



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM MEDICAMENTOS**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL**

**SOPHIA MARTINS DA SILVA**

**UTILIZAÇÃO DE AGENTE DE RETICULARIZAÇÃO EM  
MATRIZ DESCELULARIZADA (*SCAFFOLD*) DE PELE DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*) PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL  
COM APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA**

**FORTALEZA**

**2023**

SOPHIA MARTINS DA SILVA

UTILIZAÇÃO DE AGENTE DE RETICULARIZAÇÃO EM  
MATRIZ DESCELULARIZADA (*SCAFFOLD*) DE PELE DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*) PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL  
COM APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional da Faculdade de Medicina do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier

**FORTALEZA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D11u da Silva, Sofphia Martins.  
Utilização de agente de reticularização em matriz descelularizada (scaffold) de pele de tilápia (oreochromis niloticus) para o desenvolvimento de biomaterial com aplicação em medicina regenerativa / Sofphia Martins da Silva. – 2023.  
97 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues.

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

1. Tilápia. 2. Matriz Extracelular. 3. Cross-linking. 4. Glutaraldeído. I. Título.

CDD 610

---

SOPHIA MARTINS DA SILVA

**UTILIZAÇÃO DE AGENTE DE RETICULARIZAÇÃO EM  
MATRIZ DESCELULARIZADA (*SCAFFOLD*) DE PELE DE TILÁPIA  
(*Oreochromis niloticus*) PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL  
COM APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional da Faculdade de Medicina do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvidos em Medicamentos da Universidade Federal do Ceará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues (Orientador)  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Maria Elisa Quezado Lima Verde  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

Prof. Dr. Paulo Goberlanio de Barros Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação existe uma verdade elementar: no momento em que nos comprometemos, a Providência também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor. Como resultado da decisão, seguem-se todas as formas de coincidências, encontros e ajuda, que nenhum homem jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém, em si mesma, o poder, o gênio e a magia.”

*Goethe*

A Deus, minha família, amigos e a Ciência.  
*Minhas maiores fontes de alegria e inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ressignificar a sabedoria todos os dias no meu viver. Por ser o meu melhor e fiel amigo, a luz do meu viver. Por me amar incondicionalmente.

À minha querida família – aos meus pais **Josefa Maria** e **Geraldo Martins** por serem a personificação do amor, coragem e determinação. Por ter instigado desde pequena e deixado viva a Ciência dentro de mim. Aos meus irmãos amados – **Stephani** e **Dhelps**, que sempre me apoiam e incentivam a atingir com êxito os meus objetivos. Vocês são os meus melhores companheiros de vida. Aos meus avós **Dona Chiquinha** e **Seu Pedro Silva** por me amar e me ensinar sua sabedoria todos os dias. Ao meu tio **Expedito Martins** (*in memoriam*) que sempre estará guardado em meu coração por ter sido a minha maior referência de humildade e sabedoria. Vocês são o verdadeiro significado de amor, companheirismo e união para mim. Tudo por vocês e para vocês! Obrigada por tanto!

Ao meu querido orientador, professor **Dr. Felipe Rocha**, por acreditar no meu potencial desde as minhas iniciações científicas no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE). Sou imensamente grata por sempre se preocupar com a minha formação científica. Obrigada pela guia, parceria, paciência e confiança em todas as minhas etapas acadêmicas. Sou grata pela amizade, valiosos ensinamentos e por inspirar a todos na docência e na pesquisa; por me conduzir com sabedoria a concretização dos meus sonhos profissionais desde a graduação. A sua humildade foi imprescindível para me guiar e reestabelecer o ânimo quando me senti sem luz durante os experimentos. Obrigada por ser uma grande referência para os seus alunos tanto profissional quanto (principalmente) ser humano.

