

MAGDA LORENA BATISTA FREITAS

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE TECIDO
CUTÂNEO CANINO POR MÉTODO SIMPLES E CONJUGADO**

Recife/PE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

MAGDA LORENA BATISTA FREITAS

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO DE TECIDO
CUTÂNEO CANINO POR MÉTODO SIMPLES E CONJUGADO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciência Veterinária da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Coelho

Coorientadora: Profa. Dra. Márcia de Figueiredo Pereira

Recife/PE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**Avaliação do processo de descelularização de tecido cutâneo canino por método simples
e conjugado**

Dissertação de mestrado elaborada por :

Magda Lorena Batista Freitas

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira C. Coelho

Orientadora

Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Paula Monteiro Tenório

Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Grazielle Anahy de Sousa Aleixo

Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Federal Rural de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos (professores, alunos de graduação, colegas de profissão e trabalho, familiares e amigos) que me ajudaram direta e indiretamente para cada conquista profissional.

Um beijo especial para a minha amada filha, Maria Alice Freitas Cardim de Aguiar, menina dos meus olhos e dona do meu coração. Peço a Deus que ilumine sua vida e seus passos.

Dedico a Deus, porque sem ele nada é possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora profa. Dra. Maria Cristina Oliveira Coelho pela pessoa que é, por conseguir ser mãe biológica de quatro filhos e de diversos adotivos (todos seus orientados, alunos e animais). Um exemplo de mulher, profissional, amiga, mãe e professora;

A minha família pela ajuda em cuidar da minha filha quando tenho que ir trabalhar ou estudar;

A todos os professores da graduação que ajudaram na minha formação como Médica Veterinária;

A todos os tutores que confiam a vida de seus filhos em minhas mãos para que eu cuide com todo amor, carinho e conhecimento salvando suas vidas ou prevenindo doenças;

A todos os animais e um beijo especial para os meus filhos (Joselito, Pulga e Toco) e para a minha primeira filha Tuca (que Deus a tenha);

Ao apoio financeiro da Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES);

E por último, obrigada a Deus por ontem, hoje e amanhã.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a viabilidade do processamento de descclularização em tecido cutâneo canino utilizando um método simples (desidratação em glicerina) e conjugado (solução supersaturada de açúcar seguido de desidratação em glicerina). Após a confecção da solução supersaturada de açúcar a 300 %, retirou-se uma alíquota para avaliação físico-química e microbiológica. Dividiu-se um fragmento cutâneo canino em 54 amostras, distribuídos em 2 grupos: 27 amostras no grupo A (solução supersaturada de açúcar) e o 27 amostras no grupo G (glicerina). Antes da divisão, o fragmento foi submetido a avaliação microbiológica. A temperatura de armazenamento foi 4°C. Subdividiu-se em 6 grupos de estudos, com 9 fragmentos cada. Subgrupos A (A1, A2, A3) e subgrupos G (G1, G2, G3). Após 48 horas de imersão, cada amostra do grupo A foram retiradas do meio e submetidas a nova avaliação microbiológica. O grupo A1 foi imediatamente submetido a análise histológica. Os demais grupos (A2 e A3) foram transferidos para glicerina e permaneceram imersos por 13 dias (A2) e 28 dias (A3). As amostras do grupo G foram retiradas do meio na seguinte cronologia: G1 com 48 horas, G2 com 15 dias e G3 com 30 dias, para a avaliação histológica. Alteração na morfologia das fibras colágenas e presença de componentes celulares na epiderme e derme classificou os tratamentos em eficaz, eficaz com alteração nas fibras colágenas e não eficaz. A análise físico-química da solução supersaturada obteve o pH 8,05, teor de umidade 25 % e a atividade de água 0,8487. Com relação a avaliação microbiológica da solução, verificou-se ausência de qualquer crescimento microbiano, já a pele foi positiva para *Staphylococcus aureus*. Apenas uma (3,73%) pele dos grupos A permaneceu contaminada. Um (11,11%) dos fragmentos cutâneos do grupo A1 foi considerado eficaz no processo descclularizante com alteração na morfologia das fibras colágenas. 88,88 % dos fragmentos do grupo A2 apresentou descclularização na derme superficial e profunda com discreta e moderada presença de células. Um (11,11%) dos fragmentos do grupo A2 houve descclularização moderada na epiderme. O grupo A3 obteve-se os mesmos resultados do grupo A2. Com relação a classificação dos grupos G, os resultados foram semelhantes ao grupo A na mesma cronologia. Conclui-se que a solução supersaturada de açúcar apresenta ação antimicrobiana com 48 horas de imersão e que tanto a solução supersaturada de açúcar quanto a de glicerina não são viáveis para promover completa descclularização em tecido cutâneo canino.

Palavras-chave: cirurgia reconstrutiva, enxerto cutâneo, tecido acelular

ABSTRACT

This study aimed to assess the feasibility of the decellularization process in canine skin tissue using a simple method (dehydration glycerin) and conjugate (supersaturated sugar solution followed by dehydration of glycerin). After the preparation of supersaturated solution of sugar 300%, and departed a rate for physico - chemical and microbiological. Divided a skin fragment canine in 54 samples, distributed into 2 groups: 27 samples in group A (supersaturated sugar solution) and 27 samples in the group G (glycerin). Before the split, the fragment was subjected to microbiological evaluation. The storage temperature was 4 ° C. Subdivided into 6 study groups, each of 9 fragments. Subgroups A (A1, A2, A3) and subgroups G (G1, G2, G3). After 48 hours of immersion, each sample group were removed from the medium and subjected to microbiological evaluation new. The A1 group was immediately subjected to histological analysis. The other groups (A2 and A3) were transferred to glycerin and remained immersed for 13 days (A2) and 28 days (A3). Samples of the group G were taken from among the following chronology: G1 48 hours, G2 and G3 15 days with 30 days for histological evaluation. Changes in the morphology of collagen fibers and presence of cellular components in the epidermis and dermis ranked the treatments effective, effective with changes in collagen fibers and not effective. The physicochemical analysis of the supersaturated solution obtained pH 8.05, 25% moisture content and water activity 0.8487. With regard to microbiological evaluation of the solution, it was found absence of any microbial growth, as the skin was positive for *Staphylococcus aureus*. Only one (3.73%) The skin remained contaminated groups. A (11.11%) of the skin fragments group A1 was considered effective in decellularizing process change in the morphology of the collagen fibers. 88.88% of group A2 fragments presented decellularization the superficial and deep dermis with mild and moderate presence of cells. A (11.11%) of group A2 fragments decellularization was moderate in the epidermis. The group A3 was obtained the same results of the A2 group. With respect to the classification of groups G, the results were similar to group A at the same timing. It follows that the supersaturated sugar solution has antimicrobial action 48 hours of immersion and that both the supersaturated sugar solution as glycerin is not feasible to promote complete decellularization in canine cutaneous tissue

Key Words: reconstructive surgery, cutaneous graft, acellular tissue

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura	Páginas
FIG. 1- Estratos epidérmicos (corte espesso)	17
FIG. 2 - Estratos epidérmicos (corte fino)	17
Artigos Científicos	
Avaliação das propriedades físico-químicas e microbiológicas da solução supersaturada de açúcar a 300% conservada a 4^oC como meio de descellularização para enxertia cutânea.	
FIG. 1- Solução supersaturada de sacarose	44
FIG. 2- Inoculação em placa contendo ágar sangue ovino a 80 %	46
Descellularização de tecido cutâneo canino utilizando método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguido de desidratação em glicerina) e método simples (desidratação em glicerina) – Análises histológicas.	
FIG.1- Enxerto conservado em solução supersaturada de açúcar a 300 %. Alteração na morfologia das fibras colágenas	55

FIG. 2- Enxerto conservado em glicerina a
98 % . Conservação das fibras colágenas

56

LISTA DE QUADROS

**Descelularização de tecido cutâneo canino
utilizando método conjugado (choque
osmótico com solução supersaturada de
açúcar seguido de desidratação em
glicerina) e método simples (desidratação
em glicerina) – Análises histológicas.**

Página

QUADRO 1- Parâmetros para avaliação
histológica

54

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Anatomia e histologia da pele	17
2.2 Substitutos cutâneos	20
2.3 Processos de descelularização	25
3. REFERÊNCIAS	31
ARTIGOS CIENTÍFICOS	
4. Avaliação das propriedades físico-químicas e microbiológicas da solução supersaturada de açúcar a 300% conservada a 4⁰C como meio de descelularização para enxertia cutânea	41
4.1 Introdução	43
4.2 Material e Métodos	43
4.3 Resultados e Discussão	45
4.4 Conclusão	46
4.5 Referências bibliográficas	46
5 Descelularização de tecido cutâneo canino utilizando método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguido de desidratação em glicerina) e método simples (desidratação em glicerina) – Análises histológicas.	50
5.1 Introdução	51
5.2 Material e Métodos	52

5.3 Resultados e Discussão	53
5.4 Conclusão	54
5.5 Referências bibliográficas	56

1-INTRODUÇÃO

A pele constitui a primeira barreira protetora do corpo, regula as perdas hídricas, o equilíbrio térmico e previne contra infecções (NETO et al., 2010). Grandes lesões cutâneas podem ocorrer, e em diversas situações necessitam de auxílio clínico ou cirúrgico para a sua síntese. Nessa perspectiva, o uso de substitutos cutâneos fornecem condições ideais para o processo regenerativo tecidual (FERREIRA et al., 2011).

Qualquer componente que oclua temporariamente ou definitivamente uma lesão e favoreça o processo cicatricial dérmico e regenerativo epidérmico é denominado de substituto cutâneo (MESTRE et al., 2012). Os substitutos são classificados de acordo com a profundidade de cobertura da lesão, a permanência no leito receptor e a origem de obtenção (SILVA, 2012).

Com relação à origem de obtenção, os substitutos cutâneos são classificados em sintéticos e biológicos. Entre os biológicos, os denominados autoenxertos proporcionam melhor integração tecidual, pois são ausentes de reações imunológicas. Apesar da preferência no uso, essa técnica de autoenxertia em muitas situações torna-se inviável frente a pouca disponibilidade de doação do tecido pelo próprio receptor (MAES et al., 2012).

Diante da dificuldade da autoenxertia, aloenxertos são utilizados e na perspectiva de evitar reação imunológica, técnicas de processo de descclularização são estudadas com o intuito de obtenção de tecido menos imunógeno (FERREIRA et al., 2011).

O processo de descclularização culmina com a destruição celular e a manutenção da matriz extracelular, esta servirá de arcabouço para o processo regenerativo. Existem três mecanismos básicos de obtenção do produto: técnicas físicas, químicas e enzimáticas, sendo o mecanismo e o produto utilizado de acordo com o tecido em questão. Dos meios físicos destaca-se a utilização de soluções supersaturadas para a promoção de choque osmótico, como por exemplo o uso de soluções de sacarose supersaturada. O uso de agentes químicos proporciona uma interação com as membranas celulares e posterior degradação. Dos meios amplamente utilizados para promover descclularização química destaca-se a glicerina PA. Qualquer mecanismo isolado necessita de um tempo mínimo de 30 dias de imersão no meio utilizado, sendo comum o uso combinado das técnicas para otimizar o processo degradativo celular (COLATUSSO, 2011; JUNIOR, 2013).

Visto que o uso de enxertos descelularizados contribui com a cicatrização, em caso de impossibilidade de fechamento primário da lesão, e diante da ausência de protocolo padrão para descelularização de tecido cutâneo canino, esse trabalho objetivou avaliar a viabilidade do processamento de descelularização em tecido cutâneo canino através do uso de técnica simples (desidratação em glicerina) e técnica conjugada (choque osmótico seguido de desidratação em glicerina).

Com os resultados das etapas dos projetos, procedeu-se com a elaboração de dois artigos científicos. Assim, esse trabalho foi dividido em dois capítulos. O capítulo um refere-se a revisão de literatura sobre o tema e o capítulo 2 aos artigos científicos.

Capitulo 1

2 -REVISÃO DE LITERATURA

2.1- ANATOMIA E HISTOLOGIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo, constituída por duas camadas principais: a epiderme (camada superficial) composta por um epitélio estratificado pavimentoso e a segunda camada denominada de derme constituída por tecido conjuntivo. Adicionalmente, há uma camada variável denominada de hipoderme, formada por tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo, conectando-se aos músculos ou ossos (MARTINS, 2010).

A epiderme é constituída por cinco estratos que são denominados, respectivamente do mais profundo para o mais superficial, em: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (Fig. 01 e 02) (ROCHA, 2013).

