

Estabelecimento de um protocolo eficiente para descelularização de tubas uterinas suínas

Raquel Souza da Silva

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida, Ana Claudia Oliveira
Carreira

Maria Angelica Miglino

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

raquellsouzasilva@outlook.com

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente de descelularização e caracterizar estruturalmente scaffolds derivados dos três segmentos de tubas uterinas suínas (infundíbulo, ampola e istmo), como plataforma para a reconstrução do microambiente tubário.

Métodos e Procedimentos

Foram coletadas tubas uterinas suínas (CEUAX n° 2250270223), as quais foram segmentadas em 3 porções (infundíbulo, ampola e istmo), sendo divididos em dois grupos (CONTROLE e DECEL; n=10 por grupo).

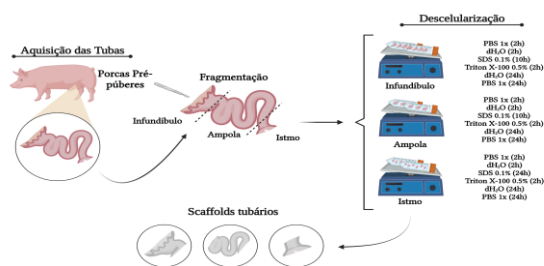


Figura 1: Esquema representativo mostrando o design metodológico do estudo.

Tais segmentos foram expostos a SDS 0,1%, seguido de Triton X-100 a 0,5%. Para avaliar a qualidade da descelularização, realizou-se a coloração por DAPI a fim de atestar a presença/ausência de núcleos. Para atestar o estado geral de preservação da matriz extracelular, realizou-se as colorações histológicas por Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, Picrosirius Red, Alcian

Blue e Fucsina-Resorcina. Realizou-se também análises imunohistoquímicas para colágeno I, III, laminina, elastina e fibronectina. Microscopia eletrônica de varredura também foi empregada para avaliar a tridimensionalidade dos scaffolds.

Resultados

Os resultados da coloração por DAPI evidenciaram a ausência de núcleos nos três segmentos tubários quando comparados com os tecidos nativos (Figura 2E-2J). A quantificação de DNA genômico total revelou uma diminuição de 97,6% no infundíbulo, 97,8% na ampola e 94,7% no istmo em relação ao tecido nativo, o que atestou a eficiência da descelularização (Figura 2K).

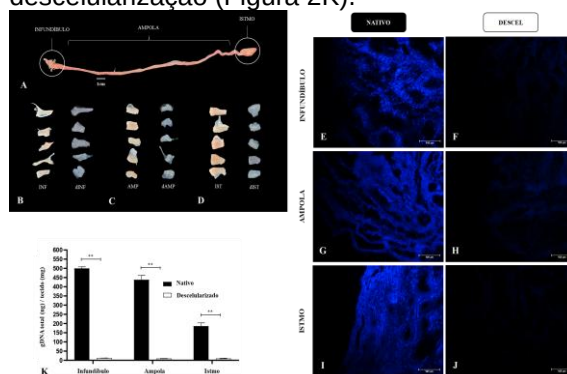


Figura 2: Avaliação do processo de descelularização de segmentos tubários suínos. (A) Tuba uterina suína pré-púbere. (B,C,D) Segmentos tubários nativos e descelularizados, respectivamente. (E-J) Coloração por DAPI dos segmentos antes e após a descelularização. (K) Quantificação do DNA genômico total das amostras.

As análises histológicas demonstraram que os principais componentes da MEC dos três

segmentos tubários foram preservados após o processo de descélularização (Figura 3).

