

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação e caracterização de matriz extracelular colagenosa descelularizada como implante subcutâneo
em modelo murino

MATHEUS CARVALHO BARBOSA

UBERLÂNDIA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação e caracterização de matriz extracelular colagenosa descelularizada como implante subcutâneo em modelo murino

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

MATHEUS CARVALHO BARBOSA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Co-orientadora: Dra. Natássia Caroline Resende Corrêa

Uberlândia

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B238 2020	Barbosa, Matheus Carvalho, 1993- Avaliação e caracterização de matriz extracelular colagenosa descelularizada como implante subcutâneo em modelo murino [recurso eletrônico] / Matheus Carvalho Barbosa. - 2020. Orientadora: Luiz Ricardo Goulart. Coorientadora: Natássia Caroline Resende Corrêa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.126 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Imunologia. I. Goulart, Luiz Ricardo, 1962-, (Orient.). II. Corrêa, Natássia Caroline Resende, 1983-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título. CDU: 612.017
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada
Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de mestrado número 261 do PPIPA				
Data:	Vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte	Hora de início:	09h 00min	Hora de encerramento:	11h 40min
Matrícula do Discente:	11812IPA005				
Nome do Discente:	Matheus Carvalho Barbosa				
Título do Trabalho:	Avaliação e caracterização de matriz extracelular colagenosa descelularizada como implante subcutâneo em modelo murinho.				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunobiologia dos processos alérgicos, autoimunes e tumorais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Marcadores biomoleculares e vias de sinalização em processos neoplásicos				

Reuniu-se no bloco 6T Sala 6T210 Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira – CCS UFES; Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo – ICBIM UFU; Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho - (Orientador) – IBTEC UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Sr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a) agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Fernanda de Assis Araujo, Professor(a) do Magistério Superior**, em



28/02/2020, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **BRENO VALENTIM NOGUEIRA, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1851397** e o código CRC **85AA20C4**.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus pais, **Keilah, Dirceu, Neide e Silvio**, pelo apoio incondicional, incentivo e motivação. Agradeço por sempre estarem presentes em todas as etapas da minha vida, assim como foi a do desenvolvimento deste trabalho. É por vocês que busco alcançar conquistas como esta, e só foi possível alcançar tudo que tenho hoje, devido ao suporte e estabilidade que vocês me garantem.

Aos meus irmãos, **Paula, Giovana, Júlia e Victor**, pela paciência, carinho e presença neste caminho. Me inspiro em muitos de vocês, apesar de ser o mais velho, acreditando que sempre há espaço para melhorar e evoluir. Tenho muito orgulho de todos vocês. Conquistas como esta só fazem sentido se eu tiver vocês ao meu lado.

Aos meus avós, **Eni e Manoelito**, pelo carinho, dedicação e zelo. Vocês sempre incentivaram meus estudos e tiveram muito apreço por tudo o que conquistei.

Ao meu padrinho e madrinhas, **Anderson, Carol e Delma**, pela motivação, atenção, carinho e amizade. Vocês foram fundamentais em momentos decisivos da minha trajetória e ofereceram as mãos para que caminhássemos juntos em momentos difíceis para mim.

À minhas primas, **Laís e Luana**, pela amizade e por sempre participarem, apoiarem e aconselharem.

À toda família, pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador, **Luiz Ricardo**, pelo apoio, confiança e amizade. Muito obrigado por tornar este trabalho possível e por todas as oportunidades que encontrei no laboratório. Você teve participação decisiva na minha formação e capacitação quanto ao exercício da prática científica.

À minha co-orientadora, **Natássia**, por todo carinho e ensinamentos, os quais foram fundamentais para meu crescimento ao longo desta jornada. Muito além de ensinar, você foi inspiração em relação aos objetivos que busco alcançar e o tipo de profissional que busco ser. Obrigado pela amizade e por sempre estar presente.

Às amigas de equipe de trabalho, **Claudia, Roberta, Leticia Filice, Ludmilla, Rafaella, Leticia Pimentel, Sabrina, Jéssica e Paula**, obrigado pelo apoio, carinho e amizade. Graças

a vocês, posso dizer que tenho uma equipe de trabalho da qual aprecio muito fazer parte. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento de todo este trabalho.

À **Luciana e Valéria**, por todo apoio, carinho e dedicação. Graças a vocês, este e muitos outros trabalhos acontecem e se desenvolvem no laboratório.

Aos amigos do laboratório, pelo carinho, atenção e amizade.

Aos meus queridos amigos, **Katia, Caio, Juliana, Júlia, Leticia, Lara, Rafaela, Alessandra, Geovana, Guilherme, Maisa, Ciro, Larissa, Danielle, Camila, Mariana**, muito obrigado pela amizade e carinho. Nenhuma conquista vale se eu não tiver vocês do meu lado. Devo a vocês tudo o que sou e tudo o que busco ainda ser. Este trabalho foi possível, pois ao longo dele, tive vocês do meu lado. Cada um na sua maneira. Muito obrigado.

Às agências de fomento, em especial à Kheiros Pater Inovação S/A, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1. PREPARO DA MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA	14
4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA	14
4.3. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE DNA	15
4.4. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	16
4.5. QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TOTAL (ENSAIO DE HIDROXIPROLINA).....	16
4.6. IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA	17
4.7. ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO	17
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÃO	25
8. TABELAS E FIGURAS	26
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
10. ANEXOS	42

RESUMO

Devido à grande demanda pelo desenvolvimento e validação de materiais para uso em engenharia tecidual e medicina regenerativa, o presente estudo visou verificar a aplicabilidade de um novo tecido escleral suíno descelularizado, como implante subcutâneo. A esclera é um tecido conjuntivo ocular importante na sustentação e proteção de outros tecidos oculares, composto, principalmente, de água, colágeno, elastina, proteoglicanos, glicoproteínas e fibroblastos. O biomaterial foi caracterizado de acordo com sua estrutura e composição principal após o desenvolvimento de um protocolo de descelularização com intuito de remover componentes celulares, possibilitando implantação xenogênica. Extração de DNA e análise histológica foram utilizadas para acessar a eficiência do processo de descelularização, enquanto a microscopia eletrônica de varredura e quantificação de hidroxiprolina foram usadas para verificar a estrutura morfológica e principal composição do tecido, indicando quantidade de colágeno considerável. Além disso, fragmentos da matriz extracelular descelularizada resultante do protocolo foram implantados em ratos para avaliação de resposta inflamatória e comportamento do implante. Os resultados apresentaram presença de inflamação, importante para a cicatrização e neoformação de tecido, bem como fibroblastos e vasos sanguíneos no sítio do implante, sugerindo provável integração e remodelamento do tecido. Deste modo, a matriz extracelular decelularizada descrita neste trabalho exhibe potencial uso como biomaterial para os campos de engenharia tecidual e medicina regenerativa.

Palavras-chave: esclera; biomaterial; descelularização; colágeno; xenogênico; transplante

ABSTRACT

With the growing demand to develop and evaluate materials for regenerative medicine and tissue engineering, the present study aimed to verify the applicability of a new porcine decellularized scleral tissue as a subcutaneous implant. The sclera is an essential connective ocular tissue, which plays a key role in supporting the eye structure, as well as protecting nearby ocular tissues. Its main composition is of water, collagen, elastin, proteoglycans, glycoproteins and fibroblasts. The biomaterial was characterized by its structure and main composition, along with a decellularization protocol in order to remove cellular content and allow xenogeneic implantation. DNA extraction and histology proved the efficacy of the decellularization process. Scanning electron microscopy and hydroxyproline assay were used to assess the morphological structure and main composition of the tissue, indicating great collagen content. Furthermore, decellularized extracellular matrix sections were implanted in rats to evaluate the inflammatory response and behavior of the implant. Results showed presence of inflammation, playing a key role in cicatrization as well as formation of a new tissue, along with the development of fibroblastic and angionenic activities, suggesting tissue remodeling and integration. This way, the decellularized extracellular matrix may have potential to be considered as a biomaterial for tissue engineering and regenerative medicine fields.

Keywords: sclera; biomaterial; decellularization; collagen; xenogeneic; transplant

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos reportam o uso de diferentes materiais no campo da medicina regenerativa, buscando e avaliando sua aplicação na engenharia de tecidos para reparo e transplante de tecidos e/ou órgãos (HU et al., 2020; MANCINI & PENSABENE, 2019; TAN et al., 2019; VASHISTH & BELLARE, 2018). É importante que o material selecionado atenda alguns requerimentos, como propriedades químicas e mecânicas (compatibilidade molecular, alta porosidade, força mecânica adequada), bem como a biocompatibilidade (GILPIN; YANG, 2017; XU et al., 2019; JI et al., 2019; KAZIMIERCZAK et al., 2019; TAN et al., 2019; YANG et al., 2019). Esses, podem ser classificados como materiais naturais (polímeros e de matriz extracelular) ou sintéticos (metais, cerâmicas e polímeros) (RATNER, 2004).

Os biomateriais naturais podem ser polímeros, derivados de proteínas e polissacarídeos, que apresentam propriedades biodegradáveis e de biocompatibilidade, além de outras características que possibilitam mimetizar propriedades de matriz extracelular (XIA et al, 2018; ABDULGHANI & MITCHELL, 2019). Dentre os polímeros de proteínas, são conhecidos colágeno, fibrina, gelatina e seda (LEE et al., 2009), enquanto aos polímeros de polissacarídeos, ácido hialurônico, alginato e quitosano (DINJASKI & KAPLAN, 2016; SHEIKH et al., 2015). Os materiais naturais de matriz extracelular são derivados de tecidos descelularizados, nos quais as características intrínsecas do tecido de origem são mantidas, restando características únicas de micro e macroestrutura, além da composição da matriz extracelular previamente secretada pelas células removidas (ABDULGHANI & MITCHELL, 2019; TAYLOR et al., 2018).

Já os biomateriais sintéticos são fabricados com o intuito de produzir estruturas com propriedades mecânicas e físicas sofisticadas, como porosidade e rigidez, alcançando características simultâneas que nem sempre são encontradas em materiais naturais (IQBAL et al., 2018; ABDULGHANI & MITCHELL, 2019). Dentre os biomateriais sintéticos, encontra-se as cerâmicas, como as de hidroxiapatita; metálicos, como os compostos de titânio; e polímeros, como poliésteres e polietilenoglicol (CAMERON & SHAVER, 2011; DÍEZ-PASCUAL & DÍEZ-VICENTE, 2016; ABDULGHANI & MITCHELL, 2019).

O uso e seleção de biomateriais para estudos de bioengenharia envolve entender as vantagens e desvantagens, de acordo com a aplicação desejada. Deste modo, apesar de os biomateriais naturais apresentarem características que favorecem seu uso, como biocompatibilidade e biosinalizadores, estes podem exibir dificuldades quanto à resistência a modificações físicas e estruturais, além de baixa força mecânica quando comparados aos

materiais sintéticos, de forma geral. Da mesma forma, biomateriais sintéticos podem apresentar restrições quanto a capacidade de favorecer adesão celular e presença de sinalizadores biológicos, dificultando a integração destes em casos de transplante, uma vez que limitam o processo de recelularização (XU et al., 2019).