Ao meu querido coorientador, professor **Dr. Carlos Paier** pela disponibilidade para me ajudar, dedicação e amizade. Seus inúmeros rascunhos explicativos de no mínimo 4h foram preciosos e fundamentais. Seus *podcasts* são os únicos áudios que imprescindivelmente devem ser ouvidos na velocidade normal (1x) na vida. (haha) São verdadeiros guias científicos. Um grande e valioso Mestre. Muito obrigada pelos conselhos e ricas ideias. Grata de coração pela orientação, paciência e carinho.

A querida professora **Dra. Ana Paula Negreiros** pelo conhecimento elementar e paciência. Sua contribuição foi enriquecedora para esse trabalho. Ao queridíssimo professor **Dr. Paulo Goberlânio** por estar disponível e ser tão empático. A estatística mostrou-se linda e ‘prática’ a partir dos seus ensinamentos! (haha) Obrigada pela exime contribuição nesse trabalho. Imensa gratidão pela paciência de todos que me ajudaram no Laboratório de

Histopatologia da Odontologia (UFC). Foram tantas tardes de testes, trocas de ideias sobre o projeto e risos compartilhados em meio ao desafio de tantas amostras em tão pouco tempo, que nos tornamos amigos. Obrigada **Farah, Isaquiel, Imaculada e Alceu** pela paciência e carinho. Vocês são incríveis!

Aos meus queridos amigos que o IFCE me apresentou e que aqueceram meu coração com alegria ao me ajudarem nos longos processos de produção dos *scaffolds*, em especial a **Luesley Rodrigues e Evillyn Karen**. Vocês são portos de alegria no meu viver, melhores que qualquer tesouro. **Anne Louise, Ivana Diógenes e Jonh Mateus**, pela amizade valiosa, alegria e apoio diário mesmo a distância. Obrigada por me visitar e ter um grande abraço amigo com palavras de sabedoria. Vocês sempre são fundamentais nos momentos mais difíceis, pois, possuem os abraços mais companheiros e sinceros. Sou apaixonada por nossa amizade de anos.

As minhas queridas amigas dos Laboratórios LAFICA e Química Medicinal que a pós-graduação me apresentou – **Gisele Lima, Aurilene Cajado, Islay Magalhães e Talita Lima**. As minhas doces companhias **Sra. Ivaneide e Sr. Joacir** que abriram as portas de seu lar e me acolheram em Fortaleza como parte da família; e, também aos queridos **Sr. Mauro e Sr. Servilho** pelas boas conversas, ideias e café aos finais de semana entre um experimento e outro. A todos digo: os dias tornaram-se mais felizes e risonhos com vocês! Os almoços foram nosso *point* de alegria e conversas científicas. Os inúmeros finais de semana de trabalho foram mais leves. O apoio incondicional, carinho e ombro amigo foram imprescindíveis para o meu prosseguir. Vocês moram no meu coração.

Que possamos sempre ter amigos ao encontro dos braços e abraços da vida; e, por isso, meu imenso carinho pelo companheirismo e palavras de incentivo que recebi dos meus amigos queridos!

A toda equipe composta pelos meus colegas de pós-graduação do **laboratório de Cicatrização do projeto Pele de tilápia** que auxiliaram nos dias de pesquisa e diversos experimentos, sou grata pela partilha; especificamente, a **Nathaly Mendoza** pela paciência e dedicação sem igual nos inúmeros testes de citotoxicidade. As meninas da Iniciação Científica – **Gabriella, Clara e Vitória** pela disponibilidade e carinho em nos ajudar sempre e em tudo. A coordenadora da área veterinária do projeto tilápia – **Dra. Behatriz Odebrech** pela amável amizade compartilhada, cumplicidade e carinho sem igual. Uma grande amiga. E, especialmente, ao coordenador geral da pesquisa **Dr. Edmar Maciel**, por ter me recebido de braços abertos no grupo e sempre ser muito acolhedor e complacente em tudo. É uma dádiva



e honra participar da sua equipe.

