

**ESTUDO DO USO DE PELE ARTIFICIAL CONSTRUÍDA POR BIOIMPRESSÃO
3D PARA TRATAMENTOS DE ÚLCERAS EM RATOS, CÃES E GATOS**

KARLA LIVRAMENTO MENDONÇA DE SOUZA OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO -UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

SETEMBRO /2025

**ESTUDO DO USO DE PELE ARTIFICIAL CONSTRUÍDA POR BIOIMPRESSÃO
3D PARA TRATAMENTOS DE ÚLCERAS EM RATOS, CÃES E GATOS**

KARLA LIVRAMENTO MENDONÇA DE SOUZA OLIVEIRA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biociências e Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Sergio Henrique Seabra

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
SETEMBRO /2025

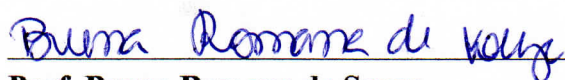
**ESTUDO DO USO DE PELE ARTIFICIAL CONSTRUÍDA POR BIOIMPRESSÃO
3D PARA TRATAMENTOS DE ÚLCERAS EM RATOS, CÃES E GATOS**

KARLA LIVRAMENTO MENDONÇA DE SOUZA OLIVEIRA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Biociências e Biotecnologia

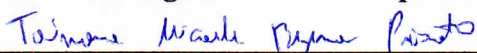
Aprovada em 01 de setembro de 2025

Banca Examinadora:



Prof. Bruna Romana de Souza

Doutora em Biologia Humana e Experimental (UERJ)



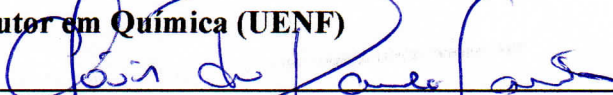
Prof. Tainara Micaele Bezerra |Peixoto

Doutora em Ciência Animal (UENF)



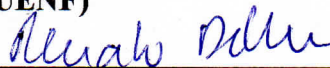
Prof. Jefferson Rodrigues de Souza

Doutor em Química (UENF)

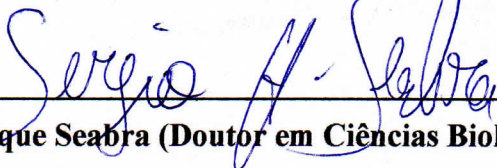


Prof. Clovis de Paula Santos

Doutor em Parasitologia Veterinária (UENF)



**Prof. Renato Augusto DaMatta (Doutor em Ciências Biológicas – Biofísica) - UFRJ
(Coorientador)**



**Prof. Sergio Henrique Seabra (Doutor em Ciências Biológicas – Biofísica) - UFRJ
(Orientador)**

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

O48

Oliveira, Karla Livramento Mendonca de Souza.

Estudo Do Uso De Pele Artificial Construída Por Bioimpressão 3d Para Tratamentos De Úlceras Em Ratos, Cães E Gatos / Karla Livramento Mendonca de Souza Oliveira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

72 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: Sergio Henrique Seabra.

Coorientador: Renato Augusto Damatta.

1. Bioimpressão 3D. 2. Regeneração da Pele. 3. Plasma Rico em Plaqueta. 4. Proteômica. 5. Medicina de Precisão. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

DEDICO...

À minha família que tanto me apoiou nessa jornada: meu marido
Renato e meus filhos Heitor, Gabriela e Fionna (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me conceder saúde física e mental para concluir essa etapa. Entrar no Doutorado aos 42 anos, casada, mãe de dois filhos e trabalhando em 3 lugares foi um grande desafio.

Ao meu orientador, Prof. Sergio Henrique Seabra, por ter me acolhido quando eu pensei em desistir do Doutorado. “Serginho” foi mais que um orientador: foi exemplo de profissional dedicado e apaixonado pela ciência; foi um professor exemplar, e mais que isso, foi um amigo que ganhei para a vida. Como sempre te disse: “você é o cara”!

Ao meu coorientador, Prof. Renato Augusto DaMatta, pelos ensinamentos valiosos, pelo incentivo e pela amizade.

Aos membros da banca, minha sincera gratidão por aceitarem contribuir com sua experiência e conhecimento na minha defesa.

Ao Dr Felipe Figueirôa Moreira pela revisão deste documento e por todas as vezes que me ajudou de forma tão rápida no whatsapp.

A todos os professores e funcionários do PGBB pelo apoio e pelos ensinamentos ao longo desta jornada.