Por muito tempo, pesquisadores buscaram estabelecer biomateriais compatíveis semelhantes ao tecido de origem (BASU et al., 2019; DIOMEDE et al., 2018; VASHISTH & BELLARE, 2018; ZAMBON et al., 2018). Diferente de transplantes autólogos, o uso de biomateriais alogênicos e xenogênicos requer o emprego de técnicas que atendam a remoção de material celular e outras moléculas imunogênicas, como o lipopolissacarídeo, no intuito de evitar condições imunológicas adversas, como resposta inflamatória exacerbada e rejeição (CRAPO et al., 2011; DAS et al., 2019; DETTIN et al., 2018; LI et al., 2019; MACLEOD et al., 2005; STAHL et al., 2018). Deste modo, a descelularização é considerada um processo fundamental para o preparo de biomateriais nestas condições, fornecendo a remoção de conteúdo celular enquanto busca manter características e propriedades da matriz extracelular (DETTIN et al., 2018; KASBEKAR et al., 2018; STAHL et al., 2018; ZAMBON et al., 2018).

Em vista disso, os materiais selecionados que atendem os requisitos de biocompatibilidade e biodegradação, atuando como arcabouços constituídos de matriz para a migração e crescimento de células são denominados *scaffolds*. São estes que fornecem sustentação mecânica e permitem o tráfego de nutrientes e moléculas essenciais para a caracterização de determinado tecido (ABDULGHANI & MITCHELL, 2019).

Várias investigações trazem a caracterização e uso de biomateriais ricos em colágeno para fins de bioengenharia, como em tecidos cardiovasculares (WATANABE et al., 2010) e oculares (KASBEKAR et al., 2018; ZHANG et al., 2007). Dentre os tecidos oculares, a esclera possui propriedades relevantes para uso em medicina regenerativa, uma vez que é um material tanto rígido quanto maleável devido a presença de colágeno e elastina (BOOTE et al., 2019).

A esclera é um tecido conjuntivo resiliente e estruturalmente complexo que representa cerca de 85% da túnica externa do globo ocular, responsável por desempenhar diversas funções essenciais para a visão. Dentre estas, sua principal atividade é de oferecer substrato estável e firme para a retina, além de proteger estruturas internas do olho que são mais vulneráveis a fatores mecânicos. Outra característica importante é sua opacidade, que previne transmissão de luz excessiva, capaz de degradar a imagem da retina (BOOTE et al., 2019).

O tecido escleral é formado pela cápsula de Tenon, episclera, estroma, esclera perilimbal, esporão escleral, malha trabecular, região peripapilar e lâmina cribrosa. A cápsula de Tenon é uma camada compacta de feixes de colágeno associados a fibras de elastina localizada paralelamente à superfície da esclera. Atua como um sistema de polia na transferência de força de músculos oculares à esclera durante movimentação dos olhos (ROTH et al., 2002; BOOTE et al., 2019). A episclera, região situada abaixo da cápsula de Tenon, é uma camada densa e fina de tecido conectivo composto, principalmente, de feixes de colágeno, fibras elásticas, melanócitos e macrófagos (WATSON & YOUNG, 2004; BOOTE et al., 2019). O estroma, por sua vez, representa a principal camada do tecido escleral, sendo responsável pelas principais funções biomecânicas do tecido. Esta camada é predominantemente formada por matriz extracelular rica em colágeno (BOOTE et al., 2019).

A região perilimbal e o esporão escleral encontram-se em regiões mais profundas do estroma escleral, atuando no auxílio da manutenção do contorno da córnea ocular em locais de estresse mecânico (BOOTE et al., 2009). Já a malha trabecular é conhecida por apresentar grandes quantidades de elastina, fundamental para garantir resistência à tensão da esclera e de tecidos vizinhos (MARSHALL, 1995; UMIHIRA et al., 1994; BOOTE et al., 2019; BACHMANN et al., 2006). As regiões peripapilar e lâmina cribrosa correspondem a camadas superficiais de tecido conectivo mais próximas do nervo óptico, representando região biomecânica de interesse para casos de glaucoma (DOWNS 2015; BOOTE et al., 2019).

Com relação a sua composição, o tecido escleral é considerado um *scaffold* de fibras de colágeno conjugado a matriz interfibrilar hidratada de proteoglicanos, glicoproteínas, elastina e fibroblastos, sendo o colágeno do tipo I o mais abundante (em peso seco) (BOOTE et al., 2019). Tal constituição possibilita a atuação do tecido em garantir resistência a impactos mecânicos e suporte aos tecidos oculares.

O estudo de Costa (2009) mostrou biocompatibilidade no uso de esclera de coelho autóloga como enxerto em defeito ósseo na órbita ocular. Baseado nas possibilidades existentes no uso de tecidos xenogênicos, além de considerar melhores condições de fornecimento para transplantes, este estudo visou desenvolver um biomaterial derivado de esclera suína descellularizada e caracterizá-lo quanto a sua estrutura e composição principal, por meio de microscopia eletrônica de varredura e quantificação de colágeno com ensaio de hidroxiprolina. Além disso, este material foi implantado subcutaneamente em ratos para avaliar seu

comportamento, indicando se pesquisas derivadas deste trabalho com o tecido apresentado poderiam ser úteis para os campos de engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com a literatura, há grande relevância para estudos relacionados ao desenvolvimento de materiais que possam fornecer alternativas para tratamentos e aplicações em engenharia tecidual e medicina regenerativa. Além da dificuldade encontrada nas filas de transplantes de órgãos, existe uma grande demanda em estudos que viabilizem a regeneração e/ou substituição de tecidos e órgãos.

Deste modo, faz-se necessário a elaboração de estudos que permitam desenvolver e avaliar materiais que apresentem compatibilidade com o paciente, ainda que de diferentes fontes, uma vez que há processos que viabilizam a remoção de elementos que possam desencadear reações inflamatórias exacerbadas e/ou rejeição, como a descelularização. Esta técnica pode ser realizada de diversas formas, seja por alterações físicas, químicas e/ou enzimáticas.

Atualmente, encontram-se trabalhos que buscam avaliar melhorias nas aplicações de bioengenharia, mais especificamente, no reparo e substituição de tecidos e órgãos. Baseado nestes estudos, acredita-se que o aprofundamento e desenvolvimento de materiais, como o proposto neste estudo, bem como sua caracterização e validação de comportamento *in vivo* seja fundamental. Além de apresentar conteúdo considerável de colágeno, fator que pode indicar o uso em diferentes aplicações, o tecido escleral suíno é de obtenção acessível e geralmente descartado, corroborando à busca por alternativas aos transplantes ainda hoje realizados.

3. OBJETIVOS

O presente estudo visou desenvolver uma matriz extracelular descelularizada obtida a partir de tecido escleral suíno, bem como caracterizar sua estrutura e composição, e avaliar seu comportamento em relação à indução de resposta inflamatória em modelo murinho.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar escalonamento de protocolo de descelularização detergente-enzimático para as escleras suínas;
- Validar o processo de descelularização desenvolvido;
- Caracterizar a matriz extracelular descelularizada obtida de esclera suína quanto à morfologia e composição;
- Analisar comportamento da matriz extracelular descelularizada obtida de esclera suína enquanto implante subcutâneo em ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PREPARO DA MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA

Amostras de globo ocular de suínos ($n = 100$) foram obtidas de frigorífico que processa material exclusivamente suíno, em Minas Gerais. Imediatamente após obtenção, os olhos foram mantidos em solução salina (NaCl 0,9%) refrigerada em recipiente térmico e processados em intervalo de tempo inferior a 10 horas.

O processamento inicial consistiu na retirada de tecidos oculares adjacentes à esclera com auxílio de instrumentos cirúrgicos (pinças, bisturis, tesouras). Uma vez isoladas, as escleras foram higienizadas com solução de TBS (Tris tamponado com solução salina) e água corrente para, em seguida, serem submetidas ao protocolo de descelularização.

O protocolo de descelularização utilizado baseou-se em ensaio detergente-enzimático otimizado para o tecido escleral, cujo uso está em processo de submissão de patente e não pode ser discutido no momento. Brevemente, 100 amostras de escleras suínas inteiras processadas foram incubadas com solução salina em um biorreator (Biostat B, Biotech International), sob agitação contínua. Em seguida foi realizada a lise de células com uso de tampão hipotônico *overnight*, também sob agitação contínua. Posteriormente, as amostras foram lavadas e incubadas com tampão de nucleases, no intuito de remover ácidos nucleicos residuais. Logo após, as amostras foram novamente lavadas e esterilizadas com solução de antibiótico e antimicótico. Para verificar a eficiência do protocolo de descelularização e possíveis resíduos nucleicos, as amostras foram submetidas à análise histológica e quantificação de DNA.

4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras foram fixadas em paraformaldeído 10%, desidratadas em crescentes concentrações de etanol e incluídas em parafina. Uma vez formados os blocos de parafina, secções de 5 μm foram cortadas com micrótomo para confecção das lâminas e incubadas em estufa a 60°C, por 24 horas. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol e rehidratados em álcoois de concentrações decrescentes e, por fim, água corrente. Após hidratação, as lâminas foram submetidas a coloração com hematoxilina e eosina (HE). Finalmente, as lâminas foram montadas com lamínulas em glicerina e analisadas e fotografadas com microscópio de luz (EVOS FL Cell Imaging System, AMG Invitrogen).

Foram preparadas lâminas de diferentes regiões para representar a totalidade do tecido, tanto *in natura* como descelularizado. O tecido *in natura* foi utilizado como controle para validar as alterações observadas após o processo de descelularização.

4.3. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE DNA

A extração de DNA foi executada utilizando kit comercial (DNAeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen), sendo as amostras previamente cortadas, pesadas e processadas de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, 25 mg de tecido escleral suíno, *in natura* (n = 4) e descelularizado (n = 13), foram processados, fragmentados e acrescidos de 300 µL de buffer ATL, 20 µL de proteinase K e 20 µL de DTT 1M em microtubo. Logo após, o microtubo foi vortexado e mantido em forno para incubação overnight, a 56°C. Posteriormente, o microtubo foi novamente vortexado e acrescido de 300 µL de buffer AL e 300 µL de álcool etílico, e vortexado mais uma vez. Em seguida, a solução formada foi pipetada, alocada para uma coluna de extração e submetida a centrifugação a 8000 rpm, por um minuto. O líquido que ultrapassou a coluna foi descartado e à coluna foi acrescido 500 µL de buffer AW1, submetidos a centrifugação a 8000 rpm, por um minuto. Novamente, o líquido que atravessou a coluna foi descartado e à coluna foi adicionado 500 µL de buffer AW2, submetidos a centrifugação a 14000 rpm, por 3 minutos. Finalmente, o líquido que ultrapassou a coluna foi desprezado e a coluna foi colocada em novo microtubo, nos quais foi adicionado 100 µL de buffer AE, incubados por 1 minuto e, então, centrifugados a 8000 rpm, por um minuto, para obter a eluição do DNA. O DNA extraído foi quantificado utilizando espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) observando as três principais absorbâncias: 230, 260 e 280 nm.