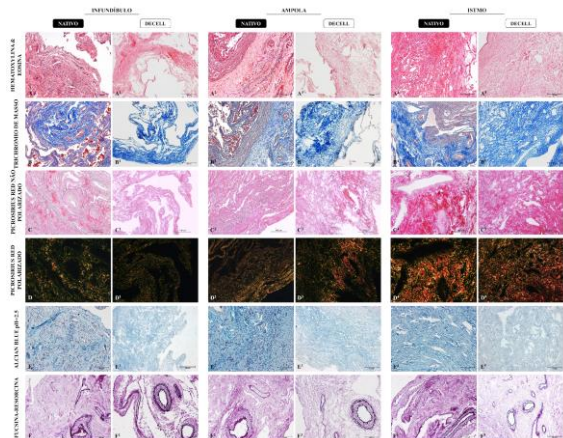


Figura 3: Análise histológica da MEC tubária de infundíbulo nativo e descélularizado, ampola e istmo. A coloração com hematoxilina e eosina indica a estrutura geral do tecido, presença ou ausência de células em amostras nativas e descélularizadas (A-A5). A coloração Tricrômio de Masson destaca o conteúdo total de colágeno em azul em amostras nativas e descélularizadas (B-B5). A coloração com Picrosirius Red também indica conteúdo de colágeno (C-C5). A coloração vermelha polarizada Picrosirius distingue colágeno maduro (tons avermelhados e amarelados) e colágeno imaturo (tons esverdeados) (D-D5). A coloração Alcian Blue evidencia conteúdo de GAG em amostras nativas e descélularizadas (E-E5). A coloração fucsina-resorcina de Weigert destaca o conteúdo de fibras elásticas em amostras nativas e descélularizadas (F-F5).

As análises imunohistoquímicas dos principais componentes da MEC tubária (colágeno I, III, elastina, laminina e fibronectina) apresentaram um padrão de imunolocalização semelhante tanto nas amostras descélularizadas quanto no tecido nativo, atestando a preservação de importantes componentes estruturais e funcionais da MEC tubária do infundíbulo, ampola e istmo suínos (Figura 4).

As análises ultraestruturais também revelaram que os scaffolds acelulares apresentaram um padrão microestrutural semelhante ao tecido nativo, mantendo a tridimensionalidade original (Figura 5).

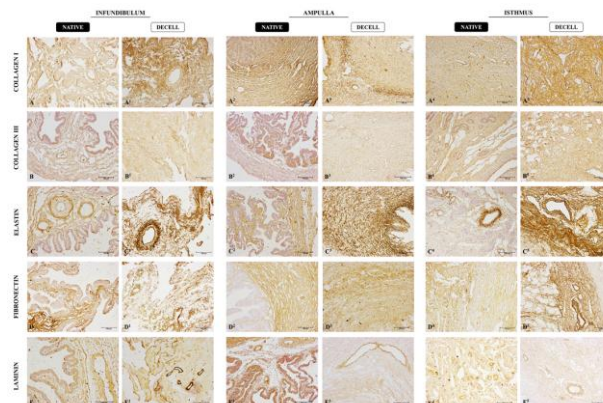


Figura 4: Análise imunohistoquímica dos principais componentes da MEC do infundíbulo, ampola e istmo nativos e descélularizados. Imunolocalização de colágeno tipo I (A-A5), colágeno tipo III (B-B5), elastina (C-C5), fibronectina (D-D5) e laminina (E-E5) em amostras nativas e descélularizadas.

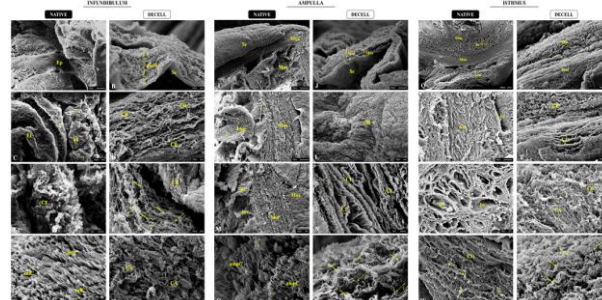


Figura 5: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura para avaliação da ultraestrutura dos segmentos tubários nativos e descélularizados.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, os biomateriais produzidos demonstram uma elevada qualidade biológica e preservação dos constituintes da matriz extracelular, evidenciando seu elevado potencial para reconstrução do microambiente tubário biomimético.