A todos os técnicos do LBCT pela manutenção e cuidado com o laboratório. Em especial a Adrianinha (Adriana Alves Martins) que sempre nos recebe com um sorriso largo e uma palavra de carinho!

A todas as técnicas do PAM (preparo de amostras para microscopia) pelo auxílio na produção das peças usadas nas imagens mais lindas do mundo: Bia, Giovana e Marcia Adriana: vocês são incríveis!

A todos os amigos do grupo “SEABRINHAS” pelas dicas, amizade e bate-papo nas reuniões mensais e no dia a dia do laboratório! Aos pós-doc Felipe e Pedro, aos amigos doutorandos Maicley, Renata, Eliane, Pedro Igor e Yago e aos amigos mestrando: Amanda, Alice e Lara! E todos aqueles com os quais dividi a “Sala de Estudos” nesse tempo!

A médica veterinária Giovana Lima Albuquerque e ao Vitor de Paula Parente pela ajuda na condução dos inúmeros experimentos no infectório: os ratinhos foram muito bem cuidados por vocês! Obrigada por serem meu braço direito e esquerdo quando eu estava de plantão!

Aos animais de laboratório (ratos Wistar) que doaram suas vidas para a realização dos experimentos nessa pesquisa.

Ao Professor Vitor Batista Pinto e seu aluno de mestrado Lucas Espírito Santo Gomes pela ajuda nos ensaios de proteômica

A toda minha família pela força, incentivo e por acreditar em mim. Em especial ao meu marido Renato que sempre me impulsiona e embarca comigo nas minhas “ideias”. O lema dele é “surfa sua onda e do resto eu cuido”. Obrigada meu Amor, por tudo e por tanto!

Aos meus filhos Heitor e Gabriela por entenderem meus momentos de ausência em casa, as horas que pedia silêncio para estudar e principalmente por se orgulharem da “mãe cientista” deles. Mamãe fez e sempre fará tudo pensando em vocês!

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, pela infraestrutura e pelo suporte.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para minha formação acadêmica e para a realização desta pesquisa, minha sincera gratidão.

"Seus pés chegarão aonde sua esperança já caminhou em silêncio"

RESUMO

Após lesão cutânea profunda, o processo de cicatrização em mamíferos forma uma cicatriz fibrótica, sem a recuperação dos apêndices e da camada da derme. Por essa razão, é necessária uma terapia que gere a cicatrização da pele sem alterações severas no tegumento. Para esse propósito, a impressão 3D de proteínas e células pode ser usada para gerar regeneração tegumentar sem grandes modificações na pele. Aqui, desenvolvemos uma pele artificial usando impressão 3D com colágeno associado a plasma rico em plaquetas, resultando em recuperação completa de lesões traumáticas acidentais/infecciosas em cães e gatos. A pele dos animais após o tratamento apresentou recuperação rápida e características fenotípicas externas normais. A pele artificial teve um desempenho semelhante quando o colágeno foi misturado ao plasma rico em plaquetas sem impressão 3D e aplicado em lesões em cães, gatos e ratos. A histologia e a microscopia eletrônica de transmissão mostraram que a pele regenerada de ratos apresentou processo inflamatório reduzido, epiderme e derme com camadas papilar e reticular e estrutura de colágeno restaurada. Após análise proteômica, identificamos 24 proteínas com acúmulo diferencial, das quais 7 apresentaram aumento de expressão na pele artificial, enquanto 6 foram detectadas exclusivamente no tecido cutâneo. Esses resultados abrem uma porta para a inovação, já que a tecnologia pode ser aplicada ao tratamento do tegumento veterinário.

Palavras-chave: Bioimpressão 3D; Regeneração da Pele; Plasma Rico em Plaqueta, Proteômica, Medicina de Precisão

ABSTRACT

After deep skin injury, the healing process in mammals forms a fibrotic scar, without recovery of the appendages and dermis layer. Therefore, a therapy that generates skin healing without severe changes to the integument is necessary. To this end, 3D printing of proteins and cells can be used to generate integumentary regeneration without major skin modifications. Here, we developed an artificial skin using 3D printing with collagen combined with platelet-rich plasma, resulting in complete recovery from accidental/infectious traumatic injuries in dogs and cats. The animals' skin after treatment showed rapid recovery and normal external phenotypic characteristics. The artificial skin performed similarly when collagen was mixed with platelet-rich plasma without 3D printing and applied to wounds in dogs, cats, and rats. Histology and transmission electron microscopy showed that the regenerated rat skin had reduced inflammation, epidermis and dermis with papillary and reticular layers, and restored collagen structure. After proteomic analysis, we identified 24 proteins with differential accumulation, of which 7 showed increased expression in the artificial skin, while 6 were detected exclusively in the cutaneous tissue. These results open a door for innovation, as the technology can be applied to the treatment of veterinary skin.

