellularization protocol based on 0.5% SDS was able to generate acellular scaffolds, with the three-dimensional structure preserved.