Referencias

- 1 - ALMEIDA, et al. Uterine Tissue Engineering: Where We Stand and the Challenges Ahead. Tissue engineering. Part B Reviews, [S. l.], 2021.

Establishment of an efficient protocol for decellularization of porcine fallopian tubes

Raquel Souza da Silva

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida, Ana Claudia Oliveira
Carreira

Maria Angelica Miglino

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

raquellsouzasilva@outlook.com

Objectives

This work aimed to establish an efficient decellularization protocol and structurally characterize scaffolds derived from the three segments of porcine uterine tubes (infundibulum, ampulla and isthmus), as a platform for reconstructing the tubal microenvironment.

Materials and Methods

Porcine uterine tubes (CEUAX n° 2250270223) were collected, which were segmented into 3 portions (infundibulum, ampulla and isthmus), being divided into two groups (CONTROLE and DECEL; n=10 per group).

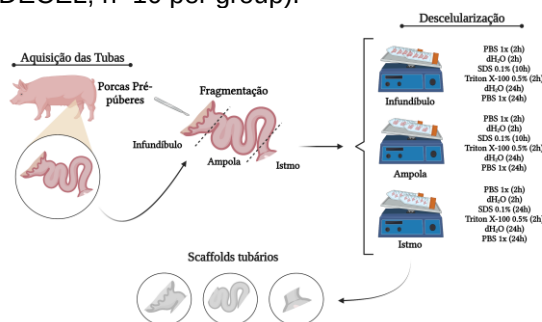


Figure 1: Representative scheme showing the methodological design of the study.

Such segments were exposed to 0.1% SDS, followed by 0.5% Triton X-100. To evaluate the quality of decellularization, DAPI staining was performed to confirm the presence/absence of nuclei. To confirm the general state of preservation of the extracellular matrix, histological staining was performed with Hematoxylin and Eosin, Masson's Trichrome,

Picrosirius Red, Alcian Blue and Fuchsin-Resorcin. Immunohistochemical analyzes were also performed for collagen I, III, laminin, elastin and fibronectin. Scanning electron microscopy was also used to evaluate the three-dimensionality of the scaffolds.

Results

The results of DAPI staining showed the absence of nuclei in the three tubal segments when compared with native tissues (Figure 2E-2J). Quantification of total genomic DNA revealed a decrease of 97.6% in the infundibulum, 97.8% in the ampulla and 94.7% in the isthmus in relation to the native tissue, which attested to the efficiency of decellularization (Figure 2K).

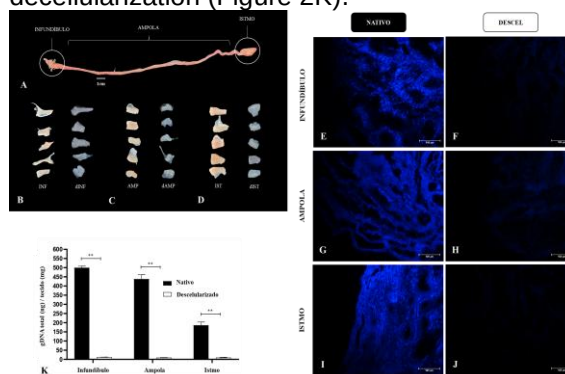


Figure 2: Evaluation of the decellularization process of porcine tubal segments. (A) Prepubertal porcine uterine tube. (B,C,D) Native and decellularized tubal segments, respectively. (E-J) DAPI staining of segments before and after decellularization. (K) Quantification of total genomic DNA from samples.

Histological analyzes demonstrated that the main components of the ECM of the three tubal segments were preserved after the decellularization process (Figure 3).