Para avaliar a integridade do DNA foi realizado eletroforese em gel de agarose 1%, para amostras *in natura* (n = 4) e descelularizadas (n = 13). Deste modo, 10 µl de cada amostra de DNA extraído foi preparado com a adição de 5 µl de azul de bromofenol e 3 µl de corante GelRed 1:1000 (Biotium). As amostras preparadas e o marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, a 80 volts por 1 hora. A visualização dos resultados foi realizada em luz ultravioleta e fotografados.

4.4. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Fragmentos do tecido *in natura* e descelularizado (0,6 x 0,6 cm) foram lavados em PBS (tampão fosfato) 0,1M e posteriormente fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 20%, em proporção 1:1, tamponados com cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4) por 1 hora. Em seguida, a solução fixadora foi removida e as amostras foram submetidas a desidratação progressiva em soluções com concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 90%, 95% e 100%, intervalos de 1 hora). Após a desidratação, as amostras foram secas e armazenadas, até recebimento de 3 ciclos de cobertura de ouro-paládio em metalizador. A análise das amostras preparadas foi realizada, em triplicata e em diversas magnificações, no microscópio Zeiss EVO MA10, utilizando exposições de 5 a 15 kV.

As eletromicrografias obtidas foram utilizadas para avaliação da estrutura geral do tecido e para confirmação da ausência de células dentro do biomaterial.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TOTAL (ENSAIO DE HIDROXIPROLINA)

A quantificação de colágeno foi realizada pelo ensaio de hidroxiprolina. Brevemente, amostras descelularizadas do tecido (n = 9) contendo 10 mg foram homogeneizadas em 100 µL de água deionizada e, posteriormente, diluídas a 1:1 com HCl 12M e incubadas por 3 horas, a 120° C. Em seguida, a solução obtida foi homogeneizada com vortex e centrifugada a 10.000 x g por 3 minutos para coleta do conteúdo solúvel.

Desde conteúdo obtido, 10 µL foram adicionados em poços de uma placa de 96 poços, assim como 10 µL da curva padrão e, posteriormente, secados em forno até completa evaporação. Em seguida, 100 µL de solução de Cloramina T (Sigma) foram adicionados aos poços contendo amostras e curva padrão e, então, a placa foi submetida a incubação por 5 horas, a 25° C.

Uma vez finalizada a etapa com a solução de Cloramina T, 100 µL de reagente de Ehrlich (Sigma) foram adicionados aos poços e incubados por 90 minutos, a 60° C. A leitura da reação colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 560 nm. A quantidade de colágeno total por mg do peso seco de amostra foi calculada utilizando a razão hidroxiprolina/colágeno, que corresponde a 1:13,5.

4.6. IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA

O experimento com implantes subcutâneos foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, sob número CEUA 106/17. Dez ratos machos (*Rattus norvegicus*) pesando 300 g foram anestesiados por inalação de isoflurano e receberam injeção intraperitoneal contendo analgésico para prevenir dor após o processo cirúrgico. Os animais permaneceram sob anestesia com isoflurano durante todo o procedimento.

Após anestesia, foram realizadas tricotomia para retirada dos pelos da região dorsal, antissepsia e incisão longitudinal para implantação de fragmento de esclera descelularizada (0,5 x 0,5 x 0,2 cm). Duas incisões foram realizadas, por rato, com lâmina de bisturi nº 15 e, subsequentemente, os tecidos foram divulsionados, com auxílio de tesoura de ponta romba. Em uma das incisões, o biomaterial foi inserido e na outra, não houve introdução de nenhum material, para ser utilizada como controle. Posteriormente, o local de incisão foi suturado e a eutanásia dos animais realizada 5 e 15 dias, após a cirurgia. Deste modo, dentre os dez ratos utilizados, 5 foram eutanasiados 5 dias após da cirurgia, enquanto os outros, 15 dias após a cirurgia.

4.7. ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO

Uma vez eutanasiados, foi realizada a coleta da região circundante do implante subcutâneo para análise histológica. O material coletado foi fixado e as lâminas histológicas preparadas, conforme item 4.2.

Para verificar a resposta inflamatória resultante do procedimento de implantação subcutâneo, a análise foi executada por quatro avaliadores independentes. Os campos selecionados para análise foram determinados considerando o local de incisão e/ou presença das bordas do implante e infiltrado inflamatório. Deste modo, os campos foram avaliados de acordo com a intensidade de inflamação, bem como a presença de fibroblastos, vasos sanguíneos e células gigantes multinucleadas. Para cada parâmetro foi atribuído um score de 0 a 4, representado na Tabela 1. Esta tabela baseou-se no estudo de Macleod e colaboradores (2005).

A avaliação da intensidade de inflamação foi verificada nos tempos de 5 e 15 dias após a cirurgia. A avaliação quanto aos fibroblastos, vasos sanguíneos e células gigantes

multinucleadas foi realizada de acordo com a presença destes na região circundante do implante ou dentro deste.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos scores histométricos foram analisados com GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para as comparações das diferenças entre os scores foi utilizado teste *t* de Student não pareado para análise de intensidade de inflamação e one-way ANOVA para presença de fibroblastos, vasos sanguíneos e células gigantes multinucleadas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

O objetivo deste trabalho foi de associar um novo protocolo de descelularização desenvolvido e adaptado para o tecido em questão com a avaliação das principais características deste, como conteúdo de colágeno e organização estrutural. Além disso, foi verificado se este material, uma vez descelularizado, apresentaria potencial para induzir resposta inflamatória enquanto implante em animais imunocompetentes.

Após a descelularização, o tecido foi processado e corado em HE para análise histológica (Figura 1). Na região interna do tecido *in natura* foi observada a presença de células e seus respectivos núcleos (Figura 1A). Diferentemente, o tecido descelularizado apresentou-se ausente de núcleos celulares, confirmando que o protocolo desenvolvido foi efetivo para remoção de conteúdo celular (Figura 1B). Além da remoção de conteúdo celular, o processo possibilitou manter a presença de fibras de colágeno, apesar de o arranjo destas apresentar-se mais espaçado no tecido descelularizado quando comparado ao *in natura*.

Para verificar a eficiência do protocolo de descelularização, foram analisadas a quantificação e a integridade do DNA presente nas amostras não-descelularizadas e descelularizadas, pela medida de absorbância em espectrofotômetro e por eletroforese em gel de agarose, respectivamente. Os resultados para quantificação de DNA de amostras descelularizadas apresentaram valores inferiores a 50 ng/mg de tecido. Além disso, o perfil eletroforético das amostras descelularizadas apresentou ausência de DNA intacto (Figura 2B), diferentemente das amostras não descelularizadas, cujas bandas de DNA genômico estão evidentes (Figura 2A).

Outro parâmetro analisado foi a estrutura tridimensional do tecido, bem como a presença de fibras de colágeno e células, com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (Figura 3 e 4). De acordo com as eletromicrografias, percebeu-se que o tecido *in natura* apresenta um arranjo mais compacto das fibras de colágeno (Figura 3A), além de conter células localizadas entre as fibras (Figura 3B). Distintivamente, o tecido descelularizado apresentou ausência de células e disposição de fibras mais irregular, observando-se mais lacunas do que o tecido não-descelularizado (Figuras 4A e 4B).

Com relação ao conteúdo de colágeno presente no tecido descelularizado, foi executado ensaio de quantificação de hidroxiprolina, que apresentou concentração média de colágeno de

270,6 mg/esclera, resultado que corresponde a 736 μ g de colágeno por mg de tecido, aproximadamente (Tabela 4).

Para avaliar a resposta inflamatória resultante do processo de implantação do tecido descelularizado, campos de lâminas histológicas foram selecionados e ranqueados de acordo com o grau de intensidade de inflamação e presença de fibroblastos, vasos sanguíneos e células gigantes multinucleadas. De acordo com a análise, notou-se que o grupo controle eutanasiado 5 dias após o procedimento cirúrgico apresentou resposta inflamatória, independente da presença do implante (Figura 5). Não foi possível avaliar o grupo controle eutanasiado 15 dias após cirurgia, uma vez que o tecido havia cicatrizado e não era possível delimitar a região de incisão e divulsão do tecido. Além da presença de infiltrado inflamatório, ambos grupos de 5 (Figuras 6 e 7) e 15 (Figuras 8 e 9) dias contendo implante apresentaram aumento na quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e células gigante multinucleadas. De acordo com a imagem representativa do grupo de implante 5 dias pós-cirurgia, percebe-se maior número de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos, principalmente na área que circunda o implante, além de apresentar uma pequena migração de células para dentro do implante (Figura 7). Já no grupo de implante 15 dias pós-cirurgia, a presença destes elementos não se restringiu ao entorno e superfícies do implante, observando-se migração interna em maior escala. Ainda neste grupo, verificou-se que as bordas do implante não estão mais bem delimitadas, indicando degradação do material e, possivelmente, remodelamento e integração do tecido (Figura 9).

Baseado nos scores obtidos, notou-se diferença significativa na intensidade da inflamação, sendo maior no grupo de implante 5 dias pós-cirurgia quando comparado ao seu respectivo controle (** $P = 0,0027$) (Figura 10A). Com relação a presença de fibroblastos, observou-se diferença significativa entre os grupos implantados de 5 e 15 dias, sendo maior no grupo de 15 dias (***) $P = 0,0006$) (Figura 10B). Já em comparação a presença de vasos sanguíneos, não houve diferença significativa entre os grupos implantados, mas constatou-se diferença significativa entre o grupo de implante 5 dias e seu respectivo controle (* $P = 0,028$) (Figura 10C). Quanto à presença de células gigantes multinucleadas, não houve diferença significativa nos grupos implantados, nem entre si nem quando comparados ao controle (Figura 10D).

6. DISCUSSÃO

Uma quantidade considerável de biomateriais vem sendo empregados em diferentes estudos, como no intuito de desenvolver reparo ou substituição de tecidos e órgãos (ALBERTI & XU, 2016; DHAYANI et al., 2019; FRANCIS et al., 2019; LEVINSON et al., 2019; ZOU et al., 2019). É fundamental que o desenvolvimento destes biomateriais possa melhorar as condições e fornecer mais alternativas para o campo da medicina regenerativa, considerando a necessidade por substituição de tecidos e/ou órgãos, além da emergência e dificuldade observadas nas filas de transplante. Deste modo, o processamento destes biomateriais deve garantir que estes irão manter as características pelas quais foram selecionados, atingindo o objetivo quando transplantado no paciente, além de confirmar a compatibilidade, para que seu uso não provoque respostas imunológicas adversas, toxicidade ou rejeição.