No mais, minha eterna gratidão aos meus queridos professores da pós-graduação, cada um marcou e contribuiu significativamente na minha formação pessoal e acadêmica sendo inspirações na docência, pesquisa e extensão, verdadeiros mestres. Já dizia Antoine de Saint-Exupéry “*Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.*”

Agradeço a todos que participaram diretamente e indiretamente para a produção dessa pesquisa e contribuíram para a realização de mais esse sonho profissional. Minha gratidão pelas amizades compartilhadas, risos e lembranças que eternizarão na minha memória.

Meus sinceros agradecimentos ao **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos (NPDM)** da **Universidade Federal do Ceará (UFC)** por ter se tornado um “lar” durante os últimos meses e também pela excelente parceria em diversos laboratórios para o desenvolvimento dos meus experimentos.

Este trabalho foi realizado com o auxílio da **Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa – FUNCAP.**

**UTILIZAÇÃO DE AGENTE DE RETICULARIZAÇÃO EM MATRIZ DESCELULARIZADA (*SCAFFOLD*) DE PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL COM APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA. Sophia Martins da Silva. Orientador: Prof. Dr. Felipe Augusto Rocha Rodrigues. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional. Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Faculdade de Medicina, UFC. Fortaleza, 2023.**

Os dispositivos médicos derivados de matriz extracelular (MEC) de origem animal disponíveis no mercado apresentam custo elevado e são pouco acessíveis para a população de baixa renda. Para atender os critérios de um bom material, são necessários testes que garantam resistência e sejam promissores na relação custo/benefício aos pacientes. Reconhecendo o grande valor terapêutico da pele de tilápia e do já desenvolvido *scaffold*, é preciso otimizar essa matriz e modificar as propriedades estruturais para que adquiram durabilidade, resistência e biocompatibilidade com fins nas aplicações internas e reconstrutivas de medicina regenerativa. Tais propriedades podem ser melhoradas por meio da reticulação, ou seja, adição de ligações cruzadas (*crosslinkings*) na estrutura proteica da matriz extracelular da pele. Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de produção da matriz proteica descclularizada (*scaffold*) reticulado, derivada da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Para tanto, os *scaffolds* foram produzidos e, em seguida, foram submetidos aos protocolos de modificação da matriz descclularizada pela adição do agente de reticulação química Glutaraldeído (GTA). O desenho experimental consistiu em: 4 protocolos (4 concentrações - 0,05%, 0,25%, 0,625% e 1% e 2 tempos de incubação distintos - 24h e 72h), totalizando 8 grupos testes em comparação com o *scaffold* sem tratamento e a pele de tilápia *in natura*. Todas as amostras foram submetidas a análise histológica (Hematoxilina- Eosina - HE e *Picrosirius Red*), tensiométrica, bioquímica (degradação e hidrólise) e citotóxica seguindo a normativa ISO 10993-5:2009. Os dados quantitativos foram analisados por meio do teste ANOVA (especificar pós testes), com índice de significância de 95%, através do *software* GraphPad Prism®. Os resultados demonstram que protocolo de reticulação em menor concentração (0,05%) e tempo de incubação (24h) foi o mais promissor para futuros testes *in vivo*. A adição de ligações cruzadas possibilitou menor nível de biodegradação enzimática (DH), otimizou a organização fibrilar tanto em espessura quanto em quantificação de colágeno total, tipo I e III e a proporção I>III. A característica estrutural do biomaterial (*scaffold* sem tratamento) foi conservada em todos os protocolos, exceto na maior concentração (1%) independente do tempo de incubação. Após a reticulação, o biomaterial apresentou maior resistência a tração, demonstrando maior grau de rigidez e elasticidade da matriz, corroborando com os achados histológicos. Todos os protocolos testados foram aprovados no teste de citotoxicidade. Todos os protocolos demonstram similaridade com a pele de tilápia *in natura* em aspectos de resistência mecânica e biocompatibilidade *in vitro*. Em relação a otimização do tempo, a maior vantagem é a relação custo/benefício no processo de produção do biomaterial; pois, em menores concentrações e em menor tempo de contato do *scaffold* com o GTA é obtido uma maior resistência física (elasticidade), bioquímica (menor ação de lise enzimática) e biocompatibilidade *in vitro*. Por fim, a MEC descclularizada e reticulada demonstrou melhor comportamento biológico e estabilidade do colágeno com capacidade de resistência à ação enzimática biodegradante *in vitro* em menores concentrações e tempos de contato com o agente GTA. Futuros testes *in vivo* auxiliarão a compreender a durabilidade a longo prazo desse biomaterial para fins de cirurgias internas e reconstrutivas na medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** Tilápia. Matriz Extracelular. *Cross-linking*. Glutaraldeído.