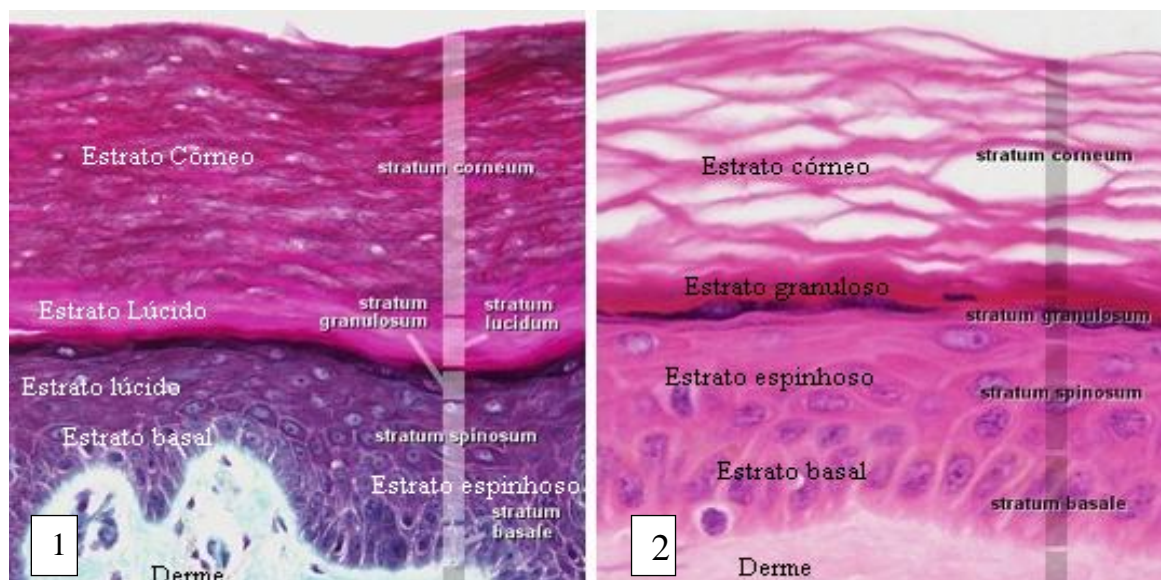


Fig. 01 e 02: Representação gráfica dos estratos epidérmicos; 1- corte espesso (coloração tricrômico); 2- Corte fino (coloração hematoxilina e eosina).

Fonte: WECKER et al.,(2015).

Os queratinócitos são as principais células constituintes da epiderme, assim como os fibroblastos são referentes à derme. Esses queratinócitos sofrem modificações estruturais frente às informações genéticas e pressões mecânicas sofridas pelo tecido, apresentando-se de diferentes conformações citológicas nos diferentes estratos epidérmicos (ISAAC et al, 2010).

A espessura da epiderme classifica a pele em pele grossa e pele fina, essa classificação está correlacionada com a espessura do estrato córneo, o acúmulo de células de queratina e a presença do estrato lúcido (PEREIRA et al., 2011).

O estrato córneo é constituído por células mortas, pavimentosas e queratinizadas. Denominadas de corneócitos são unidas por substâncias produzidas no estrato granuloso. Essa camada da epiderme apresenta a função de proteção contra atrito, invasão de microorganismos e perda de água. Suas células são facilmente descamadas por abrasão. A espessura do estrato córneo está diretamente relacionada ao grau de atrito submetido a região e conforme já mencionado, classifica a pele em grossa ou fina (BEM et al., 2010; MONTARI, 2016).

O próximo estrato denomina-se lúcido que é constituído por células pavimentosas, translúcidas e anucleadas contendo grânulos com eleidina. Encontra-se presente nas regiões de pele grossa correspondente nos caninos nas almofadas plantares, face, mamilos e escroto (ROCHA, 2013).

Abaixo do estrato lúcido nas peles grossas ou logo após o estrato córneo, inicia-se o estrato granuloso que é formado por uma ou várias camadas de células rombóides ou pavimentosas que possuem grânulos querato-hialina. Nessas células há a síntese de colesterol, de ácidos graxos livres e de outros glicolipídeos responsáveis por cimentar as células e formar uma barreira impermeável a água evitando a dessecação (ROCHA, 2013; MONTARI, 2016).

Acima do estrato basal, que é a camada que separa a epiderme da derme, encontra-se o estrato espinhoso. Esse estrato recebe esse nome devido ao formato que suas células se apresentam nos cortes histológicos. Suas células são poliédricas ou pavimentosas e estão ligadas entre si por pontes intercelulares denominadas de desmossomos. São os desmossomos que ao corte histológico adquirem um aspecto de espinho (MARTINS, 2010).

Nesse estrato são encontradas as células de *Langerhans*, apresentadoras de antígenos originadas de precursores de células medulares, exercem a função de apresentadoras de antígenos. Essas células fagocitam e processam os antígenos, apresentando-os aos linfócitos T para dar início a resposta imunológica. Sua ação tem importância na dermatite alérgica por contato ou na rejeição de transplantes cutâneos (ROCHA, 2013; MONTARI, 2016).

A estrutura que promove a comunicação da epiderme com a derme chama-se estrato basal, que é constituída por células- tronco epidermais. Essas células são cúbicas ou colunares e sintetizam filamentos intermediários de citoqueratina (tonofilamentos). As células são aderidas à membrana basal por hemidesmossomos e as células vizinhas por desmossomos. Neste tecido todas as células- tronco são progenitoras dos queratinócitos, que migram para as camadas superiores e sofrem as alterações morfológicas específicas de cada estrato (SOUZA, 2009).

No estrato basal, há também os melanócitos e as células de Merkel. Os melanócitos são células arredondadas com vesículas membranosas, denominadas de melanossomas, contendo melanina. A melanina é um pigmento pardo-amarelo a marrom-escuro, que se situa no núcleo das células protegendo o material genético da radiação ultravioleta. Ocorre migração da melanina do núcleo celular para as células do estrato basal e para o estrato espinhoso (SCHARDOSIM, 2012).

São elementos constituintes da membrana basal: colágeno tipo IV, laminina, entactina e proteoglicanas. Além da união da derme com a epiderme, essa estrutura é responsável por manter a epiderme em estado produtivo de diferenciação, estabilizar a arquitetura epitelial celular, facilitar a movimentação de nutrientes, oxigênio e células úteis da derme para epiderme (SCHARDOSIM, 2012).

A derme é uma camada de tecido conjuntivo que apoia a epiderme comunicando-se com a hipoderme e através dessa com as fâscias musculares. Nessa camada encontramos fibras elásticas, reticulares e colágenas. A derme é suprida por vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. É dividida em duas camadas, a superficial denominada de papilar e uma mais profunda chamada de reticular. Sua função é promover a nutrição da epiderme, promover flexibilidade à pele, proteção mecânica, manter a homeostase, armazenar sangue para eventuais necessidades e ser a segunda linha de defesa contra invasão de microrganismos (SILVA et al., 2010).

Por último uma camada anexa à pele chama-se hipoderme ou tecido subcutâneo. Essa camada une a pele às estruturas corporais mais profundas, permitindo uma melhor mobilidade tegumentar. Composta por tecido adiposo, isto é células repletas de gordura formando lóbulos. A sua porção superior relaciona-se com a derme profunda, constituindo a junção

dermo-hipodérmica, sede das porções secretoras das glândulas apócrinas ou écrinas e de pelos, vasos e nervos. Funciona com um depósito de nutrientes, participa do isolamento térmico e da proteção mecânica (BISINELLA & SIMÕES, 2010; SILVA, 2010).

Unindo as células existe a matriz extracelular, que é uma estrutura tridimensional de suporte formada por proteínas (como colágenos e elastina), glicoproteínas (laminina, fibronectina e vitronectina), proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs) (LOPES et al., 2009; ALVES, 2011).

Rodrigues (2012) destaca que a matriz extracelular é subdividida em duas zonas, denominadas de intersticial e de pericelular. O compartimento intersticial da matriz desempenha um papel fundamentalmente de suporte, já o pericelular está ligado aos processos de modulação do comportamento celular, como adesão, migração, proliferação, apoptose e diferenciação celular. As estruturas denominadas de glicocálice, zona pelúcida e lâmina basal são exemplos de elementos constituintes do compartimento pericelular.

Além da função de suporte celular, a matriz extracelular serve de reservatório natural de fatores de crescimento e de outras moléculas de sinalização durante o processo reparativo tecidual. A matriz colágena é importante para oferecer um apropriado ambiente para a migração celular e ativar a reorganização do tecido, sendo de extrema importância a sua manutenção em substitutos cutâneos que visam a integração tecidual (LOPES et al., 2009; ALVES, 2011).

3.2- SUBSTITUTOS CUTÂNEOS

Denomina-se substitutos cutâneos qualquer tecido de origem animal ou sintético utilizado para ocluir temporariamente ou permanentemente uma ferida, otimizando o processo cicatricial (SMANIOTTO et al., 2010). A escolha do substituto cutâneo é feita após minuciosa análise da lesão, onde fatores como tipo, tamanho, profundidade, comorbidades sistêmicas são indicativos de qual material reparativo usar (FERREIRA et al., 2011).

A primeira escolha para a oclusão de uma grande ferida é o uso de enxerto cutâneo autólogo ou retalho pedicular. Esses tipos de substitutos são inertes ao aparecimento de rejeição imunológica, porém em diversas situações a obtenção torna-se inviável, preconizando-se o uso de tecidos alógenos, xenólogos ou sintéticos (GOULART, 2010).

Um substituto de pele deve permitir a regeneração do epitélio lesionado e se aproximar ao máximo da estrutura histológica do tecido (FERREIRA et al., 2011). Pereima et al. (2013) destacam que as características do material para ser considerado ideal são: uma boa aderência, elasticidade, permeável ao vapor de água, durabilidade, fornecer uma barreira antibacteriana, ser atóxico, não antigênico, antisséptico, homeostático, de fácil aplicação e remoção e por fim ser de baixo custo.

Mestre et al. (2012) ressaltam que os substitutos cutâneos podem receber várias classificações, normalmente relacionadas com os materiais constituintes e a durabilidade do material no leito receptor. Ferreira et al. (2011) classificaram-os de acordo com a profundidade de ação, tempo de permanência e origem de obtenção. A classificação dos substitutos cutâneos descrita por Balasubramani et al. (2001) é a atualmente mais aceita. Ela divide a categoria em três classes:

Classe I: Curativos temporários impermeáveis

Classe II: Substitutos de pele duráveis de camada única

Classe III: Substitutos de pele complexos

Classe I: Curativo temporário e impermeável

São classificados nessa categoria aqueles que não apresentam em sua estrutura componentes epidérmicos, porém desenvolvam a função de epiderme. Atuam proporcionando proteção mecânica contra infecções bacterianas e diminuindo a evaporação de água (MAES et al., 2012).

Os materiais que compõem essa classe são subdivididos de acordo com o número de camadas integrantes em materiais de camada única e de dupla camada (FERREIRA et al., 2012).

Os materiais de camada única são, ainda, classificados em biológicos ou sintéticos. Dos biológicos destacam-se o uso de membranas amnióticas *in natura* ou submetidas ao processo de descelularização. O uso do substituto cutâneo derivado da membrana amniótica proporciona uma barreira protetora contra as bactérias ambientais, acelera a reepitelização das

lesões e diminuem a dor local por proteger as terminações nervosas, culminando na redução do processo inflamatório local (PAGGIARO et al., 2011).

Os filmes de polímeros sintéticos e derivados de celulose são exemplos dos materiais de camada única sintéticos. Os polímeros sintéticos derivados de polialfa - hidróxiésteres (polietilenoglicol; poliácido láctico e poliácido glicólico) apresentam vantagens em relação aos substratos biológicos uma vez que apresentam produção padronizada, podem ser modificados de acordo com a necessidade do paciente, são dispostos estéreis e são totalmente degradados por reações hidrolíticas resultantes do processo regenerativo, não sendo necessária segunda intervenção cirúrgica para retirada (RODRIGUES, 2012).

Os de camada dupla são produzidos por engenharia tecidual. Encontram-se enquadrados nessa categoria, porque são semipermeáveis, funcionam como barreira mecânica de proteção e tem ação temporária. O principal exemplo é denominado comercialmente de Transcyte®. Esse produto é fabricado pela indústria britânica Smith & Nephew, é constituído por uma rede de náilon coberta por colágeno de suíno com fibroblastos de neonatos humanos. Essas células usam a rede de náilon como matriz extracelular e iniciam a proliferação celular, síntese de proteínas (fibronectina, colágeno tipo I, tenascina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas) e síntese de fatores de crescimento. Seu uso permite uma otimização no processo regenerativo epidérmico (FERREIRA et al., 2011; SINGH & SHENOY, 2012).

Gondin (2012) verificou compatibilidade entre o uso de polímeros de cana – de – açúcar e cultura de queratinócitos, destacando a aplicabilidade do produto como substituto cutâneo. Esse tipo de material também é classificado como de camada dupla temporário e impermeável.

Classe II: Substitutos cutâneos duráveis de camada única

Apresentam potencial integrativo ao tecido receptor, podem ser constituídos por componentes epidérmicos ou dérmicos, sendo sua escolha relacionada a profundidade da lesão tecidual (MAES et al., 2012).