Keywords: 3D Bioprinting; Skin Regeneration; Platelet Rich Plasma, Proteomics, Precision Medicine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A importância do tegumento nos mamíferos.....	1
Figura 2: Estrutura geral do tecido tegumentar	2
Figura 3: Fases consecutivas ou sobrepostas da cicatrização de lesões na pele	5
Figura 4: Intervalo de tempo de células recrutadas para uma lesão	6
Figura 5: Mapeamento dos tipos de regeneração na árvore filogenética de metazoários.....	7
Figura 6: Representação das características de regeneração	8
Figura 7: Ativação de fontes celulares.....	9
Figura 8: Fatores que contribuem para a cicatrização de feridas crônicas.....	12
Figura 9: Representação esquemática da estrutura geral das MMPs	13
Figura 10: Sítio ativo da metaloproteases da matriz (MMP)-1.	14
Figura 11: Diferentes tipos de colágeno e sua função no organismo.....	15
Figura 12: Conjuntos supramoleculares formados por colágenos.....	15
Figura 13: Degradação do colágeno.....	16
Figura 14: Tratamentos tradicionais e inovadores de feridas crônicas	17
Figura 15: Mosaico da construção das Biotintas	18
Figura 16: Exemplos de substitutos de pele (biotintas) comercialmente disponíveis	18
Figura 17: Tipos e quantidade de células em cada fase do processo de cicatrização.....	19
Figura 18: Análise estrutural da pele artificial impressa em 3d.....	29
Figura 19: Caso clínico 1.....	30
Figura 20: Caso clínico 2.....	31
Figura 21: Caso clínico 3.....	32
Figura 22: Caso clínico 4.....	33
Figura 23: Tratamento de lesões tegumentares em ratos experimentais.....	35
Figura 24: Imagens histológicas de lesões cutâneas.....	38
Figura 25: Microscopia eletrônica de transmissão das lesões cutâneas.....	39
Figura 26: Diagrama de VENN. Mostramos as relações de sobreposição e exclusividade no conjunto de 24 proteínas diferencialmente expressas nos explantes de pele tratada.....	41

Figura 27: Gráfico Volcano da expressão diferencial entre os grupos Pele artificial e Controle.....	41
Figura 28: Gráfico Volcano da expressão diferencial entre os grupos Pele artificial e Kollagenase®.....	42
Figura 29: Predição funcional das proteínas diferencialmente acumuladas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Células da pele e suas funções.....	4
Tabela 2: Principais fatores de crescimento produzidos por diferentes tipos celulares.....	10
Tabela 3: Classificação das feridas nos casos clínicos dos animais estudados.....	34
Tabela 4: Análise proteômica dos explantes de pele	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição dos processos e participantes mais importantes em cada fase.	5
----------------------------------------------------------------------------------------------	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABs – antibióticos

AGEs – produtos avançados de glicação

CXCR2 (CXC motif chemokine receptor 2)

EGF - Epidermal growth factor (Fator de Crescimento Epidermal)

EPS - substância polimérica extracelular

FGF-2 - Fibroblast growth factor - 2 (fator de crescimento de fibroblastos)

GAGS - glicosaminoglicanos

HIF-1 α - Hypoxia-inducible factor 1- α (Fator 1-alfa induzível por hipóxia)

IGF-1 - Insulin-like growth factor – 1 (fator de crescimento semelhante a insulina)

IL1 – Interleucina- 1 (Interleucina 1)

IL6 – Interleucina- 6 (Interleucina 6)

MEC - matriz extracelular

MMPS - proteases de serina, metaloproteases de matriz

MMPs- Metaloproteinases de matriz

MSCS – células tronco mesenquimais

MSCs - células-tronco mesenquimais

PBS - Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)

PDGF - Platelet-derived growth factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas)

PPP – plasma pobre em plaquetas

PRP – plasma rico em plaquetas

QS- quorum sensing.