Muitos estudos mencionam que o uso de biomateriais de origem alogênica ou xenogênica requerem descelularização, no intuito de remover conteúdo celular, evitando assim o risco de rejeição e atividade imunogênica, como produção de citocinas pró-inflamatórias e remodelamento prejudicial (BARRETO et al., 2019; BROWE et al., 2019; DAS et al., 2019; HE et al., 2019; KASBEKAR et al., 2018; SAFARI et al., 2019; SHIN et al., 2018; YAO et al., 2019). De acordo com Crapo, Gilbert e Badylak (2011), é importante que o processo de descelularização garanta um produto final com quantidades de DNA inferiores a 50 ng/mg de tecido para evitar rejeição. Além disso, considerando que os biomateriais são geralmente selecionados de acordo com as propriedades apresentadas, espera-se que a descelularização não afete a preservação dos componentes não-celulares e propriedades intrínsecas do tecido, possibilitando manter as características da matriz extracelular nativa.

Os dados advindos da análise histológica e eletromicrografias da microscopia - de varredura mostraram, de modo generalizado, que a estrutura da matriz extracelular foi preservada, apesar de haver um maior espaçamento entre as fibras de colágeno nas amostras descelularizadas, fato que pode estar relacionado com o uso de tampão hipotônico durante o processamento, além do espaço que antes era ocupado por células, que após a descelularização foram removidas, deixando lacunas na disposição das fibras. A ocorrência da formação destas lacunas pode favorecer a migração e adesão de novas células, fator importante em transplantes, pois possibilita rescelularização da matriz extracelular e, conseqüentemente, o remodelamento e integração desta (FREEMAN et al., 2019; MURPHY et al., 2019). Além da organização do

tecido, esses resultados mostraram a ausência de células nas amostras descelularizadas analisadas, reafirmando os dados da extração e quantificação de DNA.

O uso de biomateriais com quantidades consideráveis de colágeno é amplamente estudado e aplicado na bioengenharia e medicina regenerativa, uma vez que esta proteína representa um dos principais constituintes da matriz extracelular, fornecendo força mecânica (DAS et al., 2019), além de executar papel importante em diferentes mecanismos bioquímicos, como diferenciação condrogênica (CHEN et al., 2005), manutenção da viabilidade celular e regulação do perfil fenotípico de células (HANSEN; WILHELM; FASSETT, 2005; WANG et al., 2016). O ensaio de quantificação de hidroxiprolina apresentou que o tecido escleral apresenta quantidade considerável de colágeno após a descelularização, equivalente a 73,6% da composição do tecido descelularizado. Deste modo, a esclera descelularizada pode ser considerada um biomaterial promissor, uma vez que possui concentração considerável de um componente essencial da matriz extracelular.

Os resultados discutidos acima, tanto referente a estrutura quanto a composição do tecido indicam que a esclera descelularizada possa ser adequada para análises posteriores que a considerem como candidata para substituição de tecidos. Assim, buscou-se analisar o comportamento do tecido descelularizado enquanto implante subcutâneo em um modelo murino e avaliar a atividade inflamatória induzida pela incisão do processo cirúrgico e/ou presença do implante. Não foram detectadas evidências notáveis de respostas adversas que pudessem desencadear rejeição, mas foi detectado processo inflamatório que é uma resposta natural à implantação/lesão tecidual (MACLEOD et al., 2005). Com relação a intensidade do infiltrado inflamatório observado entre o grupo implantado de 5 dias e seu respectivo controle, apesar de apresentar diferença significativa, deve ser considerado que parte da resposta inflamatória observada foi provavelmente induzida pela lesão realizada durante o processo cirúrgico. Outros estudos com *scaffolds* também apresentam resposta inflamatória, de forma semelhante (ALBERTI & XU, 2016; GARCÍA-HONDUVILLA et al., 2018; MACLEOD et al., 2005).

Além da presença de células inflamatórias, foi observado um número considerável de fibroblastos e vasos sanguíneos, não apenas no entorno do implante, mas também na região interna deste. Alguns estudos apontam a alocação e migração de fibroblastos em conjunto com angiogênese em experimentos com implantes subcutâneos (GARCÍA-HONDUVILLA et al., 2018; KORZINSKAS et al., 2018; MACLEOD et al., 2005), o que confirma os achados deste

trabalho. Estes resultados podem indicar que houve remodelamento do tecido induzido pelo hospedeiro, viabilizando a integração ao tecido. Além disso, a presença de fibroblastos apresentou-se maior no grupo implantado de 15 dias, indicando que a migração de fibroblastos e, conseqüentemente, sua ação no remodelamento do implante é um mecanismo progressivo. A angiogênese é, também, fundamental, pois auxilia no processo de integração do implante, uma vez que os vasos sanguíneos oferecem nutrientes essenciais para a manutenção das células, possibilitando a migração de células e a recelularização do implante (GARCÍA-HONDUVILLA et al., 2018). Deste modo, o grupo implantado de 5 dias apresentou maior número de vasos quando comparado ao controle, corroborando com a importância da angiogênese para o mecanismo de remodelamento tecidual.

A integração de um biomaterial ocorre quando o organismo detecta um corpo estranho, desencadeando um processo de degradação, que leva a formação de um novo tecido. Isto ocorre quando diversas células migram pelos poros do material e iniciam a produção de nova matriz extracelular (GARCÍA-HONDUVILLA et al., 2018). Este trabalho apresentou, não apenas a migração de fibroblastos, mas também a degradação das bordas do implante, o que implica na degradação do material e, possivelmente, sua integração ao organismo.

A recelularização do material descelularizado por fibroblastos, poderia indicar neoformação de tecido, uma vez que estas células são responsáveis pela síntese e deposição de diversos componentes de matriz extracelular, além de atuar diretamente em processos de cicatrização, mantendo a integridade do tecido conjuntivo e induzindo angiogênese (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Além disso, este tipo celular está sujeito a mudanças provocadas por fatores mecânicos em determinadas situações fisiológicas, possibilitando que atuem no rearranjo de fibras colágenas, como em casos de formação de tecido de granulação. Dentre os componentes sintetizados pelos fibroblastos, encontra-se colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteases e fibronectina (PAGNANO et al., 2008).

A presença de células gigantes multinucleadas, principalmente no grupo implantado de 15 dias poderia ser considerada uma situação adversa, uma vez que estas células podem causar lesões e/ou reagir com o implante, provocando a formação de catabólicos tóxicos (MACLEOD et al., 2005), mas de acordo com o score observou-se que a presença destas foi ocasional. Embora sejam associadas a casos prejudiciais, os estudos de García-Honduvilla e colegas (2018), Hernandez-Pando e colegas (2000), Ghanaati e colegas (2010), e McNally e colegas (2005) apresentaram que as células gigantes multinucleadas estão envolvidas em reações com

corpos estranhos, exibindo atividade fagocítica e de produção de citocinas, fato que possibilita interações célula-célula e célula-matriz e ajuda na degradação, integração ao tecido e/ou isolamento do material.

Os resultados obtidos, em conjunto, indicam que a esclera suína descelularizada poderia ser considerada um biomaterial para uso nos campos de engenharia tecidual e medicina regenerativa, em diversos cenários.

7. CONCLUSÃO

A síntese da análise dos dados deste trabalho permitiu concluir que:

- O processo de descelularização desenvolvido e otimizado pelo grupo de trabalho alcançou os objetivos esperados, levando a remoção de componentes celulares do tecido, resultando em um biomaterial composto de matriz extracelular descelularizada, rico em colágeno;
- A estrutura morfológica do tecido escleral é compasta, principalmente por redes de fibras colágenas as quais podem mudar a conformação espacial, uma vez submetido ao processamento de descelularização;
- Aparentemente, o biomaterial descelularizado quando submetido à implantação subcutânea em ratos não induziu quadro inflamatório exacerbado ou rejeição;
- A presença do biomaterial descelularizado no organismo de ratos induziu proliferação e migração de fibroblastos, bem como induziu angiogênese na região do implante subcutâneo;
- A matriz extracelular descelularizada derivada de esclera suína pode ser considerada um biomaterial promissor para diversas aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, com relação à substituição e/ou reparo de tecidos.

8. TABELAS E FIGURAS

Score	Avaliação
0	Ausente
1	Raro e fraco
2	Ocasional e atenuado
3	Frequente e focado
4	Frequente e intenso (difuso)

Tabela 1. Score histométrico para avaliação dos parâmetros observados (intensidade de inflamação, presença de fibroblastos, vasos sanguíneos e células gigantes multinucleadas) baseado no trabalho de Macleod e colaboradores (2005).

Amostras	Quantificação de DNA (ng/mg de tecido)	A _{260/280}	A _{260/230}
1	319.2	1.83	1.52
2	366.3	1.87	1.74
3	83.0	1.83	1.09
4	120.6	1.84	0.85

Tabela 2. Quantificação do DNA extraído de amostras não-decelularizadas e razões A_{260/280} e A_{260/230}.

Amostras	Quantificação de DNA (ng/mg de tecido)	A _{260/280}	A _{260/230}
1	18.6	2.67	0.46
2	25.6	1.75	0.83
3	27.1	1.69	1.15
4	28.7	1.78	1.39
5	26.0	2.07	0.46
6	21.9	2.10	1.59
7	17.0	2.53	1.47
8	14.1	2.48	1.17
9	19.3	1.86	1.82
10	33.2	1.61	0.84
11	15.3	2.36	1.82
12	23.1	1.68	0.96
13	14.3	1.74	0.86

Tabela 3. Quantificação do DNA extraído de amostras decelularizadas e razões A_{260/280} e A_{260/230}.

Amostra	Quantificação de colágeno (µg/mg de tecido)
1	631
2	705
3	780
4	747
5	862
6	763
7	488
8	818
9	832
Média	736

Tabela 4. Representação da média de quantificação de colágeno de amostras decelularizadas obtidas pelo ensaio de hidroxiprolina.

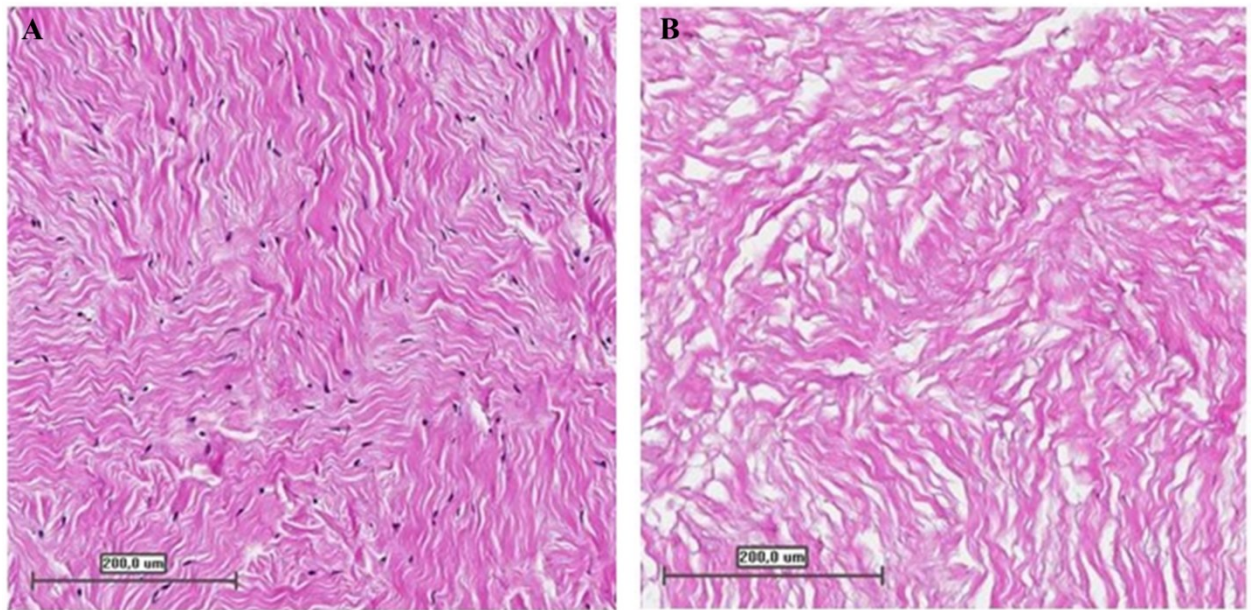


Figura 1. Imagens representativas de cortes histológicos de esclera suína corados com HE. **A.** Tecido nativo (não-descelularizado). **B.** Tecido descelularizado (matriz extracelular descelularizada).