A infusão de queratinócitos ou células-tronco mesenquimais autólogas na lesão cutânea age como um substituto cutâneo durável epidérmico, pois ocorre multiplicação celular e diferenciação, regenerando a histologia tecidual (FERREIRA et al., 2011). Garcez

(2012) destaca que a utilização de células-troncos mesenquimais alógenas também exercem efeito redutor no tempo de cicatrização epidérmica. Em um estudo realizado por Mcfarlin et al. (2006) observou-se redução no tempo de reparação, aumento da elasticidade tecidual com uma maior deposição de colágeno na área após infusão de células- tronco alógenas em feridas cutâneas em ratos.

Os substitutos cutâneos dérmicos são constituídos por substâncias semelhante à derme após um processo de tratamento tecidual ou fabricada como matriz de colágeno associada a outras proteínas. Comercialmente encontramos matriz dérmicas derivadas de colágeno de bovino, suíno e pele humana (FERREIRA et al., 2011).

CLASSE III: Substitutos de pele compostos

Classificados em substitutos de pele total ou parcial e em produzidos por engenharia de tecidos. Os substitutos de pele total ou parcial são denominados de enxertos cutâneos. São classificados de acordo com sua origem de obtenção em aloenxertos, autoenxertos, xenoenxertos e isoenxertos (FERREIRA et al., 2011).

Autoenxerto é que aquele proveniente do próprio receptor; aloenxerto é obtido de indivíduo diferente, porém da mesma espécie; xenoenxerto é derivado de espécies diferentes e isoenxerto o doador é irmão gêmeo do receptor (MORAES, 2012)

Moraes (2012) denomina enxerto cutâneo como um segmento de pele que é totalmente removido da sua região doadora e transferida para a região receptora. Esse tecido obtém sua irrigação cutânea através do processo de embebição plasmática advinda do leito receptor. Logo após a enxertia, o tecido enxertado adere no leito receptor através de uma rede de fibrina que permite migração celular, transferência de plasma e absorção do exsudato com posterior edemaciação do enxerto. Esse edema perdura por oito dias pós-operatório, período que melhora o processo de drenagem linfática e venosa, permitindo a eliminação de todo o líquido. Gradualmente a rede de fibrina regride, sendo substituída pelo tecido de granulação. Nesse período ocorre a aderência permanente do autoenxerto ou rejeição do enxerto alógeno ou xenoenxerto (HERMETO & DeROSSI, 2011).

Outra classificação dos enxertos está relacionada de acordo com a sua espessura tecidual. São divididos em dois grupos: enxertos de espessura total e parcial. Essa

denominação está relacionada à presença da epiderme e da derme. O enxerto de espessura total apresenta em sua constituição a composição normal da pele, ou seja uma camada de epiderme adjacente a outra de derme. Os de espessura parcial são constituídos por uma lâmina de epiderme e podem ser subclassificados de acordo com a presença remanescente de elementos dérmicos em delgados, intermediários e espessos (respectivamente pouca quantidade, intermediária e grande quantidade de elementos dérmicos) (FILHO, 2015).

O sucesso da enxertia depende de dois fatores: a presença de constituintes dérmicos e a qualidade do leito receptor. Os elementos dérmicos vão proporcionar uma adequada elasticidade e evitar a inadequada contração tecidual, além de predispor a maior migração celular. O enxerto necessita da vascularização do leito receptor para a sua sobrevivência e garantia de uma perfeita aderência inicial. Feridas contaminadas, infectadas e pouco profundas são ambientes inóspito para a enxertia. Todo enxerto deve ser depositado em tecido viável, com a presença de tecido de granulação ou ferida fresca/ limpa (HERMETO & DeROSSI, 2011).

Frente a pouca disponibilidade de tecido doador, a dificuldade de armazenamento em bancos de pele e a possibilidade de rejeição imunológica, a utilização de tecidos sintéticos produzidos por engenharia tecidual ganha destaque desde a década de 70. A engenharia tecidual é um ramo das ciências médicas que visa a fabricação de matrizes tridimensionais *in vitro* com a perspectiva da utilização adequada *in vivo* (RODRIGUES, 2011).

O principal exemplo de substituto cutâneo sintéticos é a matriz de regeneração dérmica tridimensional composta externamente por uma membrana de silicone cobrindo uma matriz de colágeno polimerizado associada com glicosaminoglicanos (GAG). Essa estrutura permite criar uma barreira protetora frente a infecções e agressões externas, migração, proliferação celular e posterior síntese de colágeno (RODRIGUES, 2011).

Uma modalidade crescente de substitutos cutâneos sintéticos corresponde ao uso de matriz dérmica armazenada em glicerina e descelularizada, povoada com queratinócitos e fibroblastos autólogos. Os queratinócitos promovem a formação da nova epiderme, auxiliando na formação da matriz extracelular e contração da ferida. Os fibroblastos atuam como

produtores de colágeno para a regeneração da derme (ISAAC et al., 2011; ISAAC et al., 2012).

3. 3-PROCESSOS DE DESCELULARIZAÇÃO

De acordo com Hermeto e DeRossi (2012) um dia após a enxertia inicia-se o processo de inosculação (correspondente as anastomoses de vasos do enxerto com os vasos do leito receptor). Essa inosculação é proporcionada pela rede de fibrina que adere o tecido transportado ao assoalho tecidual. Através das anastomoses vasculares ocorre o fluxo sanguíneo para o enxerto transportado, que inicialmente é lento e desorganizado e por volta do quinto ou sexto dia torna-se normal.

No momento que se inicia a troca de células por meio da irrigação e drenagem sanguínea, dar-se o reconhecimento celular das células do enxerto através dos linfócitos T e do complexo maior de histocompatibilidade do receptor. Esse mecanismo culmina com a ativação do sistema imune e destruição completa do tecido transportado em 10 ou 14 dias pós- transplante (FILHO et al., 2009).

Existem duas vias de reconhecimento celular e ativação do sistema imune, a via direta e indireta. Na via direta as células de *Langerhans* migram do enxerto para os linfonodos responsáveis pela drenagem da área receptora. Nesta região, os linfócitos T do doador são ativados e inicia-se o processo de rejeição imunológica, com ativação dos mecanismos celulares inflamatórias e posterior degradação da enxertia. A via direta é responsável pela rejeição aguda aos implantes alógenos ou xenólogos. A via indireta, ou também denominada de via lenta de rejeição, ocorre quando as células apresentadoras de antígenos do receptor (principalmente macrófagos) migram em direção ao enxerto, captam os antígenos do doador e posteriormente ativam os linfócitos T do receptor (FILHO et al., 2009).

Todo enxerto que não for autógeno ou isogênico induz a resposta imunitária, seja ela através da via direta ou indireta. Imunossupressão do receptor ou pré-tratamento no tecido doado funcionam como estratégias de redução da rejeição ou até indução a tolerância imunológica. A imunossupressão é atingida de forma inespecífica, sendo assim o paciente fica susceptível a adquirir infecções oportunistas e o desencadeamento de neoplasias, além do que o processo de reativação do sistema imune é relativamente longo (cerca de um ano após o

transplante), sendo necessário o paciente se submeter a novo protocolo de imunização vacinal, já que perde toda a memória imunológica adquirida em vida (SILVA, 2011).

Diante dos efeitos adversos do uso de imunossupressores, pré- tratamentos teciduais são realizados nos tecidos doadores com o objetivo de obter uma matriz descelularizada e inerte imunologicamente (FILHO et al., 2009).

Segundo Wollmann et al (2011) a metodologia de descelularização visa a completa remoção das células do tecido, resultando uma matriz acelular e inerte do ponto de vista imunológico. Essa matriz fica passível de ser repovoada *in vitro* por células processadas ou *in vivo* por células do hospedeiro. Esse processo de descelularização resulta na manutenção da matriz extracelular, nessa matriz ocorrerá a adesão, proliferação e diferenciação celular determinantes ao processo reparativo.

Métodos de descelularização

Os métodos utilizados são divididos didaticamente em métodos físicos, químicos e enzimáticos (QUITZAN, 2009).

Métodos Físicos

Os métodos físicos, em sua grande maioria, não conseguem atingir uma descelularização eficaz, fazendo-se necessário a combinação com métodos químicos ou enzimáticos que rompem as membranas celulares, assim como as ligações intracelulares e extracelulares (OSÓRIO et al., 2012).

De acordo com Evaristo (2011) os métodos físicos rompem as membranas celulares e liberam seus conteúdos, facilitando a sua remoção por lavagens subsequentes. O mesmo autor destaca o congelamento e descongelamento, a pressão direta, a sonicação e a agitação mecânica como métodos físicos de descelularização. Murador (2013) destaca o uso recente de tratamento com LED (*Light Emitting Diode*) para promover descelularização no tecido.

A lesão celular induzida por congelamento se explica pela formação de cristais de gelo no meio intracelular e extracelular. Esses cristais rompem diretamente as membranas celulares. Existem duas formas de congelamento: lento e rápido. O congelamento rápido forma pequenos cristais de gelo que não causam lesões teciduais significativas, podendo

preservar um número maior de células, já no congelamento lento existe a tentativa de proteção celular por meio de adequação osmótica, culminando em agrupamento das moléculas de água e formação de grandes cristais de gelo. Esses grandes cristais de gelo lesionam com maior intensidade as membranas celulares. O descongelamento se obtido de forma rápida lesiona as células por modificar rapidamente o potencial osmótico celular, desencadeando lise celular (RIBEIRO et al., 2012).

Os procedimentos de pressão celular e sonicação somente produzem efeitos se realizados simultaneamente com outros tratamentos químicos, para promover a ruptura celular e a remoção dos *debris* celulares. A lise celular através da aplicação da pressão direta é conseguida somente em órgãos que não apresentam uma matriz extracelular organizada de forma tão densa, como por exemplo o fígado e pulmão (EVARISTO, 2011).

A sonicação consiste no uso de ondas sonoras para causar vibrações e conseqüentemente geração de tensões mecânica no fluido, aumento de calor e posteriormente ruptura celular (MORIOKA et al., 2014).

De acordo com Evaristo (2011) a agitação mecânica deve ser realizada como primeiro protocolo de descélularização, sempre seguido de outra técnica ou realizada comutativamente. O mesmo autor utilizou como primeiro protocolo de descélularização em anel traqueal de coelhos, o uso de detergente iônico SDS 0,1 %, armazenado a uma temperatura de 37 °C por um período de 15 horas, sob agitação mecânica de 180 rpm.

O *Light Emitting Diode* (LED) são lasers produzidos por diodos semicondutores. Esses lasers têm a capacidade de interferir na produção de ATP pelas mitocôndrias acelerando seu metabolismo e agir nas células produtoras de colágeno e elastina. Por esse motivo são amplamente utilizados na clínica médica como coadjuvante na reparação tecidual. Porém a frequência de ondas terapêutica pode induzir também lesão celular por necrose ou apoptose, uma vez que já foi sinalizado lesão ao DNA celular em culturas de células. Ambos os mecanismos de morte celular podem ser desencadeados por diversos estímulos, nesse caso a estimulação luminosa funciona como um fator desencadeador do processo (SILVA, 2009).

Métodos químicos

Agentes químicos são usados para promover descelularização, a forma de ação é de acordo com a interação da substância química com os elementos estruturais intracelulares e extracelulares. Empregam-se detergentes, sais, ácidos, bases, álcoois e quelantes. São classificados em: detergentes iônicos, detergentes não iônicos, Zwitteriônicos e agentes quelantes (PERUZZO, 2013).

Detergentes não iônicos atuam rompendo as ligações das membranas celulares, porém preservam as ligações proteína-proteína constituintes da matriz extracelular. Detergentes iônicos agem solubilizando as membranas celulares e nucleares, removendo os glicosaminoglicanos e qualquer tecido biológico descelularizado. As soluções alcalinas e ácidas interferem no pH celular, causando solubilização dos componentes citoplasmáticos e degradação do material nuclear (JUNIOR, 2013; PERUZZO, 2013).

Os detergentes Zwitteriônicos (anfóteros) agem simultaneamente como detergentes não iônicos e iônicos. São hidrofílicos e contém tanto carga positiva quanto negativa, atuam principalmente solubilizando as proteínas das membranas integras (JOHNSON, 2013, JUNIOR, 2013).

Os agentes quelantes de íons, como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra- acético) e o EGTA (ácido tetra-acético etileno- glicol) se ligam a cátions divalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}) inviabilizando sua função. Esses cátions são essências para a adesão celular à estrutura da matriz extracelular, para o funcionamento celular e o correto equilíbrio osmótico (JUNIOR, 2013).

Métodos enzimáticos

O uso de enzimas proteolíticas para descelularização pode alterar a estrutura da matriz extracelular, removendo fibronectina, elastina e glicosaminoglicanos. Essa alteração tem caráter negativo na utilização do enxerto, pois pode interferir na integração tecidual. Outro aspecto negativo na descelularização enzimática é que o seu uso após interagir com as proteínas da matriz deixa resíduos de difícil remoção, induzindo resposta imunológica no receptor (PERUZZO, 2013).