ROS - espécies reativas de oxigênio

SASP - fenótipo hipersecretor, associado a senescência

SPARC - proteína secretada ácida e rica em cisteína

TGF- α - Transforming growth factor- α (Fator de crescimento transformador - α)

TGF- β - Transforming growth factor- β (Fator de crescimento transformador – β)

TIMPs - inibidores teciduais de metaloproteases

TNF- α – Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral α)

VEGF-A - Vascular endothelial growth factor -A (Fator de crescimento vascular endotelial)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

I REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1.1 Anatomofisiologia do sistema tegumentar dos mamíferos.....	2
1.2 Disbiose e o processo de cicatrização	4
1.2.1 -Componentes celulares em cada fase do processo de cicatrização.....	6
1.3 Cicatrização versus regeneração.....	7
1.4 Regeneração tecidual através de ativação celular	9
1.5 Fatores de crescimento que apoiam a regeneração tecidual.....	10
1.6 Fatores que contribuem para a cronicidade das feridas.....	11
1.7 Superfamília “ <i>Metzinc</i> ” —Metaloproteinases de matriz (MMPs).....	13
1.7.1 – As Colagenases.....	14
1.8 Métodos de Tratamento de feridas cutâneas.....	17
1.8.1 Biotintas como substitutos de pele.....	18
1.8.2 Plasma rico em plaquetas.....	19
1.9 Técnicas de biomimpressão.....	21
II OBJETIVO.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
III MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Ensaio de impressão 3d.....	24
3.1.1 Extração de colágeno para produção da Biotinta.....	24
3.1.2 Biotinta e bioimpressão.....	24
3.2 Protocolo de estruturação da úlcera artificial em ratos.....	25

3.2.1 Tratamento das úlceras artificiais.....	25
3.2.2 Análise morfológica da pele artificial impressa por 3d	25
3.2.3 Procedimento para análises histológicas.....	26
3.3 Seleção de pacientes cães e gatos com lesões cutâneas.....	26
3.3.1 Classificação das feridas.....	27
3.3.2 Aplicação e manutenção do curativo.....	27
3.4 Extração e digestão de proteínas.....	27
3.5 Análise proteômica <i>label free</i>	28
3.6 Análise estatística e interpretação de dados.....	28
IV RESULTADOS.....	29
4.1 - Estrutura da pele artificial impressa.....	29
4.2 Tratamento de feridas em casos clínicos.....	29
4.2.1 Caso clínico 1	30
4.2.2 Caso clínico 2.....	30
4.2.3 Caso clínico 3.....	31
4.2.4 Caso clínico 4.....	32
4.3 Tratamento de lesões tegumentares em ratos.....	34
4.4 Análise histológica.....	36
4.5 Ultraestrutura da recuperação da lesão cutânea.....	38
4.6 Análise das proteínas diferenciamamente expressas após os tratamentos.....	40
V DISCUSSÃO.....	44
VI CONCLUSÃO	47
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, diversos tratamentos para lesões em pequenos animais têm sido desenvolvidos e lançados no mercado; todavia, esses produtos não realizam a regeneração do local acometido, mas sim uma cicatrização, deixando uma extensa área de fibrose que diminui a elasticidade da pele e restringe a mobilidade local. A fibrose, por ser uma resposta fisiológica, não pode ser evitada. Em contrapartida, ela pode ser minimizada e conduzida de forma que não gere um tecido inestético e não funcional.

As peles artificiais têm sido projetadas para restaurar as propriedades da pele natural, proporcionando um ambiente favorável para a cicatrização de feridas, ajudando a manter a umidade local adequada, proteger a ferida de infecções e promover a regeneração celular e tecidual. A aplicação de pele artificial como um curativo (cobertura), cria uma barreira física entre a ferida e o ambiente externo, reduzindo assim o risco de infecções secundárias (bacterianas ou fúngicas) e em muitos casos, aliviando a dor associada à ferida, proporcionando proteção e suporte à área afetada. Ao promover uma regeneração eficaz e uniforme, as peles artificiais podem ajudar a minimizar a formação de cicatrizes indesejadas, especialmente em feridas extensas ou profundas e com isso, restaurar as funções normais do tecido afetado. Esses novos curativos são projetados para serem fáceis de aplicar e remover, o que pode facilitar o processo de cuidado da ferida, tanto para os profissionais de saúde quanto para os pacientes. Existem peles artificiais disponíveis para uma variedade de tipos de feridas, desde queimaduras até úlceras diabéticas, permitindo uma abordagem personalizada e eficaz para o tratamento de cada paciente, o que temos chamado de medicina de precisão.

