

Caracterização Estrutural e Espectroscópica de Scaffolds Uterinos Suínos Descelularizados

Irrane Couto Fernandes

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida, Ana Claudia Oliveira
Carreira

Maria Angélica Miglino

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

ranecouto@gmail.com

Objetivos

O objetivo deste projeto foi desenvolver e caracterizar scaffolds descelularizados de tecido uterino quanto à eficiência da descelularização e a preservação dos componentes da matriz extracelular.

Métodos e Procedimentos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUAx protocolo no. 5764121222). O delineamento experimental utilizado está esquematizado na Figura 1.

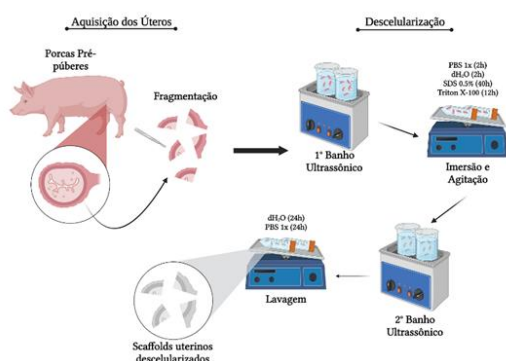


Figura 1: Esquema representativo mostrando o design metodológico do estudo.

Para produzir os scaffolds, fragmentos uterinos suínos (n=10) foram imersos e agitados em soluções de dodecilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100, seguidos de banho ultrassônico e lavagem. Para avaliar a eficiência da descelularização e a preservação dos componentes da matriz extracelular, fez-se quantificação de DNA genômico, análises histológicas com colorações por DAPI, HE,

Tricrômio de Masson, Picrosirius Red, Alcian Blue e Fucsina-Resorcina. Para avaliar as propriedades biomecânicas, realizou-se o ensaio de tração para avaliar o potencial de rigidez e resistência do biomaterial. A avaliação físico-química dos componentes da MEC foi realizada por espectroscopia FTIR.

Resultados

Em relação à eficiência do protocolo de descelularização, os resultados de HE e DAPI revelaram ausência de núcleos em ambas as técnicas. A quantificação de DNA demonstrou uma redução de 95% do conteúdo de DNA nas amostras descelularizadas em relação ao tecido nativo (Figura 2).

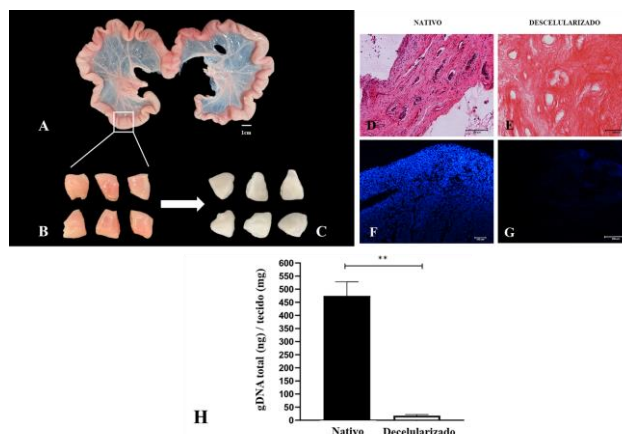
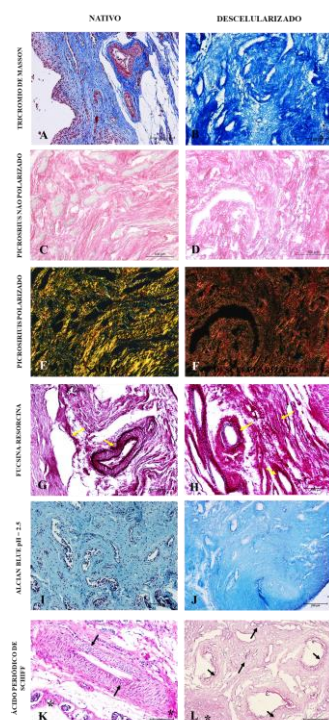


Figura 2: Avaliação do processo de descelularização de segmentos uterinos suínos.



As análises histológicas revelaram que os principais componentes da matriz extracelular uterina foram preservados após o processo de descellularização (Figura 3).

Figura 3: Fotomicrografias histológicas para avaliação da estrutura dos segmentos uterinos nativos (A,C,E,G,I,K) e descellularizados (B,D,F,H,J,L).

A análise espectroscópica mostrou um espectro aumentado das bandas de amida I ($\sim 1640\text{cm}^{-1}$), amida II ($\sim 1550\text{cm}^{-1}$) e estiramento CH_2 ($3000\text{--}2800\text{cm}^{-1}$) nas amostras descellularizadas em comparação às nativas, mas nenhuma diferença foi observada para a banda de proteoglicanos ($\sim 1140\text{--}985\text{cm}^{-1}$) (Figura 4).