São exemplos de enzimas utilizadas para promover descélularização a tripsina, endonucleases e exonucleases. O uso de agentes enzimáticos deve ocorrer em combinado com outros métodos químicos ou físicos (JUNIOR, 2013).

Iwamoto (2015) destaca que o uso combinado de técnicas é a melhor opção para descélularização e desmineralização do tecido. O mesmo autor alega que o uso de agentes quelantes como o EDTA associado a tripsina produz fácil remoção do material celular do tecido. Da mesma forma Junior (2013) que informa que a associação de dois agentes químicos (SDS e Triton x-100) e um agente químico e outro enzimático (Tripsina / EDTA) produz remoção total celular.

O uso do açúcar para promover descélularização

O uso de soluções supersaturadas de açúcar e sal servem tanto de meios conservantes como métodos físicos de descélularização. O seu uso produz uma intensa desidratação que provoca a morte de micro-organismos contaminantes e choque osmótico celular, culminando com a lise celular e com a queda do potencial imunogênico (JUNIOR, 2013).

Junior et al. (2014) destacam que o uso de soluções supersaturadas (açúcar, sal e mel) são capazes de manter a integridade estrutural do tecido e diminuir a imunogenicidade, além de apresentar potencial antimicrobiano. Leal (2013) destaca que o uso de meio hipertônico salino e solução supersaturada de açúcar conservam vários tecidos, como por exemplo ósseo e peritônio. Para a correta utilização das soluções supersaturadas, o autor informa que é necessário certificar-se das concentrações mínimas de 250 % para solução supersaturada de açúcar e de 150 % para solução salina.

Os enxertos cutâneos devem permanecer submersos no meio por um período mínimo de 30 dias, para que as soluções supersaturadas proporcionem potencial antimicrobiano e estabilidade imunológica (JUNIOR et al., 2014). Com relação ao uso de solução supersaturada de açúcar se faz necessário a troca da solução após 48 horas iniciais de submersão. Nesse período ocorre uma intensa desidratação celular, fazendo com que o meio perca o seu potencial osmótico, inviabilizando a conservação posterior (LEAL, 2013).

Leal et al. (2014) comparando enxerto de peritônio de paca conservado em glicerina a 98 % e conservado em solução supersaturada de açúcar a 300 %, obtiveram semelhantes

resultados cicatriciais e de biocompatibilidade com uso das amostras conservadas nesses diferentes meios, sugerindo igual potencial conservante e de descelularização.

Júnior et al. (2014) comparando pericárdio bovino conservado em glicerina a 98%, solução supersaturada de açúcar a 300%, solução supersaturada de sal a 150 % e mel não processado, obtiveram mesmo nível de integridade da matriz extracelular nas amostras conservadas em glicerina e na solução supersaturada de açúcar.

O uso de glicerina para promover descelularização

A primeira utilização de glicerina como meio conservante de material biológico data de 1964, quando houve o emprego da dura- máter canina glicerinada em cirurgias reparadoras (JÚNIOR et al., 2014).

A glicerina, também denominada de glicerol ou propanotriol, é um álcool que tem propriedades antissépticas e desidratantes. Essa substância interage com as moléculas de água por meio de ligações covalentes provocando a diminuição do potencial osmótico do meio, como resultado ocorre desidratação e morte de micro-organismos contaminantes (OLIVEIRA, 2008).

Queiroz et al. (2012) destacam que a glicerina é uma ótimo meio de preservação, devido a sua intensa capacidade desidratante, seu poder antisséptico, pouca toxicidade, uso com baixa concentração e baixo custo.

Júnior et al. (2014) ressaltam que o tecido conservado em glicerina deve permanecer inserido no meio por um período de 30 dias para perder a capacidade de induzir rejeição imunológica. Os mesmos autores informam que os tecidos podem ficar armazenados sem alterar suas características e propriedades por um período superior a 6 meses.

Camargo (2008) afirma que a conservação em glicerina não é capaz de alterar a estrutura do tecido, e que o grau de descelularização depende diretamente da densidade da fibra, da concentração da glicerina e da temperatura que o produto é armazenado.

4- REFERÊNCIAS

ALVES, A.L.R. Estudo da bioatividade de péptidos/ proteínas para a regeneração de tecidos. Universidade de Minho. Escola de Engenharia. Dissertação de Mestrado em Micro/NanoTecnologias.2011.Disponível:<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/17713/1/Ana%20Lu%C3%ADsa%20Rodrigues%20Alves.pdf>. Acesso dia 22 de dezembro de 2015

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, TR.; BABU, M.; Skin substitutes : a review. **BURNS**. Volume 27, Issue 5, August, 2001, Pages 534- 544

BEM, D. M. de; MACIEL, C.D.; ZUANON, J.A.; NETO, C.B.; PARIZOTTO, N.A.; Análise histológica em tecido epitelial sadia de ratos Wistar(*in vivo*) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. 2010. **Revista Bras. Fisioter**, São Carlos, v. 14, n.2, p. 114-120, mar./ abr. 2010

BISINELLA, V.; SIMÕES, N.P. di; Avaliação dos hábitos de exposição solar dos estudantes de uma cidade situada no interior do Estado Paraná. **Rev. Bras. Terap. e Saúde**, Curitiba, v.1,n.1, p.37-50, jul./ dez. 2010

CAMARGO, A.D., de. Propriedades morfológicas e tensiométricas do peritônio de Paca (Agouti paca, LINNAEUS 1766) a fresco, e conservados em glicerina. 2009. Tese apresentada à faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, para obtenção do Título de Doutor em Cirurgia Veterinária. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/101125>. Acesso dia 22 de janeiro de 2016

COLLATUSSO, C.; RODERJAN, J.,G.; VIEIRA, E.,D.; MYAGUE, N.,I.; NORONHA; COSTA , F., A., da; Descelularização como método anticalcificante em próteses valvares de pericárdio bovino sem suporte: estudo em ovinos. **Rev Bras Cir Cardiovasc** vol.26 no.3 São José do Rio Preto July/Sept. 2011

EVARISTO, T.C.; Modelo experimental de neotraquíea em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista, Campos de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica. 2011. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/24703/proposta-de-modelo-experimental-de->

neotraqueia-em-coelho-utilizando-tecnicas-de-engenharia-de-tecido/. Acesso dia 17 de janeiro de 2016

FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O. ; ISAAC, C.; NETO, N.T.; SANTOS, G. B. dos; Substitutos cutâneos :Conceitos atuais e proposta de classificação .**Rev. Bras. Cir. Plást.** 2011; 26(4): 696-702

FILHO, G.A.P.de; NETTO, R.; SILVA, F.S.da; FAURI, M.A.; LIMA, L.P.; VALIATI, A.A.; CHEM, R.C.; Imunologia do transplante de pele: Artigo de Revisão. Arquivos Catarinenses de Medicina - Volume 38- Suplemento 01-2009. Disponível em: **<http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/662.pdf>**. Acesso dia 19 de fevereiro de 2016

FILHO, N.P.R.de; Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ ou laserterapia. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP- para obtenção do Título de Mestre em Cirurgia Veterinária. 2015. Disponível em: **<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/131980/000855344.pdf?sequence=1>**. Acesso dia 08/ de janeiro de 2016

GARCEZ, T.N.A.; Células- tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvantes da cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos Nova Zelândia. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal. 2012. Disponível:**<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/60993/000863977.pdf?sequence=1>**. Acesso dia 05 de janeiro de 2016

GONDIN, T.G.F.de; Proposta na utilização de biopolímero de cana - de - açúcar como suporte na diferenciação “in vitro” de células- tronco mesenquimais humanas em queratinócitos . Dissertação apresentada ao programa de patologia do centro de ciências da saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia. 2012. Disponível em: **<http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/12801/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20UFPE%20%20THIAGO%20GOMES%20DE%20FIGUEIREDO%20GONDIM%20GONDIM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>**. Acesso dia 05 de janeiro de 2016

GOULART, B.C.; Análise do tempo de maturação dos implantes de matriz de regeneração dérmica utilizando curativos sob pressão negativa. TCC apresentado a Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a Conclusão do Curso de Graduação em Medicina. 2010.

Disponível:<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/120591/294957.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso dia 27 de dezembro de 2015

HERMETO, L. C. & DeROSSI, R.; Enxertia cutânea em pequenos animais: Uma Revisão. **Nucleus Animalium**, v.4, n.1, maio 2012.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.de; RÊGO,do, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B.; FERREIRA, M.C.; Processo de cura das feridas: Cicatrização fisiológica. **Rev. Med (São Paulo)**. 2010 jul.- dez; 89 (3/4): 125-31

ISAAC, C.; PAGGIARO, A.O.; CONDUTA, J.L.; ALDUNATE, B.; HERSON, M.R.; ALTRAN, S.C.; MATHOR, M.B.; FERREIRA, M.C.; Papel do queratinócitos na contração da ferida: avaliação de impacto usando um modelo de matriz de colágeno povoada por fibroblastos. **Rev. Bras. Cir. Plást.** 2011; 26(3): 402-6. Disponível em: <http://www.rbcp.org.br/details/858/papel-do-queratinocito-na-contracao-da-ferida--avaliacao-de-impacto-usando-um-modelo-de-matriz-de-colageno-povoada-por-fibroblastos>. Acesso dia 19 de fevereiro de 2016

ISAAC, C.; REGO, F.M.P.; LADEIR, P.R.S.de.; ALTRAM, S.C.; OLIVEIRA, R.C.de; ALDUNATE, J.L.C.B.; PAGGIARO, A.O.; FERREIRA, M.C.; Construção de substituto da pele composto por matriz de colágeno porcino povoada por fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos : avaliação histológica. **Rev. Bras. Cir. Plást.** 2012; 27 (4): 503-8. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcp/v27n4/04.pdf>. Acesso dia 19 de fevereiro de 2016

IWAMOTO, L.A.S. de; A desmineralização / descelularização dentária na confecção de Scaffold natural. Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. 2015 Disponível em: <http://www.unifesp.br/dcir/cirtrans/discente/egressos/Biblioteca/mestrado/2015-05-mestrado-luciana-aparecida-de-sousa-iwamoto.pdf>. Acesso dia 18 de janeiro de 2016

JOHNSON, M. Detergentes: Triton X- 100, Tween- 20 e mais. Disponível em: <http://www.labome.com.br/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>. Acesso dia 17 de janeiro de 2016

JUNIOR, H. A. O. Estudo da descelularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxerto. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Odontologia, Programa de Pós- Graduação em Saúde Coletiva. 2013. Disponível em: http://www.repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/123456789/17816/1/HaroldoAOJ_DISSERT.pdf. Acesso dia 22 de setembro de 2015

JÚNIOR, A.F.B.; LOPES, G.C.; CRISCI, A.R.; JÚNIOR, R.F.; GUIMARÃES, C.S.O. de; GUIMARÃES, G.C.; Análise morfológica e microbiológica do pericárdio bovino conservado em glicerina, açúcar , mel e sal. **Vet. Not. Uberlândia**, v.20, n.2, p. 15-24, juç./ dez. 2014.

LEAL, L.M. Morfologia e estereologia do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300 % ou glicerina a 98 % implantados na parede abdominal de ratos. Dissertação apresentada à faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, para a obtenção de Título de Mestre em Cirurgia Veterinária. 2013. Disponível em :http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/86627/leal_lm_me_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso dia 17 de janeiro de 2016

LEAL, L.M. ; FERREIRA, A.R.S.; REAIS, A.C.G.; MARTINS, L.L; FILHO, S.P.G.; MACHADO, R.F.; O uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300 % ou glicerina a 98 % implantados na parede abdominal de ratos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v. 66, n° 5, p. 1383-1391**, 2014

LOPES, S.A.V.; COSTA, F.D.A., da; PAULA, J.B., de; DHOMEN, P.; PHOL, F.; VILANI, R.; RODERJAN, J.G.; VIEIRA, E., D.; Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados : Estudo em ovinos. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc** 2009; 24(1): 15-22

MAES, N.B.; MANARA, L.M.; FEIJO, R.; ARAUJO, E. J. de; SOUZA, J.A.de; PEREIMA, M.J.L.; Uso de matriz de regeneração dérmica em pacientes vítimas de queimaduras em hospital infantil de referência de Santa Catarina: nove anos de experiência. **Rev. Bras. Queimaduras**. 2012; 11(1): 6-14

MARTINS, J. M.; Uso da babosa (*Aloe vera*) na reparação de feridas abertas provocadas cirurgicamente em cães, 2010. Monografia apresentada para obtenção de Título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Campina / PATOS. Disponível: http://www.cstr.ufcg.edu.br/grad_med_vet/mono2010_1/mono_juliana.pdf. Acesso dia 15 de agosto de 2015

MCFARLIN, K. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, v.14, p.471-478, 2006

MESTRE, T.; RODRIGUES, A.; CARDOSO J.; Cicatrização de feridas crônicas - Algumas opções terapêuticas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia - SPDV** . Volume 70, número 4, 2012.