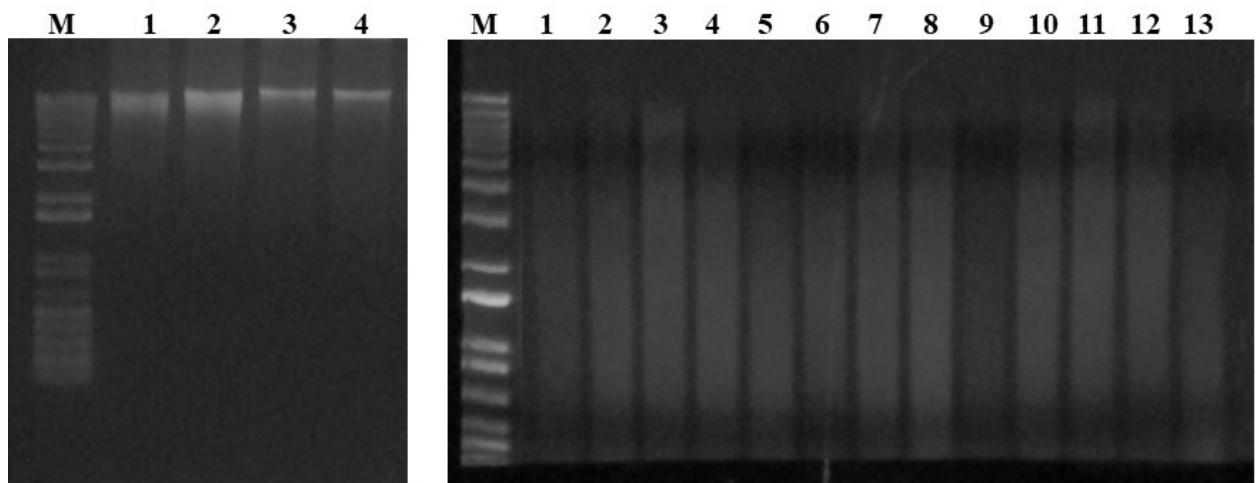


Figura 2. Gel de agarose 1% obtido de eletroforese com extratos de DNA de amostras de esclera suína. **A.** Eletroforese de extratos de DNA de amostras não-descelularizadas (1-4), mostrando DNA genômico íntegro. **B.** Eletroforese de extratos de DNA de amostras descelularizadas (1-13), mostrando DNA degradado. **M:** 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen.

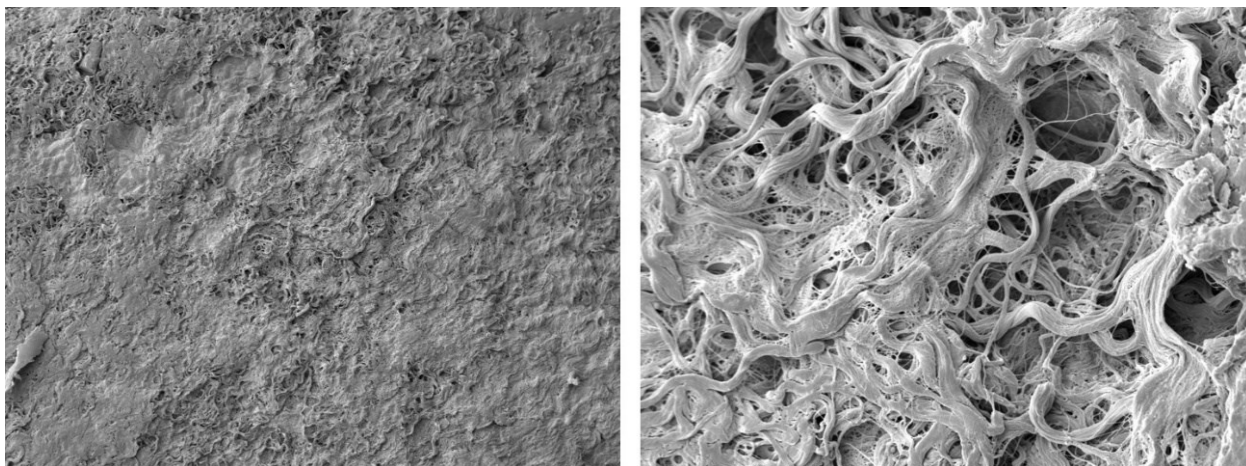


Figura 3. Imagens representativas de eletromicrografia da estrutura morfológica do tecido escleral suíno nativo (não-desclerularizado). **A.** Visão superficial do tecido (magnificação x500). **B.** Rede de fibras de colágeno, seta vermelha indicando presença de célula (magnificação x2900).

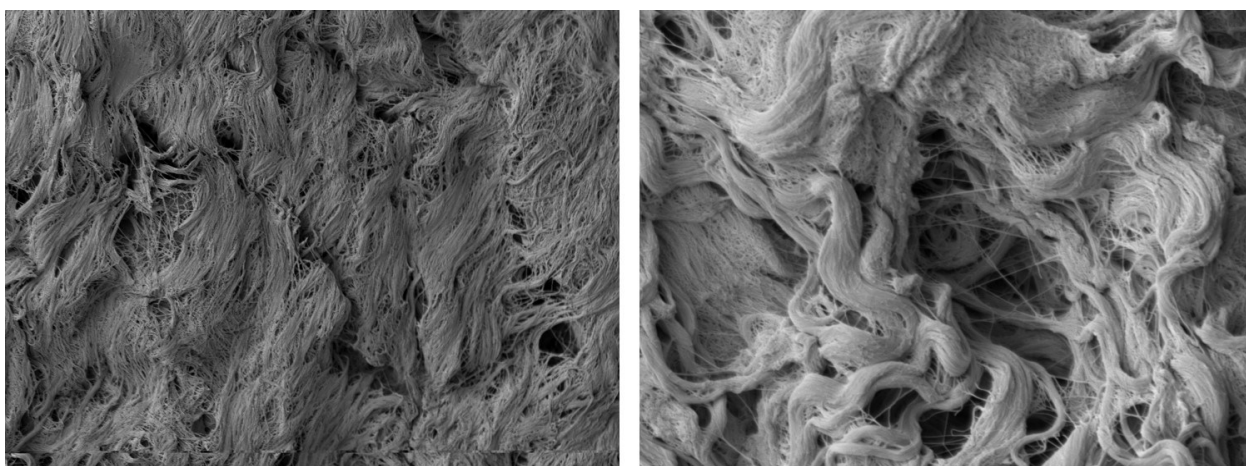


Figura 4. Imagens representativas de eletromicrografia da estrutura morfológica do tecido escleral suíno desclerularizado. **A.** Rede de fibras de colágeno, em menor aumento (magnificação x923). **B.** Rede de fibras de colágeno, em aumento superior, sem presença de células (magnificação x5520).

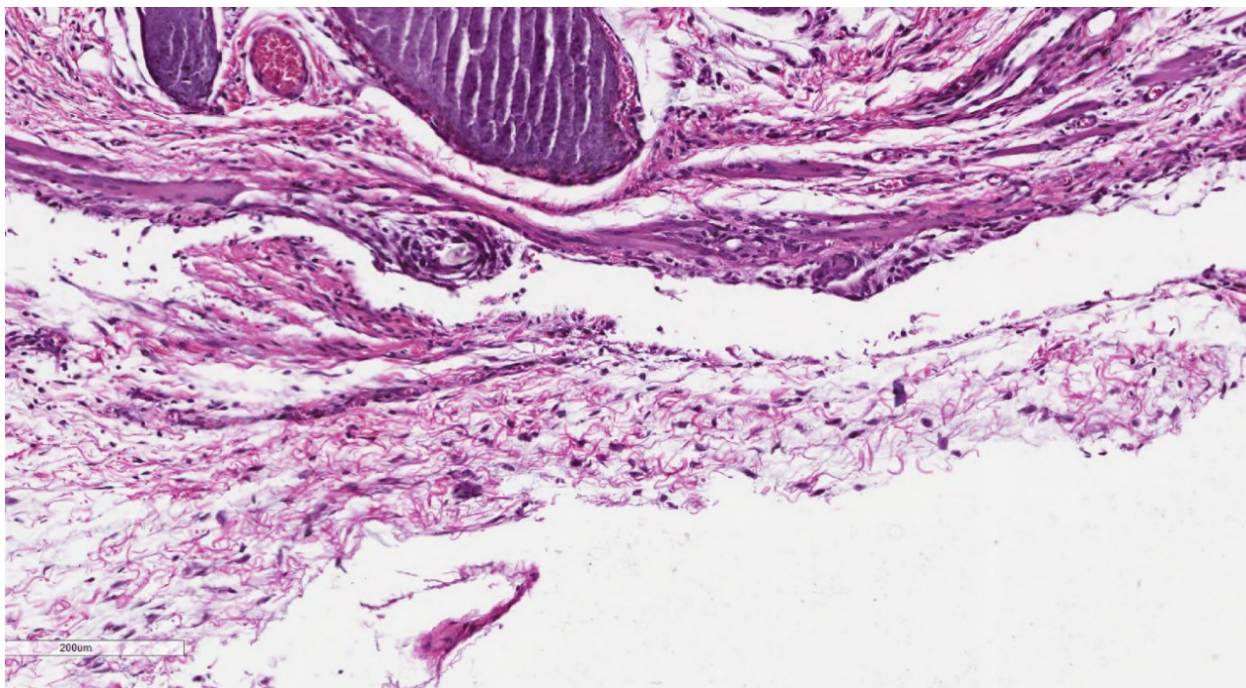


Figura 5. Imagem representativa de corte histológico corado em HE da região de divulsão dos tecidos em rato. Grupo controle, ausente de implante.