Os resultados biomecânicos não demonstraram diferença significativa entre tecidos nativos e descellularizados em relação à força máxima de tração ($7,485 \pm 0,8050$ vs $8,290 \pm 0,7850$), alongamento máximo ($33,95 \pm 5,105$ vs $39,06 \pm 6,540$) e rigidez ($0,1900 \pm 0,05$ vs $0,1400 \pm 0,02$) (Figura 5). A análise ultraestrutural mostrou que a estrutura tridimensional dos scaffolds foi preservada (Figura 6).

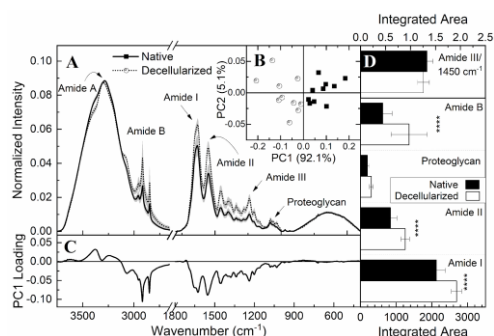


Figura 4: Espectro médio de FTIR-ATR das amostras nativas e descellularizadas do útero suíno.

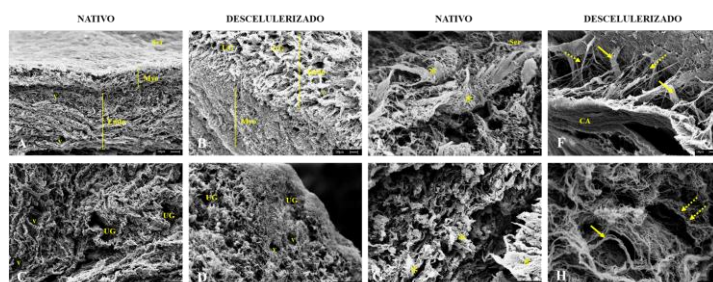


Figura 5: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura para avaliação da ultraestrutura do segmento uterino nativos (A,C,E,G) e descellularizados (B,D,F,H).

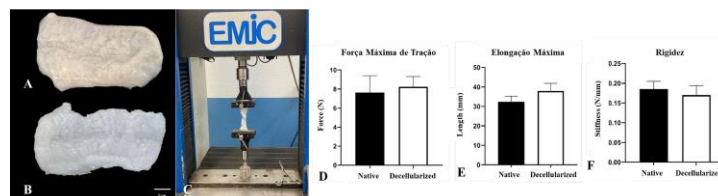


Figura 6: Caracterização biomecânica das amostras nativas e descellularizadas.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os dados preliminares apontam que o biomaterial gerado a partir de matriz extracelular uterina descellularizada, mostrou ser uma técnica promissora para produção de scaffolds com potencial para utilização em terapias regenerativas.

Referências

1-HELLSTRÖM M., et al. Uterine Tissue Engineering and the Future of Uterus Transplantation. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 45, p. 1718-1730, 2017. (doi: 10.1007/s10439-016-1776-2).

Structural and Spectroscopic Characterization of Decellularized Porcine Uterine Scaffolds

Iorrane Couto Fernandes

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

ranecouto@gmail.com

Objectives

The objective of this project was to develop and characterize decellularized scaffolds of uterine tissue regarding the efficiency of decellularization and the preservation of extracellular matrix components.

Materials and Methods

This project was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo (CEUAX protocol no. 5764121222). The experimental design used is shown in Figure 1.

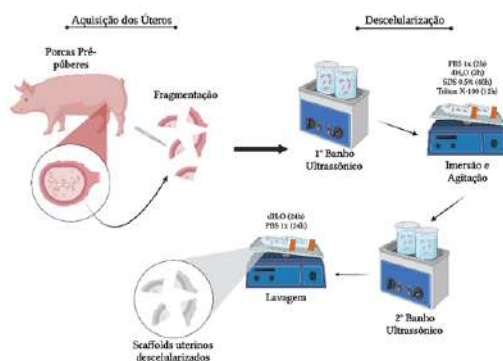


Figure 1: Representative scheme showing the methodological design of the study.

To produce the scaffolds, swine uterine fragments (n=10) were immersed and stirred in sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100 solutions, followed by an ultrasonic bath and washing. To evaluate the efficiency of decellularization and preservation of

extracellular matrix components, quantification of genomic DNA, histological analyzes with staining by DAPI, HE, Masson's Trichrome, Picrosirius Red, Alcian Blue and Fuchsin-Resorcina were performed. To evaluate the biomechanical properties, a tensile test was carried out to evaluate the stiffness and resistance potential of the biomaterial. The physicochemical evaluation of the ECM components was carried out using FTIR spectroscopy.

Results

Regarding the efficiency of the decellularization protocol, the HE and DAPI results revealed the absence of nuclei in both techniques. DNA quantification showed a 95% reduction in DNA content in decellularized samples compared to native tissue (Figure 2).