MONTANARI, T. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3. ed. Sistema tegumentar. Porto Alegre: Tatiana Montanari, 2016. 227 p. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto>.

MORAES, R.U.C. de; Cirurgias reconstrutivas de tecidos moles em pequenos animais com ênfase nas afecções palpebrais. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Faculdade Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná. 2012. Disponível em: <http://tcconline.utp.br/wp-content/uploads//2013/10/CIRURGIAS-RECONSTRUTIVAS-DE-TECIDOS-MOLES-EM-PEQUENOS-ANIMAIS.pdf>. Acesso dia 08 de janeiro de 2016

MORIOKA, L.R.I.; MATOS, A.P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E.S.; Floculação de *Chlorella sp.* produzido em concentração de dessalinização e estudo de métodos de extração de lipídeos intracelulares. **Quím. Nova vol. 37. n° 1**. São Paulo 2014.

MURADOR, P. Avaliação histofuncional de matriz heteróloga acelular como *scaffold* para células de músculo liso para implantes em uretra de coelhos. Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, Área de Reparação, Regeneração e Transplante de órgãos e Tecidos da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP, para obtenção do Título de Doutor. Disponível em http://acervodigital.unesp.br/handle/unesp/169046?locale=pt_BR. Acesso dia 17 de janeiro de 2016

NETO, N.T.; CHI, A.; PAGGIARO, A.O.; FERREIRA, M.C.; Tratamento cirúrgico das feridas complexas. **Revista de Medicina**, v.89, n.3 / 4 , 2010.

OLIVEIRA, L.L. de; Reconstituição vesical em Cães (Canis familiaris): Xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98 %. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal na Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2008. Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGANIMAL_3897_1253803509.pdf. Acesso dia 22 de janeiro de 2016

OSÓRIO JR. H.A.; SILVA, J.S.P.; BARBOZA, C.A.G.; ROCHA, H.A.O.; Estudo da descelularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxerto. Material do COLAOB- Congresso Latino Americano de órgãos Artificiais e Biomateriais. 22 a 25 de agosto de 2012. Natal/ RN. Disponível http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:U9C3fVVZKeMJ:www.metallum.com.br/7colaob/resumos/trabalhos_completos/06-039.docx+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Acesso dia 13 de janeiro de 2016

PAGGIARO, A.O.; MATHOR, M.B.; CARVALHO, V.F., de; PÓLO, E.; HERSON, M.R.; FERREIRA, M.C.; Estabelecimento de protocolo de glicerolização de membranas amnióticas para uso como curativo biológico. **Rev. Bras. Queimaduras**.2010; 9 91):2-6

PEREIRA, A.C.H.; FEITOSA, B.A.M.; ROCHA, R, da; CAVALCANTI, A.S.S.;Atrofia linear cutânea : Principais causas e alterações histológicas. **Infarma**, v.23, nº 1/2,2011.

PEREIRA, M.J.L.; GOULART, B.C.; PEREIRA, R.R.; FEIJÓ, R.; FREITAS, J.L.; Diminuição do tempo de maturação de matrizes de regeneração dérmica quando associados a uso de curativos de pressão negativa. **Rev. Bras. Queimaduras**. 2013; 12(3): 145-52

PERUZZO, A.M.; Avaliação mecânica e histológica de pericárdio bovino descelularizado submetido à pressão. Dissertação apresentada ao programa de Pós - Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências - Área de Concentração: Engenharia Biomédica.2013.Disponível:http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/985/1/CT_P PGEB_M_Peruzzo%2c%20Angela%20Maria_2013.pdf. Acesso dia 18 de janeiro de 2016

QUEIROZ, F.F.; CORDEIRO, G.C.; RODRIGUES, A.B.F.; SILVEIRA, L.S.da; Ensaio biomecânico da túnica albugínea bovina conservado em glicerina 98 % para utilização como membrana biológica . **Ciência Rural, Santa Maria, V. 42, N. 3., P.501-506, MAR. 2012**

QUITZAN, J.G. Avaliação funcional e histológica do enxerto tubular de matriz acelular arterial heteróloga como substituto da uretra em coelhos. Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Bases Gerais da Cirurgia. 2009. Disponível: **http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/99915/quitzan_jg_dr_botfm.pdf?sequence=1&isAllowed=y**. Acesso dia 13 de janeiro de 2015

RIBEIRO, G.; MASSOCO, C.O.; NETO, J.C.L. de; Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento. **Pesq. Vet. Bras. 32 (supl.1): 118-124, dezembro de 2012**

ROCHA, M.S.dos; Técnica cirúrgica incisional com bisturi *versus* Laser de CO₂: Estudo preliminar comparativo do processo de cicatrização. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa. 2013. Disponível em: **<https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6387>**. Acesso dia 15 de dezembro de 2015

RODRIGUES, B.F.F.S.; Engenharia de tecidos para regeneração da pele: Retrospectiva e perspectivas futuras. Tese de dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade Ciências da Saúde. 2012. Disponível:**http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3569/5/T_BarbaraRodrigues.pdf**Acesso dia 29 de dezembro de 2015

RODRIGUES, F.T.; Desenvolvimento de membranas acelulares de colágeno derivadas de pericárdio porcino para uso em engenharia de tecido. Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Química Analítica). 2011. Disponível em: **<file:///C:/FabianaTessariRodrigues.pdf>**. Acesso dia 08 de janeiro de 2016

SCHARDOSIM, J. M.; Adaptação transcultural e validação clínica do instrumento Neonatal Skin Condition Score para uso no Brasil. Dissertação de mestrato apresentado ao Programa de

Pós- Graduação em Enfermagem na Escola de Enfermagem da UFRGS .2012.Disponível:<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/67151/000872848.pdf?sequence=1>

SILVA, A.K.C., da; NETA, F.C.A. de; BESSA, M.S.H., de; O brincar como meio de intervenção terapêutica ocupacional na preparação de crianças para a balneoterapia. **Rev. Bras, Queimaduras**.2010;9 (4): 146-54

SILVA, V.S.dos; Avaliação da frequência de necrose e apoptose celular em doses Laser e Led na Região espectral do infravermelho- Estudo in vitro. Dissertação apresentada ao programa de Pós- Graduação em Engenharia Biomédica para obtenção do Título de mestre em Engenharia Biomédica. 2009. Disponível em: <http://biblioteca.univap.br/dados/000002/000002D7.pdf>. Acesso em 17 de janeiro de 2016.

SILVA, F.M.da; Modulação do sistema imunológico em pacientes transplantados - revisão bibliográfica . Monografia apresentada para obtenção do grau em licenciatura em biologia pela Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás. 2011. Disponível:http://bdm.unb.br/bitstream/10483/1744/1/2011_FranciscoMatosdaSilva.pdf. Acesso dia 12 de janeiro de 2016

SILVA, T.R.S., da; Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas. Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química. 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/103444/315365.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso dia 07 de dezembro de 2015

SINGH, A.K. & SHENOY, Y.R.; Skin Substitutes: An Indian perspective. **Indian J. Plast. Surg.** 2012. May- Aug, 45 (2): 388-395. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3495390/>. Acesso dia 03/01/16

SMANIOTTO, P.H.S.de; GALLI, R; CARVALHO, V.F.; de; FERREIRA, M.C.; Tratamento Clínico das feridas - curativos. **Rev. Med (São Paulo)**. 2010 jul. - dez.; 89 (3/4) : 137-41

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D.; BARROS, C.S.L; Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesq. Vet. Bras.**29 (2): 177-190, fevereiro 2009

WECKER, J.; SOARES, M. M.; Lenz, D.; Aula de Anatomia , 2015. Disponível em: **<http://www.auladeanatomia.com/site/index.php>**. Acesso dia 15 de dezembro de 2015

WOLLMANN, L.C.F.N. de; LAURINDO, C.A.H.; COSTA, F.D.A. da; MORENO, A.N.; Efeito da criopreservação e / ou da descelularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.** 2011; 26 (3): 490-6

Capítulo 2

Avaliação das propriedades físico-químicas e microbiológicas da solução supersaturada de açúcar a 300% conservada a 4^oC como meio de descclularização para enxertia cutânea

Formatado segundo as normas para publicação da
Revista Brasileira de Medicina Veterinária

Avaliação das propriedades físico-químicas e microbiológicas da solução supersaturada de açúcar a 300% conservada a 4^o C como meio de descclularização para enxertia cutânea

Evaluation of physico-chemical and microbiological the supersaturated solution of sugar 300% stored at 40C as a means of decellularization for skin grafting

ABSTRACT The tissue decellularization process allows the receiver to integrate the skin graft, enabling the synthesis of injury. In an attempt to find a substitute to glycerine, other means are studied, as is the case of supersaturated sugar solution. This work aimed to evaluate the physical, chemical and microbiological properties of supersaturated sugar solution 300% used as a means of decellularization and preservation of skin grafts, stored under refrigeration temperature. A fragment of canine cutaneous tissue was divided into 27 pieces and arranged to store in a supersaturated sugar solution to 300% under refrigeration temperature. Initially entire skin samples were collected (before fragmentation into 27 pieces) and the solution for microbiological evaluation. The solution was also subjected to evaluation physicochemical. After 48 hours of use of the solution as a preservative through the skin fragments were again subjected to microbiological evaluation. They were obtained as a result of pH 8.05, 25% moisture content and water activity 0.8487. Regarding microbiological skin assessment it was found contamination *Staphylococcus aureus*. After 48 hours of conservation in the middle just a tissue sample remained contaminated by *Staphylococcus aureus*. We conclude that the supersaturated solution of sugar 300% have antimicrobial potential from the 48 hours of conservation and the physicochemical characteristics of the product justifies the antimicrobial potential, as the decellularizing potential, being viable as a means of conservation and decellularization.

KEY WORDS: Wound healing; Skin substitutes; acellular skin

RESUMO O processo de descclularização tecidual permite ao receptor integrar o enxerto cutâneo, viabilizando a síntese da lesão. Na tentativa de achar um substituto para a glicerina, outros meios são estudados, como é o caso da solução supersaturada de açúcar. Esse trabalho objetivou-se avaliar as propriedades físico-químicas e microbiológicas da solução supersaturada de açúcar a 300% utilizada como meio de descclularização e conservação de

enxerto cutâneo, armazenada sob temperatura de refrigeração. Um fragmento de tecido cutâneo canino foi dividido em 27 pedaços e dispostos a armazenamento em uma solução supersaturada de açúcar a 300 %, sob temperatura de refrigeração. Inicialmente foram coletadas amostras da pele inteira (antes da fragmentação em 27 pedaços) e da solução para avaliação microbiológica. A solução também foi submetida a avaliação físico- química. Após 48 horas de uso da solução como meio conservante os fragmentos cutâneos foram novamente submetidos a avaliação microbiológica. Obtiveram-se como resultado pH 8,05, teor de umidade de 25 % e atividade de água 0,8487. Com relação a avaliação microbiológica da pele constatou-se contaminação por *Staphylococcus aureus*. Após as 48 horas de conservação no meio apenas uma amostra tecidual permaneceu contaminada por *Staphylococcus aureus*. Conclui-se que a solução supersaturada de açúcar a 300 % apresenta potencial antimicrobiano a partir dos 48 horas de conservação e que as características físico-químicas do produto justificam o potencial antimicrobiano, da mesma forma o potencial descelularizante, sendo viável como meio de conservação e descelularização.

PALAVRAS- CHAVE: Cicatrização de feridas; Substitutos cutâneos; Pele acelular.

INTRODUÇÃO

Qualquer material, seja ele biológico ou sintético, utilizado para ocluir temporariamente ou permanentemente uma lesão tecidual e agir otimizando o processo regenerativo epidérmico ou cicatricial dérmico é denominado de substituto cutâneo. (MESTRE et al., 2012).

Dos substitutos cutâneos, o enxerto cutâneo destaca-se pela possibilidade da autoenxertia, porém em diversas situações a escassez de pele para doação faz com que se tenha a necessidade da utilização de enxertos alógenos ou heteroenxertos. Apenas a autoenxertia não produz rejeição imunológica. Diante da possibilidade de rejeição imune, técnicas de descelularização são utilizadas visando a não permanência celular; entre elas a mais usada é a desidratação celular por imersão em glicerina (GOULART, 2010).

QUEIROZ et al. (2012) ressaltam que a glicerina é o meio de conservação mais utilizado, e que apresenta alto potencial antimicrobiano e descelularizante. Na tentativa de obter outro meio de conservação e descelularização, Junior (2014) verificou que o uso de solução supersaturada de açúcar a 300 % apresenta o mesmo potencial da glicerina.