Nossa hipótese é de que a utilização da biotinta com composição proteica e celular, seja capaz de levar à regeneração de úlceras tegumentares em cães e gatos por meio da bioimpressão 3D, uma vez que essa metodologia tem se mostrado uma ferramenta promissora, permitindo a deposição precisa de proteínas e células para a reconstrução de tecidos sem provocar grandes alterações estruturais na pele.

Neste estudo, desenvolvemos um modelo de pele artificial utilizando a impressão 3D de colágeno associado ao plasma rico em plaquetas. Essa combinação resultou em recuperação completa de lesões traumáticas, tanto de origem acidental quanto infecciosa, em 21 casos clínicos, incluindo cães e gatos.

Após o tratamento, os animais apresentaram cicatrização acelerada, com restabelecimento de características fenotípicas externas semelhantes às da pele íntegra, sem

evidências de deformidades ou perda de função. Interessantemente, observamos que resultados comparáveis foram obtidos quando a mistura de colágeno e plasma rico em plaquetas foi aplicada diretamente sobre as lesões, sem a necessidade da impressão 3D, em diferentes espécies animais, incluindo cães, gatos e ratos. Comparando com dados da literatura, o tempo de fechamento completo da lesão (em dias) foi reduzido, mesmo em lesões extensas.

As análises histológicas e de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em amostras de pele regenerada de ratos demonstraram um processo inflamatório menos intenso, acompanhado da reconstituição das camadas papilar e reticular da derme, além da restauração da organização estrutural das fibras de colágeno. Esses achados evidenciam o potencial da tecnologia tanto na modulação da resposta inflamatória quanto na promoção da regeneração cutânea organizada. Dessa forma, os resultados obtidos reforçam a viabilidade da pele artificial produzida por impressão 3D associada ao plasma rico em plaquetas como uma abordagem inovadora, com potencial aplicação clínica no tratamento de lesões tegumentares em medicina veterinária, abrindo caminho para novas estratégias terapêuticas baseadas em bioengenharia de tecidos.

Pesquisas baseadas em perfil de expressão gênica da pele, incluindo análises em nível de “*single-cell*” (célula única), têm permitido mapear com maior precisão o panorama da expressão gênica das diferentes populações celulares que compõem o tecido cutâneo. Trabalhos recentes identificaram a presença de genes específicos associados a tipos celulares distintos, indicando que a pele, em sua complexidade, utiliza proteomas exclusivos para sustentar funções fundamentais, como a manutenção da estrutura, a regulação da homeostase e a resposta imunológica

No entanto, investigações anteriores voltadas para a caracterização proteômica da pele conseguiram identificar apenas uma fração limitada do conjunto de proteínas expressas. Essa limitação decorre, em grande parte, das dificuldades técnicas relacionadas à separação e homogeneização do tecido cutâneo, bem como da elevada abundância de proteínas estruturais, como as queratinas, que tendem a mascarar a detecção de proteínas menos abundantes, mas biologicamente relevantes

Nesse estudo, encontramos 24 proteínas diferencialmente acumuladas nos explantes de pele que foram tratados, sendo que 7 dessas estão *upreguladas* na pele artificial e 6 proteínas encontradas *unicamente* na pele. Esses resultados poderão servir para beneficiar o tratamento clínico de úlceras cutâneas ou doenças com lesões refratárias que envolvam

disfunção das células epidérmicas e bloqueio da reepitelização, podendo se tornar um recurso essencial para pesquisa básica e translacional e abrir uma importante porta para a inovação

I REFERENCIAL TEÓRICO

As barreiras biológicas localizam-se em superfícies que atuam como interfaces entre o organismo e o ambiente externo, desempenhando um papel crucial na proteção contra agentes estressores de natureza química, biológica e imunológica, ao mesmo tempo em que resguardam órgãos internos de variações fisiológicas e ambientais, tanto moderadas quanto extremas. (DE SZALAY, 2023). O tegumento é o maior órgão do corpo e serve como a primeira linha de defesa contra microrganismos. Compreende 24% do peso corporal do filhote, mas apenas 12% da de um cão adulto.

A pele representa uma das principais barreiras epiteliais, oferecendo defesa multifatorial por meio da barreira física de permeabilidade proporcionada pelo estrato córneo, bem como das barreiras imunológicas presentes na epiderme e na derme. Essa estrutura cutânea é essencial para a vida em ambiente terrestre, ao prevenir a perda excessiva de água, auxiliar na termorregulação e fornecer proteção contra agentes ambientais nocivos, incluindo radiação ultravioleta, patógenos e toxinas (LEFÈVRE-UTILE, A. 2021).