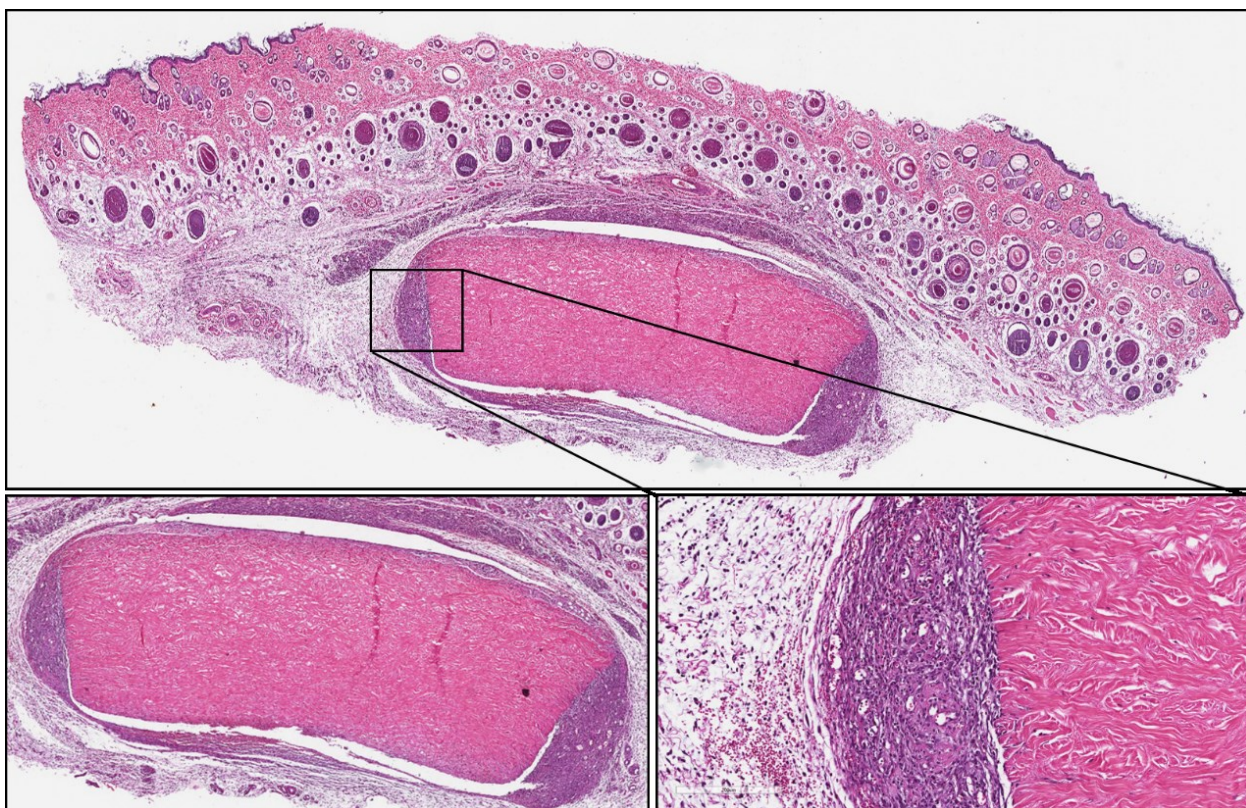


Figura 6. Imagens representativas de corte histológico corado em HE da região inserção do implante subcutâneo em rato. O inserto em preto evidencia a seleção de um dos campos analisados para verificação dos scores, mostrando a área de contato entre infiltrado inflamatório e biomaterial. Grupo implantado e eutanasiado 5 dias pós-cirurgia.

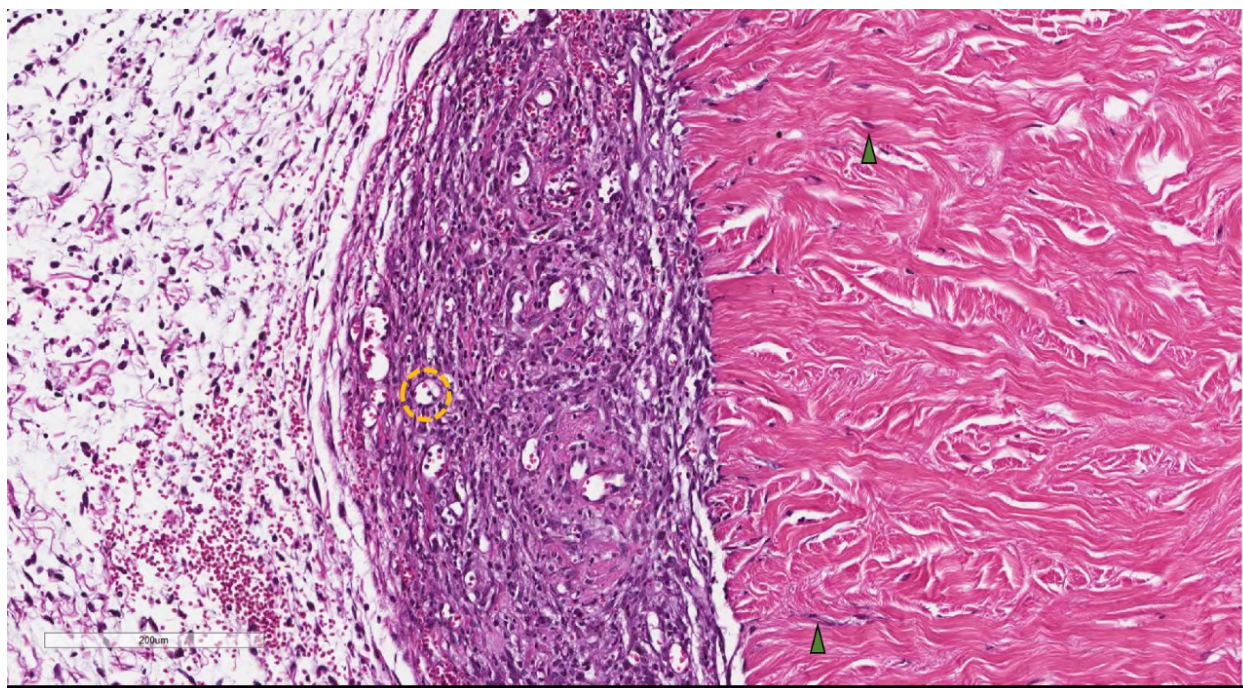


Figura 7. Imagem representativa de campo selecionado para avaliação de scores de corte histológico corado em HE da região inserção do implante subcutâneo em rato. Observa-se o implante à direita, sendo que as pontas de setas em verde representam fibroblastos que adentraram o interior do biomaterial e o círculo pontilhado em amarelo representa um vaso sanguíneo. Grupo implantado e eutanasiado 5 dias pós-cirurgia.

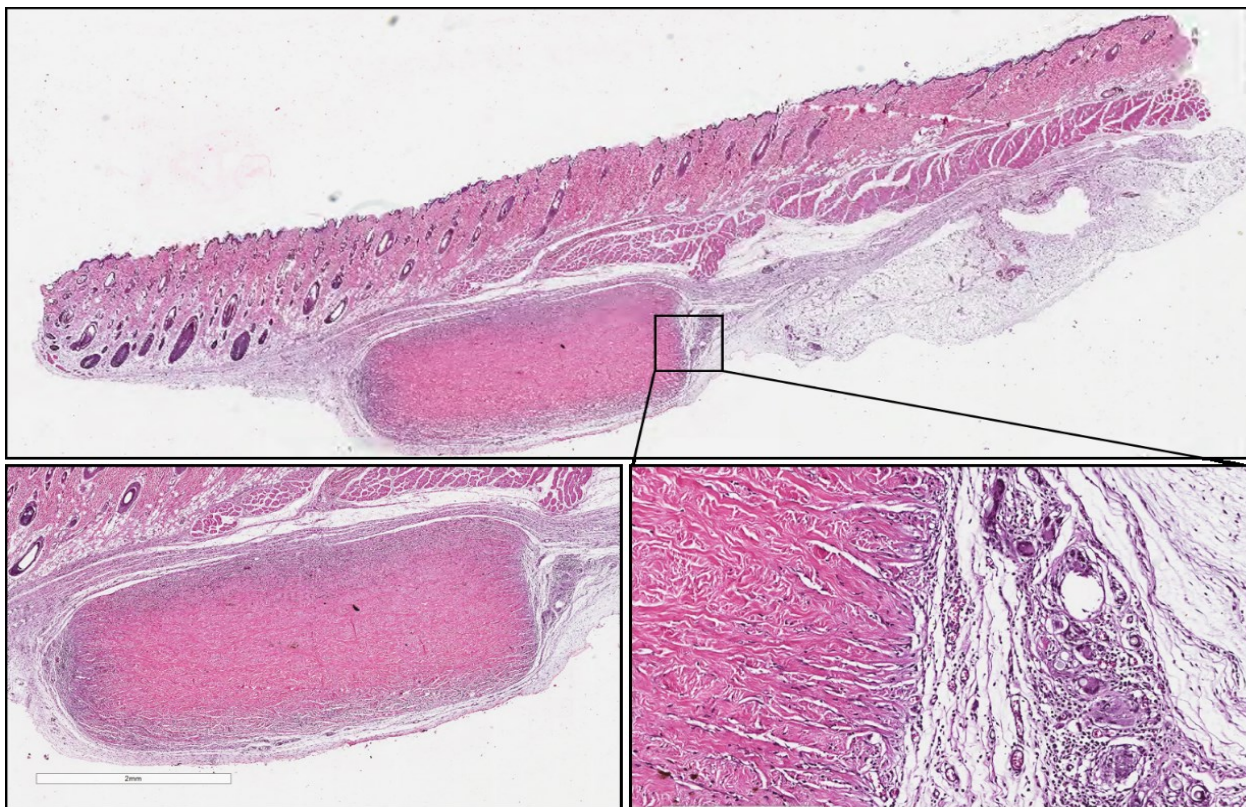


Figura 8. Imagens representativas de corte histológico corado em HE da região inserção do implante subcutâneo em rato. O inserto em preto evidencia a seleção de um dos campos analisados para verificação dos scores, mostrando a área de contato entre infiltrado inflamatório e biomaterial. Grupo implantado e eutanasiado 15 dias pós-cirurgia.