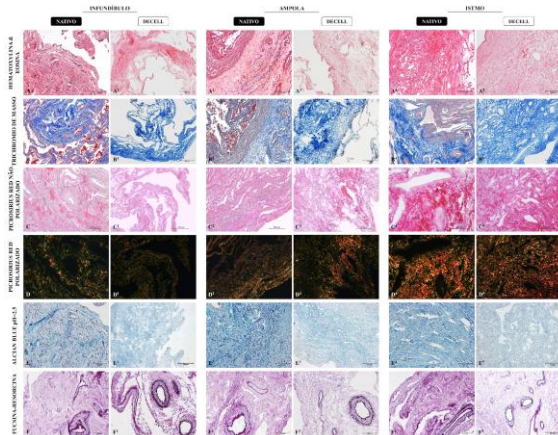


Figure 3: Histological analysis of tubal ECM from native and decellularized infundibulum, ampulla and isthmus. Hematoxylin and eosin staining indicates general tissue structure, presence or absence of cells in native and decellularized samples (A-A5). Masson's Trichrome stain highlights total collagen content in blue in native and decellularized samples (B-B5). Picrosirius Red staining also indicates collagen content (C-C5). Picrosirius polarized red staining distinguishes mature collagen (reddish and yellowish tones) and immature collagen (greenish tones) (D-D5). Alcian Blue staining shows GAG content in native and decellularized samples (E-E5). Weigert fuchsin-resorcin staining highlights the content of elastic fibers in native and decellularized samples (F-F5).

Immunohistochemical analyzes of the main components of the tubal ECM (collagen I, III, elastin, laminin and fibronectin) showed a similar pattern of immunolocalization in both decellularized samples and native tissue, attesting to the preservation of important structural and functional components of the tubal ECM of the infundibulum, porcine ampulla and isthmus (Figure 4).

Ultrastructural analyzes also revealed that the acellular scaffolds presented a microstructural pattern similar to the native tissue, maintaining the original three-dimensionality (Figure 5).

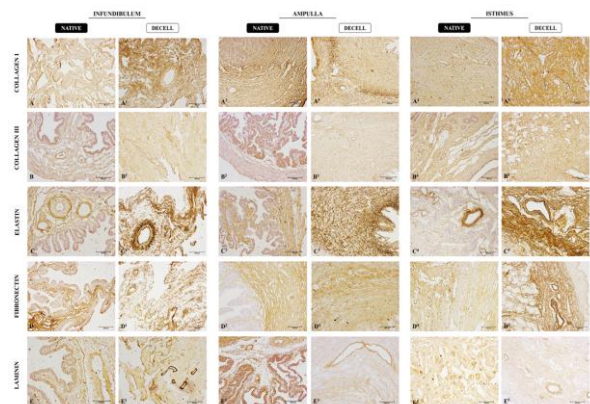


Figure 4: Immunohistochemical analysis of the main components of the ECM of the native and decellularized infundibulum, ampulla and isthmus. Immunolocalization of type I collagen (A-A5), type III collagen (B-B5), elastin (C-C5), fibronectin (D-D5) and laminin (E-E5) in native and decellularized samples.

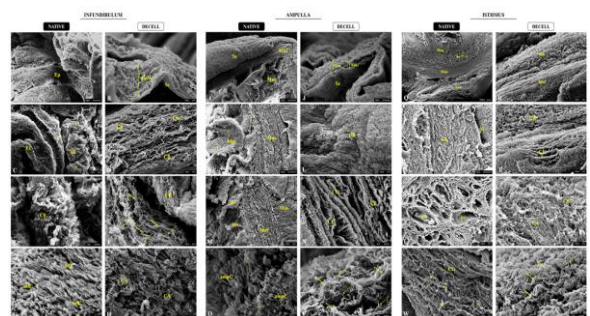


Figure 5: Scanning electron microscopy photomicrographs to evaluate the ultrastructure of native and decellularized tubal segments.

Conclusions

Based on the results obtained, the biomaterials produced demonstrate high biological quality and preservation of the constituents of the extracellular matrix, highlighting their high potential for reconstruction of the biomimetic tubal microenvironment.

References

- 1 - ALMEIDA, et al. Uterine Tissue Engineering: Where We Stand and the Challenges Ahead. Tissue engineering. Part B Reviews, [S. l.], 2021.