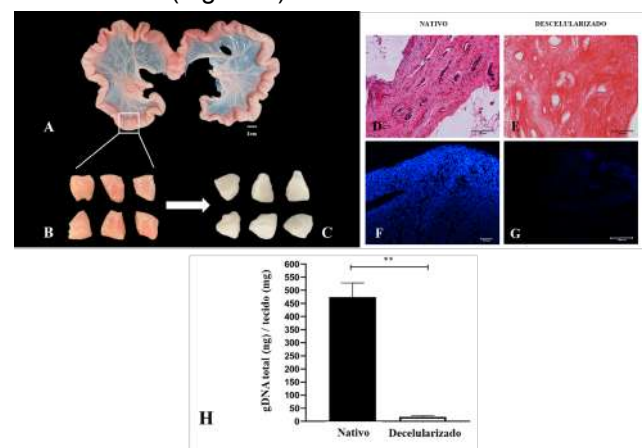


Figure 2: Evaluation of the process of decellularization of porcine uterine segments.

Histological analyzes revealed that the main components of the uterine extracellular matrix were preserved after the decellularization process (Figure 3).

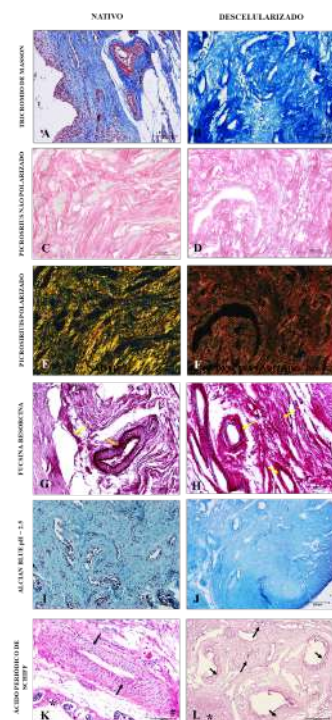


Figure 3: Histological photomicrographs for evaluating the structure of native (A,C,E,G,I,K) and decellularized (B,D,F,H,J,L) uterine segments.

Spectroscopic analysis showed an increased spectrum of amide I ($\sim 1640\text{cm}^{-1}$), amide II ($\sim 1550\text{cm}^{-1}$) and CH₂ stretch ($3000\text{--}2800\text{cm}^{-1}$) bands in the decellularized samples compared to the native ones, but no difference was observed for the proteoglycan band ($\sim 1140\text{--}985\text{cm}^{-1}$) (Figure 4).

The biomechanical results showed no significant difference between native and decellularized tissues in relation to maximum tensile strength (7.485 ± 0.8050 vs 8.290 ± 0.7850), maximum elongation (33.95 ± 5.105 vs 39.06 ± 6.540) and stiffness (0.1900 ± 0.05 vs 0.1400 ± 0.02) (Figure 5).

Ultrastructural analysis showed that the three-dimensional structure of the scaffolds was preserved (Figure 6).

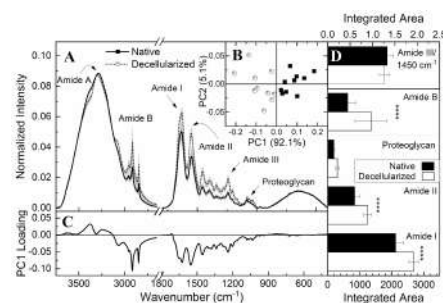


Figure 4: Average FTIR-ATR spectrum of native and decellularized swine uterus samples

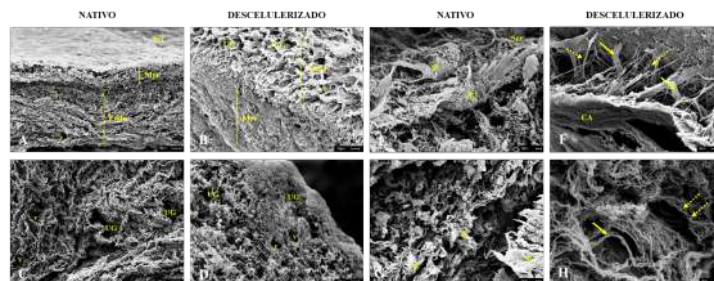


Figure 5: Scanning electron microscopy photomicrographs for evaluating the ultrastructure of native (A,C,E,G) and decellularized (B,D,F,H) uterine segments.

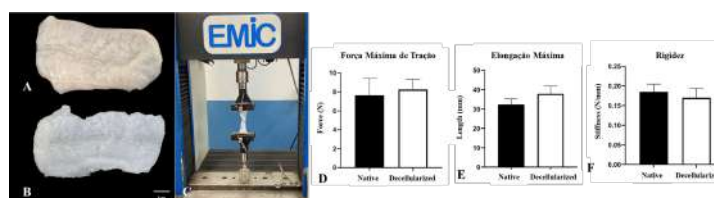


Figure 6: Biomechanical characterization of native and decellularized samples.

Conclusions

Based on the results obtained in this study, it is concluded that preliminary data indicate that the biomaterial generated from decellularized uterine extracellular matrix proved to be a promising technique for the production of scaffolds with potential for use in regenerative therapies.

Referências

1-HELLSTRÖM M., et al. Uterine Tissue Engineering and the Future of Uterus Transplantation. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 45, p. 1718-1730, 2017. (doi: 10.1007/s10439-016-1776-2).