## ABSTRACT

### USE OF RETICULARIZATION AGENT IN DECELLULARIZED MATRIX (SCAFFOLD) OF TILAPIA SKIN (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) FOR THE DEVELOPMENT OF BIOMATERIALS WITH APPLICATION IN REGENERATIVE MEDICINE

Medical devices derived from extracellular matrix (ECM) of animal origin available on the market are expensive and inaccessible to the low-income population. To meet the criteria of a good material, tests are needed that guarantee resistance and are promising in terms of cost/benefit for patients. Recognizing the great therapeutic value of tilapia skin and the already developed *scaffold*, it is necessary to optimize this matrix and modify the structural properties so that they acquire durability, resistance and biocompatibility for purposes in internal and reconstructive applications of regenerative medicine. Such properties can be improved through reticularization, that is, the addition of *crosslinks* in the protein structure of the extracellular matrix of the skin. Therefore, this work aimed to develop a protocol for the production of reticular decellularized protein matrix (*scaffold*) derived from tilapia skin (*Oreochromis niloticus*). For this purpose, the *scaffolds* were produced and then submitted to decellularized matrix modification protocols by adding the chemical crosslinking agent Glutaraldehyde (GTA). The experimental design consisted of: 4 protocols (4 concentrations - 0.05%, 0.25%, 0.625% and 1% and 2 different incubation times - 24h and 72h), totaling 8 test groups compared to the *scaffold* without treatment and fresh tilapia skin. All samples were submitted to histological analysis (Hematoxylin-Eosin - HE and *Picrosirius Red*), tensiometric, biochemical (degradation and hydrolysis) and cytotoxic analysis following ISO 10993-5:2009. Quantitative data were analyzed using the ANOVA test (specify post tests), with a significance level of 95%, using the GraphPad Prism® software. The results demonstrate that crosslinking protocol at lower concentration (0.05%) and incubation time (24h) was the most promising for future *in vivo* tests. The addition of *cross-links* enabled a lower level of enzymatic biodegradation (DH), optimized fibrillar organization both in thickness and in quantification of total collagen, types I and III and the proportion I/>III. The structural characteristic of the biomaterial (*scaffold* without treatment) was preserved in all protocols, except for the highest concentration (1%) regardless of the incubation time. After reticularization, the biomaterial showed greater resistance to traction, demonstrating a greater degree of rigidity and elasticity of the matrix, corroborating the histological findings. All tested protocols passed the cytotoxicity test. All protocols demonstrate similarity with fresh tilapia skin in terms of mechanical resistance and *in vitro* biocompatibility. Regarding time optimization, the biggest advantage is the cost/benefit ratio in the biomaterial production process; because, at lower concentrations and shorter contact time between the *scaffold* and the GTA, greater physical resistance (elasticity), biochemical resistance (less enzymatic lysis action) and *in vitro* biocompatibility are obtained. Finally, the decellularized and reticularized ECM showed better biological behavior and collagen stability with resistance capacity to the *in vitro* biodegradable enzymatic action at lower concentrations and contact times with the GTA agent. Future *in vivo* tests will help to understand the long-term durability of this biomaterial for internal and reconstructive surgeries in regenerative medicine.