O potencial descelularizante e conservativo de um meio está diretamente ligado ao seu potencial interativo com os constituintes estruturais da membrana celular. Essa interação está relacionada as propriedades físico-químicas do produto que proporcionam desidratação, choque osmótico e desequilíbrio iônico (OSÓRIO et al., 2012). O desenvolvimento microbiano em um determinado meio é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos ao produto. Temperatura, pH, teor de umidade, atividade água são exemplos desses fatores que inibem ou aceleram o desenvolvimento de determinados micro-organismos (BEZERRA et al., 2012).

Desta forma o objetivo desse trabalho foi realizar uma avaliação das propriedades físico-químicas e microbiológicas da solução supersaturada de açúcar a 300% utilizada como meio de descelularização e conservação de enxerto cutâneo, para verificar a viabilidade do uso dessa solução no processo descelularizante e conservante.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi avaliado pela Comissão de ética no uso animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco e está licenciado sob o número: 006/2016

O meio de solução supersaturada de sacarose foi preparado sob uma proporção de 3 gramas de açúcar cristal para 1 ml de água destilada estéril. A solução foi acondicionada em frascos de vidro previamente autoclavados. Após a disposição nos frascos, esses foram submetidos à fervura em banho- maria a 100 ° C por 1 hora e 40 minutos, tempo necessário para a completa dissolução dos cristais de açúcar e obtenção de uma solução homogênea, viscosa de coloração amarelo – âmbar (figura 1).



Figura 01- Solução supersaturada de sacarose

Após confecção, a solução foi homogeneizada em uma recipiente único e posteriormente transferida para 27 recipientes de plástico estéreis com a disposição de 20 ml de solução em cada recipiente. A transferência foi realizada na capela de fluxo laminar no laboratório de Doenças infecto- contagiosas no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Em seguida, procedeu-se a coleta da alíquota para a avaliação físico-química e microbiológica inicial do meio. Um fragmento de tecido cutâneo canino (proveniente da região torácica) foi retirado sob técnica de antisepsia cirúrgica descrita conforme Fossum (2015). Uma amostra de pele (obtida por meio de *swab* na superfície cutânea) foi levada a avaliação microbiológica. Esse fragmento foi dividido em 27 fragmentos, posteriormente submersos nos recipientes contendo o meio. O intuito da conservação foi verificar o potencial antimicrobiano da respectiva solução. Todos os recipientes foram armazenados sob refrigeração constante a uma temperatura de 4 °C por um período de 48 horas.

Avaliações Físico-químicas

A solução foi submetida as avaliações físico-químicas através dos testes de mensuração de pH com uso do pHmetro digital da marca HANNA, determinação de umidade com uso da estufa de dessecação por evaporação de igual marca e atividade água com uso do medidor analítico da marca AQUA LAB nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia Rural e no laboratório de Controle físico- químico de alimentos no Departamento de Economia Doméstica, ambos situados na UFRPE. As avaliações físico-químicas foram realizadas uma única vez logo após a confecção da solução supersaturada de açúcar. Todas as aferições foram realizadas em triplicata com o valor final representado pela média aritmética.

Avaliação microbiológica

A avaliação microbiológica consistiu em pesquisa de fungos e bactérias. Foi realizada no laboratório de Doenças infecto- contagiosas no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Pesquisa de fungo: Uma alíquota do meio obtida por meio de contato com *swab* foi inoculada em meio ágar fungobiótico e incubado a temperatura ambiente por 15 dias, com posterior leitura para identificação micológica através de aspectos macroscópicos.

Pesquisa de bactérias: A avaliação bacteriológica foi feita por meio de inoculação em superfície de placa contendo ágar sangue ovino 80 %. Inoculação por isolamento, com

posterior incubação em estufa a 37 ° C, seguida com leitura com 24 h, 48 h e 72 h. O resultado foi por meio de detecção do micro-organismo em positivo ou negativo, caso positivo seguiu com avaliação macroscópica, coloração de Gram e identificação do gênero.

Todos os dados foram avaliados por estatística descritiva de acordo com Pompei et al (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH da solução supersaturada de açúcar foi de 8,05. Esse valor confere alcalinidade ao produto. O organismo vivo adquire energia para as suas funções metabólicas por meio da oxigenação e posterior produção de ATP, em caso de cessação da respiração a produção de energia é conseguida por meio de processo fermentativos anaeróbicos com produção de ácido láctico, o que inevitavelmente faz baixar o pH tecidual deixando-o em torno de 5 a 5,5 (BATISTA, 2010).

De acordo com Figueira (2011) a reação entre ácido e base ocorre de forma rápida tendendo a neutralização. Essa reação funciona como modificadora da concentração iônica, causando desequilíbrio iônico e favorecendo processos degradativos celulares, desta forma o pH alcalino potencializa o processo descelularizante e neutraliza o pH tecidual.

O produto apresentou teor de umidade de 25 %, de acordo com Alcantara et al. (2012) produtos com alto teor de umidade proporciona o desenvolvimento microbiano, sendo a umidade encontrada na pesquisa fator de conservação tecidual por inibição das principais bactérias proteolíticas.

A atividade de água foi de 0,8487. Segundo Domingues et al. (2011) esse parâmetro está diretamente relacionado a probabilidade de desenvolvimento microbiano, uma vez que uma baixa atividade de água faz com que aumente o potencial osmótico e provoque a lise celular, tanto de micro-organismos quanto no tecido armazenado. Schlabit et al. (2010) destacam que uma atividade água inferior a 0,86 inibe o desenvolvimento da maioria das bactérias contaminantes, especialmente a ação dos *Staphylococcus aureus*. De acordo com Santana et al. (2010) essa bactéria é a principal contaminante na pele, já que é a principal comensal ao homem e aos animais saudáveis.

A solução supersaturada foi considerada estéril, pois não houve desenvolvimento microbiano (figura 02). O fato é justificado pela alta temperatura (100 °C) e pelo tempo de exposição (1 hora e 40 minutos) que foi submetida a solução durante seu processamento. Faé & Freitas (2009) destacaram que o calor é um dos principais métodos físico de controle microbiano, porém a sua exposição deve respeitar um tempo mínimo para que tenha ação antimicrobiana.

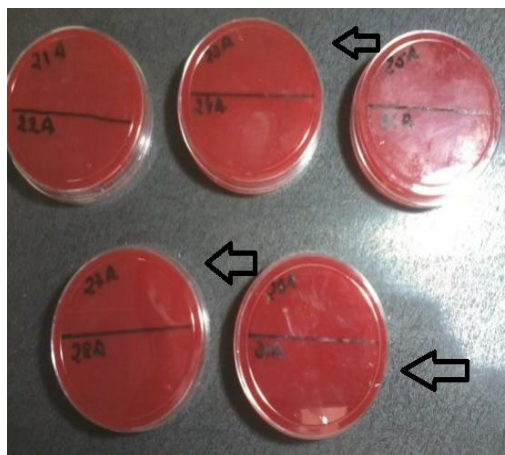


Figura 02- Resultados da inoculação em placa contendo ágar sangue ovino a 80 %. Seta mostrando ausência de crescimento microbiano – Solução supersaturada de açúcar a 300 %

A avaliação microbiológica do tecido cutânea foi apenas positiva para *Staphylococcus aureus*, apesar do tecido ter sido retirado conforme regras de antisepsia cirúrgica. A contaminação por *Staphylococcus aureus* torna-se frequente visto que é uma bactéria comensal a pele humana e animal. Barreto et al. (2009) identificaram essa bactéria na maioria das mãos de enfermeiras que trabalham na sala de recuperação pós-anestésica. Ratti e Sousa (2009) destacaram que as infecções nosocomiais causadas por *Staphylococcus aureus* são comuns em ambientes hospitalares devido a ampla distribuição do agente e da fácil contaminação. Penna et al. (2010) destacam que as bactérias do gênero *Staphylococcus* são comumente isoladas na pele de caninos sadios e doentes, assim como relaciona esse gênero a diversas piodermites. Santos et al. (2010) verificaram que a presença de bactérias desse gênero em hospital veterinário, apesar do controle rigoroso contra infecção hospitalar.

Dos 27 recipientes contendo a solução supersaturada de açúcar com o tecido submerso, apenas 1 (3,70%) amostra cutânea permaneceu contaminada após 48 horas de submersão no meio. Esse resultado contradiz a maioria dos achados relacionados ao estudo do

potencial antimicrobiano da solução supersaturada de açúcar, pois é preconizado um período mínimo de 30 dias de conservação para que se tenha potencial antimicrobiano, como destaca Araújo et al. (2009), Oliveira et al. (2009) e Pizo et al. (2016).

Diferentemente Júnior (2014) comparando a ação antimicrobiana da glicerina a 98 %, mel, solução supersaturada de sal e solução supersaturada de açúcar a 300 % na conservação de pericárdio bovino, constatou que a solução supersaturada de açúcar não promoveu inibição de desenvolvimento bacteriano aos 30 e 60 dias de armazenamento, considerando-a inapropriada para conservação do produto.

Oliveira et al., (2009); Araújo, (2009); Júnior et al. (2014) e Leal et al., (2014) realizaram seus experimentos armazenando os tecidos sob temperatura ambiente, no experimento em questão todos os recipientes foram armazenados sob temperatura de refrigeração a 4 ° C. O uso do frio pode ter atuado como fator otimizador do potencial antimicrobiano, pois ele represente um dos principais fatores extrínsecos utilizados para inibir desenvolvimento bacteriano, conforme cita Ferreira (2014).

CONCLUSÃO

A solução supersaturada de sacarose a 300 % refrigerada a 4°C apresentou potencial antimicrobiano a partir das 48 horas de conservação. Suas características físico-químicas justificam o potencial antimicrobiano, assim como o potencial descelularizante. Essa solução é viável para a conservação e descelularização tecidual.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente na confecção do experimento e ao apoio financeiro da CAPES- Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, M.; MORAIS, I.C.L.de; SOUZA, C.M.O.C.C.da; Principais micro-organismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** , v.6, n.1, p.1-20, jan- jun, 2012

ARAÚJO, C.B.P.; Principais aspectos cirúrgicos de hérnias diafragmáticas em pequenos animais. TCC para obtenção de título de médico veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2009. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/118090>. Acesso dia 27 de janeiro de 2016

BATISTA, D.F.A; Influência do pH 24 hora DA CARNE SUÍNA SOBRE DUAS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DE CARNE: COR E DRIP LOSS. HORIZONTE CIENTÍFICO. Volume 4, nº 1 (agosto 2010). Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/4362/5112>. Acesso dia 26 de janeiro de 2016

BARRETO, R.A.S.S.dos. ROCHA, L.O.; SOUZA E SILVA, A.C.; TIPPLE, A.F.V.; SUZUKI, K. BISINOTO, S.A.; Higienização das mãos: a adesão entre profissionais de enfermagem da sala de recuperação pós- anestésica. Rev. Eletr. Enf. 2009; 11(2): 334-40. Disponível:<http://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/36/1/v11n2a14.pdf>. Acesso dia 27 de janeiro de 2016

BEZERRA, M.V.P.; ABRANTES, M.R.; SILVESTRE, M.K.S.; SOUSA, E.S.; ROCHA, M.O.C.; FAUSTINO, J.G.; SILVA, J.B.A.; Avaliação microbiológica e físico-química de linguiça toscana no município de Mossoró, RN. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 297-300, abr./ jun. 2012.

DOMINGUES, F.N.; OLIVEIRA, M.D.S. de; SIQUEIRA, G.R.; ROTH, A.P.T.P.de; SANTOS, J. dos; MOTA, D.A.; Estabilidade aeróbia, pH e dinâmica de desenvolvimento de micro-organismos da cana- de -açúcar in natura hidrolisada com cal virgem. **R. Bras. Zootec.**,V.40, p. 715-719, 2011

FAÉ, T.S.M.; FREITAS, A.R.de; Avaliação do binômio tempo x temperatura na distribuição de alimentos, em uma unidade de alimentação e nutrição em Guarapuava- PR. TCC apresentado para obtenção do título de Nutricionista , pela Universidade Estadual do Centro- oeste . 2009. Disponível em:[http://www.unicentro.br/graduacao/denut/documentos/tcc/2009/TCC%202009%20\(TARLIS%20S.%20M.%20FA%C3%89\).pdf](http://www.unicentro.br/graduacao/denut/documentos/tcc/2009/TCC%202009%20(TARLIS%20S.%20M.%20FA%C3%89).pdf). Acesso dia 27 de janeiro de 2016

FIGUEIRA, M. INVESTIGANDO AS CONCEPÇÕES DOS ESTUDANTES DO ENSINO FUNDAMENTAL AO SUPERIOR SOBRE ÁCIDOS E BASES. REVISTA CIÊNCIAS & IDEIAS. VOLUME 03, Nº 01. 2011. Disponível em: <http://revistascientificas.ifrj.edu.br:8080/revista/index.php/reci/article/view/81/%C3%A1cido>. Acesso dia 26 de janeiro de 2016

FOSSUM, T.W. , Cirurgia de pequenos animais. 1º, 2015. Capítulo 6, página 28 **Editora Elsevier**

GOULART, B.C.; Análise do tempo de maturação dos implantes de matriz de regeneração dérmica utilizando curativos sob pressão negativa. TCC apresentado a Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a Conclusão do Curso de Graduação em Medicina. 2010. Disponível: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/120591/294957.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso dia 27 de dezembro de 2015

JÚNIOR, A.F.B.; LOPES, G.C.; CRISCI, A.R.; JÚNIOR, R.F.; GUIMARÃES, C.S.O. de; GUIMARÃES, G.C.; Análise morfológica e microbiológica do pericárdio bovino conservado em glicerina, açúcar, mel e sal. **Vet. Not. Uberlândia**, v. 20, n. 2, p. 15-24, juç./ dez. 2014.