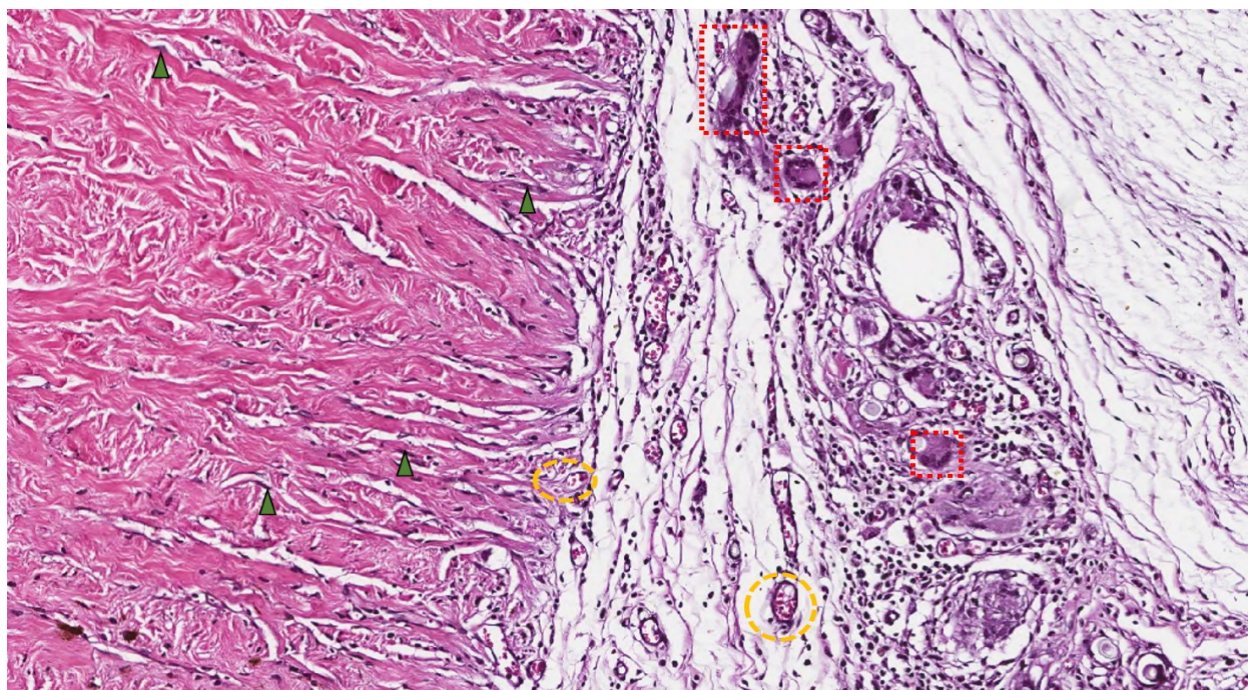


Figura 9. Imagem representativa de campo selecionado para avaliação de scores de corte histológico corado em HE da região inserção do implante subcutâneo em rato. Observa-se o implante à esquerda, sendo que as pontas de setas em verde representam fibroblastos que adentraram o interior do biomaterial; os círculos pontilhados em amarelo representam vasos sanguíneos e os retângulos pontilhados em vermelho, células gigantes multinucleadas. Grupo implantado e eutanasiado 15 dias pós-cirurgia.

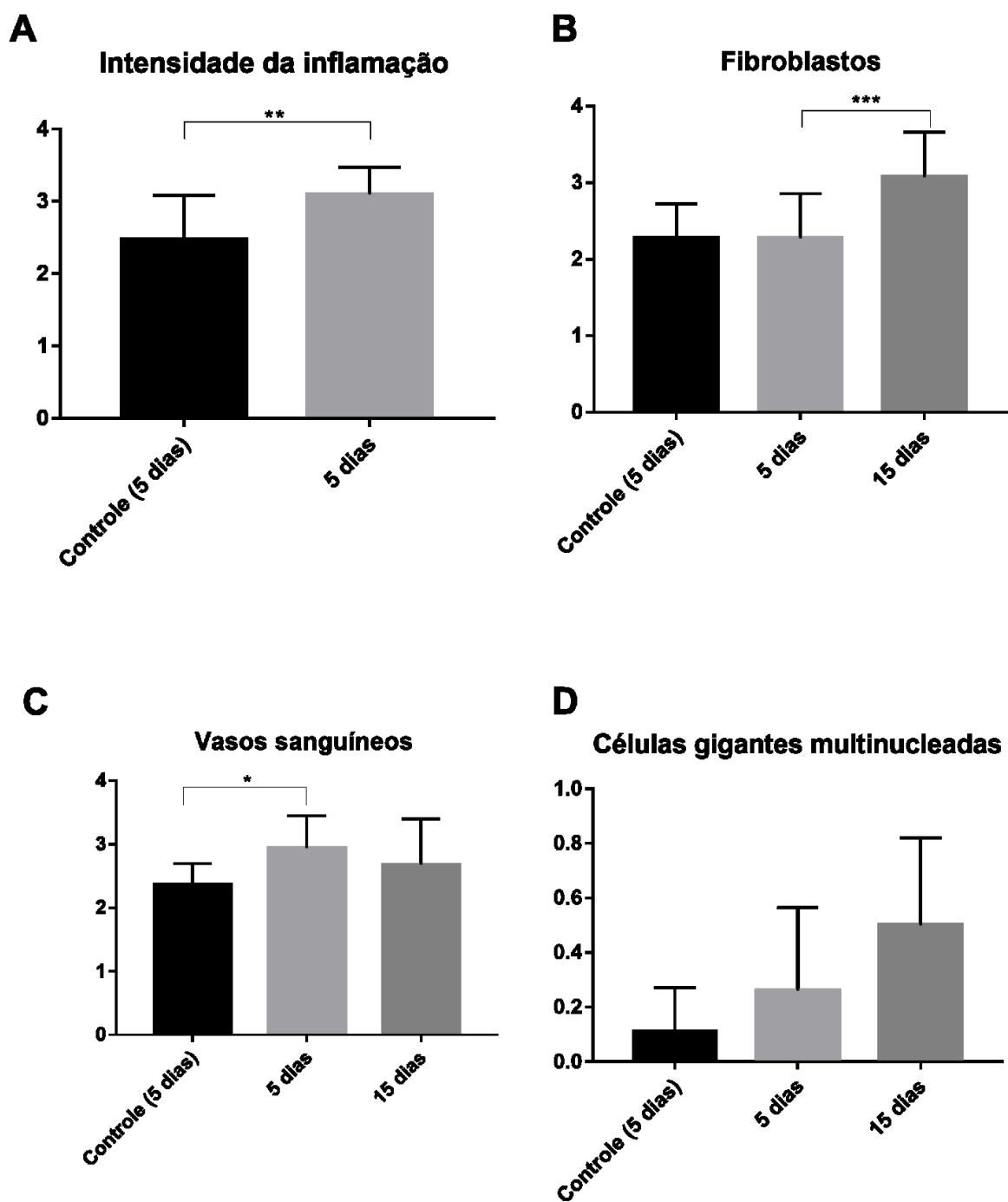


Figura 10. Gráficos representativos das médias dos scores obtidos referentes aos parâmetros inflamatórios analisados. **A.** Intensidade da inflamação observada entre o grupo implantado eutanasiado 5 dias após cirurgia e seu respectivo controle (** $P = 0,0027$). **B.** Presença de fibroblastos observada entre os grupos implantados e o controle (***) $P = 0,0006$). **C.** Presença de vasos sanguíneos observada entre os grupos implantados e o controle (* $P = 0,028$). **D.** Presença de células gigantes multinucleadas observada entre os grupos implantados e o controle.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULGHANI, S.; MITCHELL, G. R. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 750, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9110750>
- ALBERTI, K. A.; XU, Q. Biocompatibility and degradation of tendon-derived scaffolds. **Regenerative Biomaterials**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2016. <https://doi.org/10.1093/rb/rbv023>
- BACHMANN, B.; BIRKE, M.; KOOK, D.; *et al.* Ultrastructural and Biochemical Evaluation of the Porcine Anterior Chamber Perfusion Model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 2011, 2006. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1393>
- BARRETO, R. S. N.; ROMAGNOLLI, P.; FRATINI, P.; *et al.* Mouse placental scaffolds: a three-dimensional environment model for recellularization. **Journal of Tissue Engineering**, v. 10, p. 204173141986796, 2019. <https://doi.org/10.1177/2041731419867962>
- BASU, P.; SAHA, N.; ALEXANDROVA, R.; *et al.* Calcium Phosphate Incorporated Bacterial Cellulose-Polyvinylpyrrolidone Based Hydrogel Scaffold: Structural Property and Cell Viability Study for Bone Regeneration Application. **Polymers**, v. 11, n. 11, 2019. <https://doi.org/10.3390/polym11111821>
- BOOTE, C.; SIGAL, I. A.; GRYTZ, R.; *et al.* Scleral structure and biomechanics. **Progress in Retinal and Eye Research**, p. 100773, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100773>
- BROWE, D. C.; MAHON, O. R.; DÍAZ-PAYNO, P. J.; *et al.* Glyoxal cross-linking of solubilized extracellular matrix to produce highly porous, elastic, and chondro-permissive scaffolds for orthopedic tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 107, n. 10, p. 2222–2234, 2019. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36731>
- CAMERON, D. J. A.; SHAVER, M. P. Aliphatic polyester polymer stars: synthesis, properties and applications in biomedicine and nanotechnology. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, n. 3, p. 1761–1776, 2011. <https://doi.org/10.1039/C0CS00091D>
- CHEN, C. W.; TSAI, Y. H.; DENG, W. P.; *et al.* Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 2, p. 446–453, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.09.002>
- COSTA, J. M. C. Análise histológica comparativa da biocompatibilidade de enxertos realizados com esclera homóloga ou silicone em defeitos ósseos produzidos no rebordo inferior da órbita de coelhos, segundo critérios da FDI. 2009.

- CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
- DAS, P.; RAJESH, K.; LALZAWMLIANA, V.; *et al.* Development and Characterization of Acellular Caprine Choncal Cartilage Matrix for Tissue Engineering Applications. **Cartilage**, p. 1947603519855769, 2019. <https://doi.org/10.1177/1947603519855769>
- DETTIN, M.; ZAMUNER, A.; NASO, F.; *et al.* Corrigendum to “Natural Scaffolds for Regenerative Medicine: Direct Determination of Detergents Entrapped in Decellularized Heart Valves”. **BioMed research international**, 2017/06/06. v. 2018, p. 2340875, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2340875>
- DHAYANI, A.; KALITA, S.; MAHATO, M.; *et al.* Biomaterials for topical and transdermal drug delivery in reconstructive transplantation. **Nanomedicine**, v. 14, n. 20, p. 2713–2733, 2019. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0137>
- DÍEZ-PASCUAL, A. M.; DÍEZ-VICENTE, A. L. Poly(propylene fumarate)/Polyethylene Glycol-Modified Graphene Oxide Nanocomposites for Tissue Engineering. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 28, p. 17902–17914, 2016. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b05635>
- DINJASKI, N.; KAPLAN, D. L. Recombinant protein blends: silk beyond natural design. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 39, p. 1–7, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.002>
- DIOMEDE, F.; GUGLIANDOLO, A.; CARDELLI, P.; *et al.* Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: A new tool for bone defect repair. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 104, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0850-0>
- DOWNS, J. C. Optic nerve head biomechanics in aging and disease. **Experimental Eye Research**, v. 133, p. 19–29, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.011>
- FRANCIS, N.; ZHAO, N.; CALVELLI, H. R.; *et al.* Peptide-based scaffolds for the culture and transplantation of human dopaminergic neurons. **Tissue Engineering Part A**, 2019.
- FREEMAN F.; *et al.* Biofabrication of multiscale bone extracellular matrix scaffolds for bone tissue engineering. **European cells & materials**, v. 38, p. 168–187, 2019. <https://doi.org/10.22203/eCM.v038a12>
- FREEMAN, S.; RAMOS, R.; CHANDO, P. A.; *et al.* A bioink blend for rotary 3D bioprinting tissue engineered small-diameter vascular constructs. **Acta Biomaterialia**, v. 95, p. 152–164, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.052>
- GARCÍA-HONDUVILLA, N.; COCA, A.; ORTEGA, M. A.; *et al.* Improved connective integration of a degradable 3D-nano-apatite/agarose scaffold subcutaneously implanted in a rat model. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 33, n. 5, p. 741–752, 2018. <https://doi.org/10.1177/0885328218810084>