**Keywords:** Tilapia. Extracellular Matrix. *Cross-linking*. Glutaraldehyde.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia da pele de tilápia e pele humana sem e com polarização de luz pela técnica histológica de <i>Picrosirius red</i> , aumento (400x).....	22
Figura 2 - Avaliação do perfil de colágeno em tecido conjuntivo de tilápia e humano .....	23
Figura 3 - Mecanismo de reação de reticularização de moléculas de colágeno por Glutaraldeído .....	29
Figura 4 - Resumo das possíveis formas de Glutaraldeído em solução aquosa .....	30
Figura 5 - Etapas do protocolo de produção da matriz dérmica acelular oriunda da pele de tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	34
Figura 6 - Etapas do protocolo de reticularização pelo agente Glutaraldeído na matriz dérmica acelular oriunda da pele de tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	36
Figura 7 - Reação OPA .....	39
Figura 8 - Amostras do <i>scaffold</i> após o processamento por meio de todos os protocolos de reticularização com GTA por 24h e 72h.....	44
Figura 9 - Amostras das lâminas de Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 200x do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	46
Figura 10 - Perfil de colágeno do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h sem e com a polarização de luz ( <i>Picrosirius Red</i> , 400x).....	50
Figura 11 - Perfil (%) do colágeno total, tipo I e tipo III e relação do tipo I e tipo III do <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h com e sem a polarização de luz ( <i>Picrosirius Red</i> , 400x).....	52
Figura 12 - Quantificação do nível de degradação das proteínas totais (mg) da pele de tilápia <i>in natura</i> e do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h (Gráfico A) e 72h (Gráfico B) após a hidrólise ácida .....	54
Figura 13 - Quantificação do nível de hidrólise (DH) pela enzima Bromelaína com o método NOPA (média $\pm$ EPM) da pele de tilápia <i>in natura</i> e do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h (Gráfico A) e 72h (Gráfico B).....	56
Figura 14 - Teste mecânico de microtração da Máxima Carga (N) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	58

Figura 15 - Teste mecânico de microtração da Deformação em Máximo Carga (%) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	60
Figura 16 - Teste mecânico de microtração Esforço da tração em quebra (MPa) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	62
Figura 17 - Teste mecânico de microtração Extensão de tração em quebra (cm) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	64
Figura 18 - Fotomicrografias das culturas de células L929 previamente plaqueadas a $0,1 \times 10^6$ cells.mL <sup>-1</sup> após 24h de incubação (células incubadas com o extrato do <i>scaffold</i> sem tratamento reticularizante) (200x) .....	65
Figura 19 - Fotomicrografias das culturas de células L929 previamente plaqueadas a $0,1 \times 10^6$ cells.mL <sup>-1</sup> após 24h de incubação (células incubadas com o extrato do <i>scaffold</i> sem tratamento reticularizante e células incubadas com os extratos dos <i>scaffolds</i> reticularizados com Glutaraldeído) (200x) .....	67
Figura 20 - Percentual da viabilidade celular da triplicata do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24 (Gráfico A) e 72h (Gráfico B) submetidos ao ensaio de citotoxicidade MTT .....	68
Figura 21 - Reação de base de <i>Schiff</i> .....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases de avaliação de segurança de dispositivos médicos.....	18
Tabela 2. Aplicabilidades e ação biológica do agente reticularizante Glutaraldeído (GTA).....	27
Tabela 3. Perfil (%) do colágeno total, tipo I e II e a relação tipo I e III do <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h com e sem a polarização de luz ( <i>Picrosirius Red</i> , 400x) .....	49
Tabela 4. Quantificação do nível de degradação das proteínas totais (mg) da pele de tilápia <i>in natura</i> e do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h após a hidrólise ácida.....	52
Tabela 5. Quantificação do nível de hidrólise (DH) pela enzima Bromelaína no método NOPA (média $\pm$ EPM) da pele de tilápia <i>in natura</i> e do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	55
Tabela 6. Teste mecânico de microtração da Máxima Carga (N) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	57
Tabela 7. Teste mecânico de microtração da Deformação em Máximo Carga (%) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	59
Tabela 8. Teste mecânico de microtração Esforço da tração em quebra (MPa) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	61
Tabela 9. Teste mecânico de microtração Extensão de tração em quebra (cm) da pele de tilápia <i>in natura</i> e <i>Scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	63
Tabela 10. Percentual da viabilidade celular (média $\pm$ EPM) da triplicata do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24 e 72h submetidos ao ensaio de citotoxicidade MTT .....	66