LEAL, L.M. ; FERREIRA, A.R.S.; REAIS, A.C.G.; MARTINS, L.L; FILHO, S.P.G.; MACHADO, R.F.; O uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300 % ou glicerina a 98 % implantados na parede abdominal de ratos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 66, nº 5, p. 1383-1391, 2014

MESTRE, T.; RODRIGUES, A.; CARDOSO J.; Cicatrização de feridas crônicas - Algumas opções terapêuticas. **Revista SPDV** 70 (4) 2012.

OLIVEIRA, L.L.; SOUZA, D.B.; de; ABÍLIO, E.J.; CARVALHO, E.C. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **JBCA- Jornal Brasileiro de Ciência Animal** 2009, 2(3): 175-188

OSÓRIO JR. H.A.; SILVA, J.S.P.; BARBOZA, C.A.G.; ROCHA, H.A.O.; Estudo da descélularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxerto. Material do COLAOB- Congresso Latino Americano de órgãos Artificiais e Biomateriais. 22 a 25 de

agosto de 2012. Natal/ RN.

Disponível em http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:U9C3fVVZKeMJ:www.metallum.com.br/7colaob/resumos/trabalhos_completos/06-039.docx+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Acesso dia 13 de janeiro de 2016

PENNA, B.; VARGAS, R.G.; MEDEIROS, L. S. dos; MARTINS, G.M. S. de; MARTINS, R.R.; LILENBAUM, W.; Prevalência clínica de *Staphylococcus sp.* de origem canina e sua resistência In vitro aos antimicrobianos. **Clínica Veterinária**, n. 90, p. 82-88, 2011

PISO, D.Y.T.; RESTÁN, W.A.Z.; BARRETO, M.Y.P.; Implantes de membranas biológicas em cirurgia reconstructiva veterinaria: aspectos básicos y métodos de conservación . 2016. **Revista de Medicina Veterinária**, n° 31, Bogotá, Jan./ June.

POMPEI, J.C.A.; NARANJO, J.; MENDES, A.; MARTINI, M.; II curso de epidemiologia aplicada - TCT- MAPA/ OPAS- PANAFTOSA. Disponível em: <http://ww3.panaftosa.org.br/Comp/MAPA/442904.pdf>. Acesso dia 19 de fevereiro de 2016

QUEIROZ, F.F.; CORDEIRO, G.C.; RODRIGUES, A.B.F.; SILVEIRA, L.S.da; Ensaio biomecânico da túnica albugínea bovina conservado em glicerina 98 % para utilização como membrana biológica . **Ciência Rural, Santa Maria**, V. 42, N. 3., P.501-506, MAR. 2012

RATTI, R.P & SOUSA, C.P.; *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2009; 30(2): 9-16. Disponível em: http://servbib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/550/799. Acesso dia 08 de fevereiro de 2016

SANTOS, L.R. dos; NETO, J.F.S.; RIZZO, N.N.; BASTIANI, P.V.; RODRIGUES, L. B.; BARCELLOS, H.H. A. de.; BRUN, M. V.; Contaminação ambiental em um hospital veterinário e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas. **Ciência Animal Brasileira**. v. 11, n° 02, 2010.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON- ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C.; Estafilococos em alimentos. Artigo de Revisão. **Arq. Inst. Bio.**, São Paulo, v.77, n.3, p- 545-554, jul./ set.2010

SCHLABITZ, C.; SILVA, S.A.F.; SOUZA, C.F.V.; de; Avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos em mel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** , v04, n01, p. 80-90, 2010

Descelularização de tecido cutâneo canino utilizando método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguido de desidratação em glicerina) e método simples (desidratação em glicerina) – Análises histológicas.

Formatado segundo as normas para
publicação da Revista Brasileira de
Medicina Veterinária

Descelularização de tecido cutâneo canino utilizando método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguido de desidratação em glicerina) e método simples (desidratação em glicerina) – Análises histológicas.

Decellularization of canine skin tissue using combined method (osmotic shock with supersaturated sugar solution followed by dehydration of glycerin) and simple method (dehydration glycerin) - Histological analyzes.

ABSTRACT Only autologous skin grafts do not trigger immune response. Therefore, protocols aimed at decellularization should be established. Thus, this study aimed to verify the feasibility of the decellularization process in canine skin tissue using a combined method (osmotic shock with supersaturated sugar solution followed by dehydration of glycerin) and simple method (dehydration glycerin) by histological analysis. 54 skin fragments were prepared which were separated into six groups, each containing nine of them. The groups were classified into A1, A2, A3, G1, G2, G3. All fragments that received the nomenclature A were subjected to osmotic shock with the use of supersaturated sugar solution to 300% and that received G nomenclature were immersed in glycerin. The group A1 skin fragments were removed after 48 hours immersion in solution; A2 and A3 were submerged in glycerin to complete 15 days and 30 days respectively. The G1 were removed 48 hours, G2 and G3 15 days with 30 days. All containers were stored under refrigeration at 4 ° C temperature of each fragment pulled out a piece for making slides for histological evaluation. Tissues were evaluated under the Changing parameters on the morphology of superficial and deep dermal collagen fibers; Presence of epidermal cellular components; Presence of cellular components in the superficial dermis and the presence of cellular components in the deep dermis. The results classified the treatments effective, effective with changes in collagen fibers and not effective. Evaluated the results statistically by ANOVA and consisted that there was no significant difference between the treatments groups A and G, but the results related changes in the morphology of collagen fibers highlighted better conservation of fragments belonging to groups G. it follows that the process of decellularization per conjugate method (osmotic shock supersaturated sugar solution followed by glycerin dehydration) and simple method (dehydration of glycerol) is not feasible to produce decellularization in skin tissue canine, since there is no decellularization in epidermis only in dermal layers. The combined treatment causes changes in the morphology of collagen fibers, which did not contribute to the dermal remodeling process of the receiver.

KEY WORDS: Acellular; Skin; Reconstructive surgery

RESUMO Apenas os enxertos cutâneos autólogos não desencadeiam resposta imune. Diante disso, protocolos que visem a descelularização devem ser estabelecidos. Assim, esse trabalho objetivou verificar a viabilidade dos processos de descelularização em tecido cutâneo canino utilizando um método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguido de desidratação em glicerina) e método simples (desidratação em glicerina) através de análises histológicas. Foram confeccionados 54 fragmentos cutâneos que foram separados em seis grupos, cada um contendo nove deles. Os grupos foram classificados em A1, A2, A3, G1, G2, G3. Todos os fragmentos que receberam a nomenclatura A foram submetidos ao choque osmótico com uso de solução supersaturada de açúcar a 300 % e os que receberam a nomenclatura G ficaram imersos em glicerina. Os fragmentos de pele do grupo A1 foram retirados após 48 horas de imersão na solução; os A2 e A3 ficaram submersos em glicerina até completar 15 dias e 30 dias, respectivamente. Os do grupo G1 foram retirados com 48 horas, G2 com 15 dias e G3 com 30 dias. Todos os recipientes ficaram armazenados sob temperatura de refrigeração a 4 ° C. De cada fragmento retirou-se um pedaço para confecção de lâminas para avaliação histológica. Os tecidos foram avaliados sob os parâmetros de Alteração na morfologia das fibras colágenas dérmicas superficiais e profundas; Presença de componentes celulares epidérmicos; Presença de componentes celulares na derme superficial e Presença de componentes celulares na derme profunda. Os resultados classificaram os tratamentos em eficaz, eficaz com alteração nas fibras colágenas e não eficaz. Avaliaram os resultados estatisticamente pelo teste ANOVA e constatou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos dos grupos A e G, porém os resultados relacionados as alterações na morfologia das fibras colágenas destacou melhor conservação dos fragmentos pertencentes aos grupos G. Concluiu-se que processo de descelularização por método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguida de desidratação por glicerina) e por método simples (desidratação em glicerina) não são viáveis para produzir descelularização em tecido cutâneo canino, visto que não há descelularização na epiderme apenas nas camadas dérmicas. O tratamento conjugado promove alterações na morfologia das fibras colágenas, fato que não contribuiu para o processo de remodelamento dérmico do receptor.

PALAVRAS-CHAVE: Acelular ; Pele; Cirurgia Reconstructiva

INTRODUÇÃO

Diante da necessidade da utilização de enxertos cutâneos e da dificuldade de autoenxertia, peles acelulares são utilizadas como substitutos cutâneos visando a otimização do processo cicatricial (SILVEIRA, 2012).

Métodos físicos, químicos e enzimáticos são utilizados para promover descelularização. O tecido utilizado determina o método mais apropriado para interagir com as células e promover degradação, podendo ser uma técnica simples ou conjugada (OSÓRIO et al., 2012).

Dos métodos químicos, a desidratação por imersão em glicerina é eficaz, rápida e com baixo custo. Esse necessita de um tempo mínimo de imersão de 30 dias para que se obtenha um tecido estéril, acelular e com a matriz extracelular preservada (MURADOR, 2013).

A solução supersaturada de açúcar a 300 % é utilizada como meio alternativo para promoção de descelularização e conservação tecidual. A solução apresenta alto potencial osmótico, que causa acentuada desidratação e desequilíbrio iônico culminando com a lise celular, além do que suas características físico-químicas inviabilizam o crescimento microbiano e desta forma conservam o produto. O tecido também deve permanecer no mínimo 30 dias para ter sua ação (PISO et al, 2016).

Devido a ausência de protocolo padrão para promover descelularização em tecido cutâneo canino, esse trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade de um método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguido de desidratação em glicerina) e um método simples (desidratação em glicerina) através de análises histológicas do tecido cutâneo.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi avaliado pela Comissão de Ética e Uso Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco e está licenciado sob o número: 006/2016

O projeto foi elaborado em 5 etapas :

1-Preparação da solução supersaturada de açúcar a 300 %; disposição nos frascos da solução supersaturada de açúcar e da glicerina a 98 % :

O meio de solução supersaturada de sacarose foi preparado sob uma proporção de 3 gramas de açúcar cristal para 1 mL de água destilada estéril. Da solução transferiu-se 20 ml em 27 recipientes de plástico estéreis. A transferência foi realizada na capela de fluxo laminar no laboratório de Doenças infecto- contagiosas no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Da mesma forma procedeu-se com a disposição da glicerina a 98 %, onde foram colocados 20 mL da substância em 27 frascos de plásticos estéreis.

2- Retirada do fragmento cutâneo e imersão no meio :

Da região torácica de um canino (Cujo o óbito ocorreu por atropelamento, seis horas antes do procedimento) retirou-se dois fragmentos retangulares de tecido cutâneo com 30 cm de comprimento e 15 cm de largura cada e posteriormente divididos em pedaços com 4 cm de comprimento e 3 cm de largura. Esse tecido foi retirado sob técnica de antisepsia cirúrgica conforme descrito em Fossum (2015). Todo o tecido subcutâneo foi retirado dos fragmentos teciduais.

Cada fragmento foi imerso no meio de estudo e separados em 6 grupos, de acordo com a descrição a seguir, sendo retirados do meio de acordo com a cronologia citada:

.GRUPO A1: 9 enxertos conservados por 48 horas em solução supersaturada de açúcar a 300%.

.GRUPO A2: 9 enxertos conservados inicialmente por 48 horas em solução supersaturada de açúcar a 300% e depois conservados em glicerina a 98 % por 13 dias (totalizando 15 dias de imersão em meios conservantes).

.GRUPO A3: 9 enxertos conservados inicialmente por 48 horas em solução supersaturada de açúcar a 300% e depois conservados em glicerina a 98 % por 28 dias (totalizando 30 dias de imersão em meios conservantes).

.GRUPO G1: 9 enxertos conservados em glicerina a 98 % por 48 horas.

.GRUPO G2: 9 enxertos conservados em glicerina a 98 % por 15 dias.

.GRUPO G3 : 9 enxertos conservados em glicerina a 98 % por 30 dias.

Os recipientes permaneceram armazenados sob temperatura de refrigeração a 4 ° C durante todo o experimento.