- GHANAATI, S.; ORTH, C.; BARBECK, M.; *et al.* Histological and histomorphometrical analysis of a silica matrix embedded nanocrystalline hydroxyapatite bone substitute using the subcutaneous implantation model in Wistar rats. **Biomedical Materials**, v. 5, n. 3, p. 035005, 2010. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/5/3/035005>
- GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>
- HANSEN, L. K.; WILHELM, J.; FASSETT, J. T. Regulation of Hepatocyte Cell Cycle Progression and Differentiation by Type I Collagen Structure. *In: Current Topics in Developmental Biology*. [s.l.: s.n.], 2005, v. 72, p. 205–236. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)72004-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)72004-4)
- HE, J.; LI, Z.; YU, T.; *et al.* Preparation and evaluation of acellular sheep periosteal for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 108, n. 1, p. 19–29, 2019. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36787>
- HERNANDEZ-PANDO, R.; BORNSTEIN, Q. L.; LEON, D. A.; *et al.* Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. **Immunology**, v. 100, n. 3, p. 352–358, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00025.x>
- HU, W.; LI, Q.; LI, B.; *et al.* Optogenetics sheds new light on tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 227, p. 119546, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119546>
- IQBAL, N.; KHAN, A. S.; ASIF, A.; *et al.* Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review. **International Materials Reviews**, v. 64, n. 2, p. 91–126, 2019. <https://doi.org/10.1080/09506608.2018.1460943>
- JL, C.; BI, L.; LI, J.; *et al.* Salvianolic Acid B-Loaded Chitosan/hydroxyapatite Scaffolds Promotes The Repair Of Segmental Bone Defect By Angiogenesis And Osteogenesis. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 8271–8284, 2019. <https://doi.org/10.2147/IJN.S219105>
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica – texto/atlas**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.
- KASBEKAR, S.; KAYE, S. B.; WILLIAMS, R. L.; *et al.* Development of decellularized conjunctiva as a substrate for the ex vivo expansion of conjunctival epithelium. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 2, p. e973–e982, 2018. <https://doi.org/10.1002/term.2419>
- KAZIMIERCZAK, P.; BENKO, A.; NOCUN, M.; *et al.* Novel chitosan/agarose/hydroxyapatite nanocomposite scaffold for bone tissue engineering applications: comprehensive evaluation of

biocompatibility and osteoinductivity with the use of osteoblasts and mesenchymal stem cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 6615–6630, 2019. <https://doi.org/10.2147/IJN.S217245>

KORZINSKAS, T.; JUNG, O.; SMEETS, R.; *et al.* In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 2952, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19102952>

LEE, K. Y.; JEONG, L.; KANG, Y. O.; *et al.* Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 12, p. 1020–1032, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.006>

LEVINSON, C.; CAVALLI, E.; SINDI, D. M.; *et al.* Chondrocytes From Device-Minced Articular Cartilage Show Potent Outgrowth Into Fibrin and Collagen Hydrogels. **Orthopaedic Journal of Sports Medicine**, v. 7, n. 9, p. 232596711986761, 2019. <https://doi.org/10.1177/2325967119867618>

LI, Y.; XU, Y.; LIU, Y.; *et al.* Decellularized cartilage matrix scaffolds with laser-machined micropores for cartilage regeneration and articular cartilage repair. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110139, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110139>

MACLEOD, T. M.; WILLIAMS, G.; SANDERS, R.; *et al.* Histological evaluation of Permacol as a subcutaneous implant over a 20-week period in the rat model. **British journal of plastic surgery**, v. 58, n. 4, p. 518–32, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2004.12.012>

MANAVITEHRANI, I.; LE, T. Y. L.; DALY, S.; *et al.* Formation of porous biodegradable scaffolds based on poly(propylene carbonate) using gas foaming technology. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 824–830, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.088>

MANCINI, V.; PENSABENE, V. Organs-On-Chip Models of the Female Reproductive System. **Bioengineering**, v. 6, n. 4, p. 103, 2019. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6040103>

MARSHALL, G. E. Human scleral elastic system: an immunoelectron microscopic study. **British Journal of Ophthalmology**, v. 79, n. 1, p. 57–64, 1995. <https://doi.org/10.1136/bjo.79.1.57>

MCNALLY, A. K.; ANDERSON, J. M. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. **Experimental and molecular pathology**, v. 79, n. 2, p. 126–35, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.06.008>

MURPHY, A. R.; HAYNES, J. M.; LASLETT, A. L.; *et al.* Three-dimensional differentiation of human pluripotent stem cell-derived neural precursor cells using tailored porous polymer scaffolds. **Acta Biomaterialia**, 2019. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3436429>

PAGNANO, L. O.; BARALDI-ARTONI, S. M.; PACHECO, M. R.; *et al.* Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com

calêndula. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1662–1666, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000600026>

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine**. 2 ed. **Elsevier Academic Press**, 2004.

ROTH, A.; MÜHLENDYCK, H.; DE GOTTRAU, P. H. [The function of Tenon's capsule revisited]. **Journal francais d'ophtalmologie**, v. 25, n. 9, p. 968–76, 2002.

SAFARI, F.; FANI, N.; EGLIN, D.; *et al.* Human umbilical cord-derived scaffolds for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, p. jbm.a.36698, 2019. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36698>

SHEIKH, Z.; NAJEEB, S.; KHURSHID, Z.; *et al.* Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 5744–5794, 2015. <https://doi.org/10.3390/ma8095273>

SHIN, S-C.; PARK, H. Y.; SHIN, N.; *et al.* Evaluation of decellularized xenogenic porcine auricular cartilage as a novel biocompatible filler. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 7, p. 2708–2715, 2018. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34088>

STAHL, E. C.; BONVILLAIN, R. W.; SKILLEN, C. D.; *et al.* Evaluation of the host immune response to decellularized lung scaffolds derived from α -Gal knockout pigs in a non-human primate model. **Biomaterials**, v. 187, p. 93–104, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.038>

TAN, Y.; LANDFORD, W. N.; GARZA, M.; *et al.* Complete Human Penile Scaffold for Composite Tissue Engineering: Organ Decellularization and Characterization. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16368, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51794-6>

TAYLOR, D. A.; SAMPAIO, L. C.; FERDOUS, Z.; *et al.* Decellularized matrices in regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, v. 74, p. 74–89, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.044>

UMIHIRA, J.; NAGATA, S.; NOHARA, M.; *et al.* Localization of elastin in the normal and glaucomatous human trabecular meshwork. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 35, n. 2, p. 486–94, 1994.

VALAINIS, D.; DONDL, P.; FOEHR, P.; *et al.* Integrated additive design and manufacturing approach for the bioengineering of bone scaffolds for favorable mechanical and biological properties. **Biomedical Materials**, v. 14, n. 6, p. 065002, 2019. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab38c6>

VASHISTH, P.; BELLARE, J. R. Development of hybrid scaffold with biomimetic 3D architecture for bone regeneration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 4, p. 1325–1336, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.03.011>

- WANG, Y.; KIM, M. H.; SHIRAHAMA, H.; *et al.* ECM proteins in a microporous scaffold influence hepatocyte morphology, function, and gene expression. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37427, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep37427>
- WATANABE, T.; KANDA, K.; ISHIBASHI-UEDA, H.; *et al.* Autologous small-caliber vascular grafts with argatroban loading: A histomorphological examination after implantation to rabbits. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 92B, n. 1, p. 236–242, 2010. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31510>
- WATSON, P. G.; YOUNG, R. D. Scleral structure, organisation and disease. A review. **Experimental Eye Research**, v. 78, n. 3, p. 609–623, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00212-4)
- XIA, H.; LI, X.; GAO, W.; *et al.* Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells. **Nature Reviews Materials**, v. 3, n. 7, p. 174–193, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0027-6>
- XU, Y.; CHEN, C.; HELLWARTH, P. B.; *et al.* Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. **Bioactive Materials**, v. 4, p. 366–379, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.11.002>
- YANG, D.; XIAO, J.; WANG, B.; *et al.* The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109927, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109927>
- YAO, Q.; ZHENG, Y-W.; LAN, Q-H.; *et al.* Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109942, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109942>
- ZAMBON, J. P.; KO, I. K.; ABOLBASHARI, M.; *et al.* Comparative analysis of two porcine kidney decellularization methods for maintenance of functional vascular architectures. **Acta Biomaterialia**, v. 75, p. 226–234, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.004>
- ZHANG, C.; NIE, X.; HU, D.; *et al.* Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 2, p. 249–257, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0419-1>
- ZOU, J.; WU, S.; CHEN, J.; *et al.* Highly Efficient and Environmentally Friendly Fabrication of Robust, Programmable, and Biocompatible Anisotropic, All-Cellulose, Wrinkle-Patterned Hydrogels for Cell Alignment. **Advanced Materials**, v. 31, n. 46, p. 1904762, 2019. <https://doi.org/10.1002/adma.201904762>

10. ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação ultraestrutural e biomecânica do reparo cartilaginoso de defeitos induzidos e otimizados pelo uso de células tronco derivadas de tecido adiposo em scaffolds de esclera animal”, protocolo nº 106/17, sob a responsabilidade de **Luiz Ricardo Goulart Filho** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **13 de abril de 2018**.

(We certify that the project entitled “Avaliação ultraestrutural e biomecânica do reparo cartilaginoso de defeitos induzidos e otimizados pelo uso de células tronco derivadas de tecido adiposo em scaffolds de esclera animal”, protocol 106/17, under the responsibility of Elisa Sant' Luiz Ricardo Goulart Filho - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of April 13th, 2017).

Vigência do Projeto	Início: 25/04/2018 Término: 15/05/2021
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Rattus norvegicus (rato Wistar)
Número de animais	75
Peso / Idade	300 g/10 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU
Local onde será mantido o animal	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, 18 de abril de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação ultra-estrutural do reparo ósseo de defeitos induzidos e otimizados pelo uso de *scaffold* colagenoso associado à sinvastatina”, protocolo nº 068/19, sob a responsabilidade de **Luiz Ricardo Goulart Filho** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **13 de Dezembro de 2019**.

(We certify that the project entitled “Avaliação ultra-estrutural do reparo ósseo de defeitos induzidos e otimizados pelo uso de *scaffold* colagenoso associado à sinvastatina”, protocol 068/19, under the responsibility of **Luiz Ricardo Goulart Filho** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 13th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 15/01/2020 Término: 15/01/2022
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Rattus norvegicus</i> (rato Wistar)
Número de animais	159
Peso / Idade	300 g / 10-12 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU
Local onde serão mantidos os animais	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU

Uberlândia, 16 de dezembro de 2019.


Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 1234 DE 01 DE OUTUBRO DE 2019