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DH	Nível de hidrólise
EPM	Erro Padrão da Média
GTA	Glutaraldeído
HE	Hematoxilina-Eosina
ISO	Organização Internacional de Padronização
MEC	Matriz Extracelular
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimentos de Medicamentos
OMS	Organização Mundial de Saúde
SFB	Soro Fetal Bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UFC	Universidade Federal do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 A importância e o desenvolvimento dos biomateriais na medicina regenerativa ...	16
1.2 Breve histórico da pele de tilápia como dispositivo terapêutico.....	21
1.3 A engenharia de tecidos e o desenvolvimento das matrizes dérmicas acelular: o primeiro <i>scaffold</i> de pele de tilápia do mundo .....	25
1.4 A relevância e a aplicabilidade dos agentes de reticulação em matrizes biológicas descelularizadas ( <i>scaffolds</i> ).....	26
1.5. Agente de reticulação Glutaraldeído (GTA).....	28
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivo Geral .....	33
3.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Preparo do protocolo do <i>scaffold</i> de pele de tilápia.....	34
4.2 Preparação e modificação do <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia.....	35
4.2.1 Reticulação pelo agente de crosslinking Glutaraldeído (GTA) .....	35
4.3 Análise histológica do <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia antes e após os protocolos de reticulação com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	36
4.3.1 Hematoxilina-eosina .....	37
4.3.2 Picrosirius Red.....	37
4.4 Análise bioquímica e nível de hidrólise (DH) do <i>scaffold</i> oriundo da pele de tilápia antes e após os protocolos de reticulação com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h	38
4.4.1 Extração, hidrólise e quantificação do nível de hidrólise dos biomateriais do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticulação com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	38
4.4.2 Nível de hidrólise enzimática pelo ensaio do NOPA usando O-Ftaldialdeído dos biomateriais do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticulação com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	39
4.5 Análise das propriedades tensiométricas da pele de tilápia <i>in natura</i> e do <i>scaffold</i> antes e após os protocolos de reticulação com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	40
4.5.1 Ensaio de tração.....	40
4.6 Análise da atividade citotóxica do <i>scaffold</i> oriundo de pele de tilápia antes e após os protocolos de reticulação com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	41
4.6.1 Manutenção da linhagem celular .....	41
4.6.2 Avaliação da toxicidade celular <i>in vitro</i> pelo método do MTT .....	41
4.7 Análise estatística .....	42



<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
5.1 Análise histológica da matriz dérmica acelular ( <i>scaffold</i> ) oriunda da pele de tilápia sob os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	44
5.1.1 Análise histológica pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) do <i>scaffold</i> oriundo de pele de tilápia antes e após dos protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	46
5.1.2 Análise histoquímica pela coloração de Picrosirius red do <i>scaffold</i> oriundo de pele de tilápia antes e após dos protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h .....	48
5.2 Análise bioquímica e nível de hidrólise enzimática da pele de tilápia <i>in natura</i> e do <i>scaffold</i> de pele de tilápia após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	53
5.2.1 Extração e hidrólise ácida das proteínas totais.....	51
5.2.2 Hidrólise enzimática e quantificação das proteínas totais.....	54
5.3 Análise das propriedades tensiométricas do <i>scaffold</i> oriundo de pele de tilápia antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	57
5.3.1 Máximo carga (N).....	57
5.3.2 Deformação em máximo carga (%).....	59
5.3.3 Esforço da tração em quebra (MPa) .....	60
5.3.4 Extensão de tração em quebra (cm) .....	62
5.4 Análise da atividade citotóxica do <i>scaffold</i> oriundo de pele de tilápia antes e após os protocolos de reticularização com Glutaraldeído (GTA) por 24h e 72h.....	65
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>
<b>ANEXO A – DECLARAÇÃO DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL</b> .....	<b>95</b>