4- Preparação do material para avaliação histológica

Todos os fragmentos foram fixados em solução de Boiun por 24 horas e após conservados em álcool a 70 ° GL até o momento da avaliação histológica. A desidratação

ocorreu por imersões subsequentes em álcool de concentrações crescente até a 100 ° GL, clareamento em imersão com xilol, inclusão em parafina, corte com micrôtomos manual com posterior coloração por hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori. As lâminas para avaliação foram confeccionadas no Laboratório de Citologia e Histologia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

5- Parâmetros para a avaliação histológica:

Todos os fragmentos foram avaliados de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1- Alteração na morfologia das fibras colágenas dérmicas superficiais e profundas
- 2- Presença de componentes celulares epidérmicos
- 3- Presença de componentes celulares na derme superficial
- 4- Presença de componentes celulares na derme profunda

Os resultados foram qualificados em 0 (ausência), + (discreta presença), ++ (moderada presença) e +++ (intensa presença). Após a análise dos dados, cada fragmento foi classificado com relação a descelularização em :Eficaz, não eficaz ou Eficaz com alteração na morfologia das fibras (Quadro 1).

Quadro 01 - Orientação para classificação dos tratamentos

Parâmetros	Eficaz	Eficaz, porém com alteração na morfologia	Não eficaz
Alteração na morfologia das fibras colágenas	De ausência a discreta presença	De moderada a intensa	De moderada a intensa
Presença dos componentes celulares epidérmicos	De ausência a discreta presença	De ausência a discreta presença	De moderada a intensa
Presença dos componentes celulares na derme superficial	De ausência a discreta presença	De ausência a discreta presença	De moderada a intensa
Presença dos componentes celulares na derme profunda	De ausência a discreta presença	De ausência a discreta presença	De moderada a intensa

Todos os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância – ANOVA com um nível de significância de 5% e estatística descritiva de acordo com Pompei et al (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos fragmentos cutâneos conservados em solução supersaturada por 48 horas (GRUPO A1), um (1/9) foi considerado eficaz no processo descelularizante com alteração na morfologia das fibras. Leal (2013) afirmou que o processo de descelularização tecidual por meio do uso da solução supersaturada de açúcar a 300 % necessita de no mínimo 30 dias de imersão para seu efeito. Esse fato representa uma possibilidade na utilização precoce dos enxertos, perspectiva importante frente a grande demanda na utilização de pele acelular e do longo tempo para sua obtenção.

O mesmo resultado foi encontrado nos fragmentos cutâneos conservados em glicerina (GRUPO G1) após 48 horas (1/9). Esse resultado corrobora com informação de Júnior et al. (2014) que destaca igual potencial descelularizante tanto para a glicerina quanto para a solução supersaturada de açúcar a 300 %.

88,88 % (8/9) dos fragmentos do grupo A2 apresentaram descelularização na derme superficial e profunda com discreta a moderada presença de células, porém em apenas um (11,11%) (1/9) fragmento houve descelularização moderada na epiderme, sendo esse considerado eficaz no processo descelularizante com alteração na morfologia das fibras. Um (11,11%) dos fragmentos do grupo A2 não foi considerado eficaz. Martins (2010) informou que o tecido cutâneo é constituído por 2 camadas denominadas de epiderme e derme, que diferem entre si por suas células, disposição celular e presença da matriz extracelular. Rocha (2013) destaca que a epiderme é constituída por células justapostas, unidas entre si por junções intercelulares apresentando pouca matriz extracelular. Essas características faz da epiderme um tecido de revestimento com a função de ser a primeira barreira protetora do organismo, justificando a resistência dessa camada as agressões externas, nesse caso não ocorrendo descelularização por desidratação.

Esses resultados permaneceram constantes aos grupos A2, A3, G2 e G3. Esses dados contribuem com os resultados de Leal et al. (2014) que verificaram biocompatibilidade

semelhante com uso de enxertos conservados em glicerina e em solução supersaturada de açúcar, destacando igual potencial descelularizante, da mesma forma Júnior et al, (2014) que obtiveram mesmo nível de integridade da matriz extracelular nas amostras de pericárdio bovino conservadas em glicerina e em solução supersaturada de açúcar.

Neste estudo apenas a derme apresentou descelularização. Esse resultado corrobora com a afirmação de Maia (2010) que destaca a necessidade da remoção da epiderme para produção de matriz dérmica acelular, já que a epiderme é resistente a diversas agressões externas.

Com relação a alteração na morfologia das fibras colágenas, 81 % (21/27) dos fragmentos dos grupos A (A1, A2 e A3) apresentaram alterações de intensidade moderada a intensa (fig. 1). 75 % (20/27) dos fragmentos dos grupos G (G1, G2 e G3) não apresentaram alterações na morfologia das fibras colágenas (fig. 2). Esse resultado contradiz o verificado por Júnior et al. (2014) que comparando pericárdio bovino conservado em glicerina, solução supersaturada de açúcar e em mel verificaram que não houve alteração nas fibras colágenas decorrente da conservação com todos os meios de estudo. Perruzo (2013) destaca que a manutenção da integridade da matriz extracelular favorece o processo reparativo, pois os fibroblastos do receptor utilizam essa matriz para promover o remodelamento tecidual.

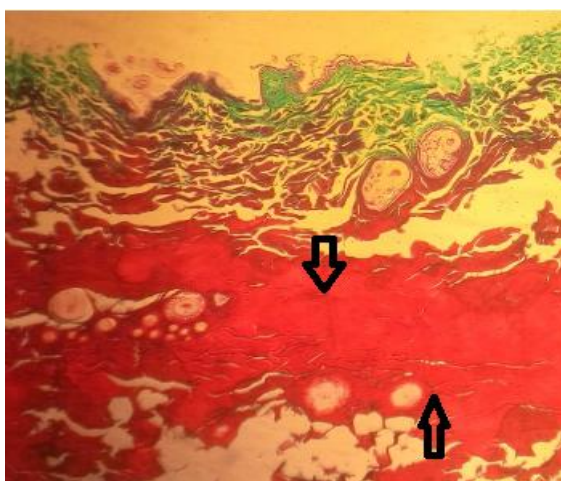


Figura 01- Pele conservada em solução supersaturada de açúcar a 300 % (GRUPO A2). Seta mostrando alteração na morfologia das fibras colágenas (Coagulação das fibras com

extravasamento de conteúdo citoplasmático). Coloração Tricrômico de Gomori. Objetiva 40 x

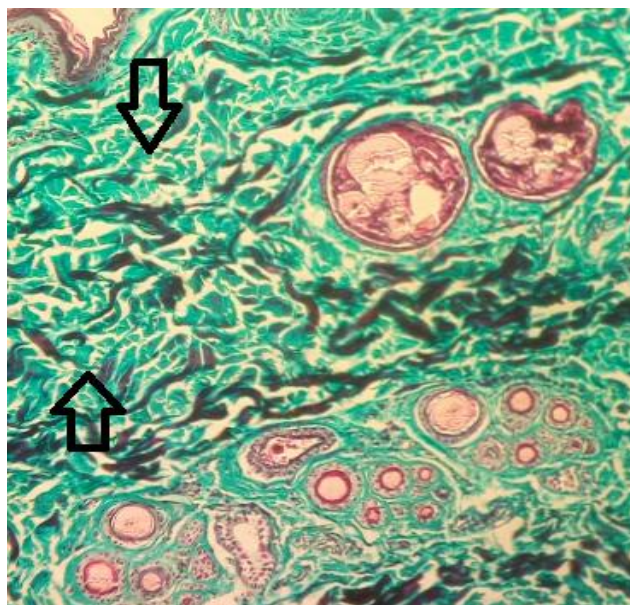


Figura 02- Pele conservada em glicerina a 98 % (GRUPO G2). Seta mostrando conservação das fibras colágenas. Coloração Tricrômico de Gomori, objetiva 40 x.

Os resultados não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% na análise dos dados, porém os resultados relacionados as alterações na morfologia das fibras colágenas destacou melhor conservação dos fragmentos pertencentes aos grupos G.

CONCLUSÃO

O processo de descélularização por método conjugado (choque osmótico com solução supersaturada de açúcar seguida de desidratação por glicerina) e por método simples (desidratação em glicerina) não são viáveis para produzir descélularização em tecido cutâneo canino, visto que não há descélularização na epiderme apenas nas camadas dérmicas. O tratamento conjugado promove alterações na morfologia das fibras colágenas, fato que não contribui para o processo de remodelamento dérmico do receptor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente na confecção do experimento e ao apoio financeiro da CAPES- Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FOSSUM, T.W. , Cirurgia de pequenos animais. 1º, 2015. Capítulo 6, página 28 **Editora Elsevier**
- JÚNIOR, A.F.B.; LOPES, G.C.; CRISCI, A.R.; JÚNIOR, R.F.; GUIMARÃES, C.S.O. de; GUIMARÃES, G.C.; Análise morfológica e microbiológica do pericárdio bovino conservado em glicerina, açúcar , mel e sal. **Vet. Not. Uberlândia**, v.20, n.2, p. 15-24, juç./ dez. 2014
- LEAL, L.M. Morfologia e estereologia do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300 % ou glicerina a 98 % implantados na parede abdominal de ratos. Dissertação apresentada à faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, para a obtenção de Título de Mestre em Cirurgia Veterinária. 2013. Disponível em :http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/86627/leal_lm_me_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso dia 17 de janeiro de 2016
- LEAL, L.M. ; FERREIRA, A.R.S.; REAIS, A.C.G.; MARTINS, L.L; FILHO, S.P.G.; MACHADO, R.F.; O uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300 % ou glicerina a 98 % implantados na parede abdominal de ratos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 66, nº 5, p. 1383-1391, 2014
- MAIA, L.P. Avaliação in vitro de matriz dérmica acelular como arcabouço tridimensional para cultivo de fibroblastos gengivais. 2010. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de mestre. Disponível em: [file:///C:/me_luciana_maia%20\(1\).pdf](file:///C:/me_luciana_maia%20(1).pdf). Acesso dia 16/02/2016
- MARTINS, J. M.; Uso da babosa (*Aloe vera*) na reparação de feridas abertas provocadas cirurgicamente em cães, 2010. Monografia apresentada para obtenção de Título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Campina / PATOS. Disponível:http://www.cstr.ufcg.edu.br/grad_med_vet/mono2010_1/mono_juliana.pdf. Acesso dia 15 de agosto de 2015
- MURADOR, P. Avaliação histofuncional de matriz heteróloga acelular como *scaffold* para células de músculo liso para implante em uretra de coelhos. Tese apresentada ao programa

de Pós- Graduação em Bases Gerais da Cirurgia. Área de Reparação, Regeneração e Transplante de Órgãos e Tecidos da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP para obtenção do Título de Doutor. Disponível em: http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/105885/murador_p_dr_botfm.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso dia 09 de fevereiro de 2016

OLIVEIRA, L.L. de; Reconstituição vesical em Cães (*Canis familiaris*): Xenoenxerto com túnica albugínea bovina conservada em glicerina a 98 %. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal na Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2008. Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGANIMAL_3897_1253803509.pdf. Acesso dia 22 de janeiro de 2016

OSÓRIO JR. H.A.; SILVA, J.S.P.; BARBOZA, C.A.G.; ROCHA, H.A.O.; Estudo da descelularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxerto. Material do COLAOb- Congresso Latino Americano de órgãos Artificiais e Biomateriais. 22 a 25 de agosto de 2012. Natal/ RN. Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:U9C3fVVZKeMJ:www.metallum.com.br/7colaob/resumos/trabalhos_completos/06-039.docx+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br. Acesso dia 13 de janeiro de 2016

PERUZZO, A.M.; Avaliação mecânica e histológica de pericárdio bovino descelularizado submetido à pressão. Dissertação apresentada ao programa de Pós - Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências - Área de Concentração: Engenharia Biomédica. 2013. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/985/1/CT_PPGE_B_M_Peruzzo%2c%20Angela%20Maria_2013.pdf. Acesso dia 18 e janeiro de 2016

PISO, D.Y.T.; RESTÁN, W.A.Z.; BARRETO, M.Y.P.; Implantes de membranas biológicas em cirurgia reconstructiva veterinária: aspectos básicos y métodos de conservación . 2016. **Revista de Medicina Veterinária**, n° 31, Bogotá, Jan./ June.

ROCHA, M.S.dos; Técnica cirúrgica incisional com bisturi *versus* Laser de CO2: Estudo preliminar comparativo do processo de cicatrização. Dissertação de mestrado integrado em

Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa. 2013. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6387>. Acesso dia 15 de dezembro de 2015

POMPEI, J.C.A.; NARANJO, J.; MENDES, A.; MARTINI, M.; II curso de epidemiologia aplicada - TCT- MAPA/ OPAS- PANAFTOSA. Disponível em: <http://ww3.panaftosa.org.br/Comp/MAPA/442904.pdf>. Acesso dia 19 de fevereiro de 2016

SILVEIRA, V.S. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO EM ENXERTOS DE DERME ACELULAR, ESTIMULADOS POR LASER NÃO ABLATIVO. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em odontologia na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2012. Disponível em: <http://repositorio.pucrs.br:8080/dspace/bitstream/10923/890/1/437947.pdf>. Acesso dia 09 de fevereiro de 2016.