Adicionalmente, a função barreira da pele é complementada por uma barreira microbiológica constituída pela microbiota cutânea, cuja composição é moldada por uma relação simbiótica com o hospedeiro. Essa interação é sustentada por nutrientes derivados da própria pele, peptídeos antimicrobianos e lipídios, enquanto os microrganismos e seus metabólitos modulam respostas imunológicas e promovem a manutenção da tolerância imunológica local (NICOLAOU A. 2024) (Figura 1).

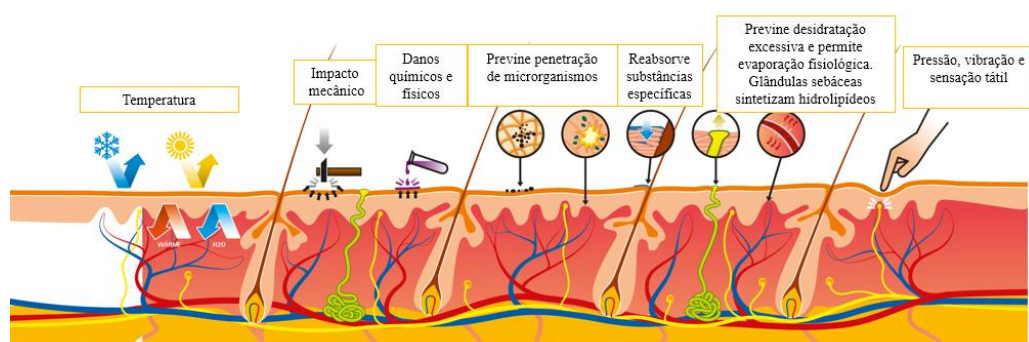


Figura 1: A importância do tegumento nos mamíferos

1.1 Anatomofisiologia do sistema tegumentar dos mamíferos

A espessura da pele varia dependendo da região do corpo, idade, estado imunológico, etc. Em uma perspectiva anatômica, a pele dos mamíferos possui uma estrutura complexa composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, cada uma composta por diferentes tipos de células (Figura. 2), cujas funções estão listados na Tabela 1.

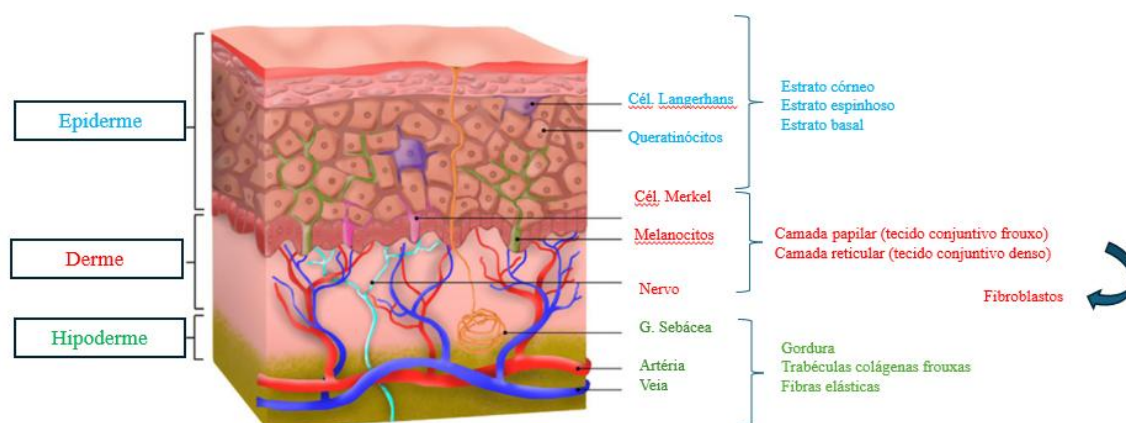


Figura 2: Estrutura geral do tecido tegumentar mostrando as três camadas que compõem a pele dos mamíferos: epiderme, derme e hipoderme (Adaptado de YANG., G. 2021).

- Epiderme

A epiderme se origina como uma camada cuboide única de células ectodérmicas que se tornam estratificadas com a maturação do feto. Em áreas com pelos, a epiderme consiste em três camadas principais: o estrato basal, o estrato espinhoso (ou camada de células espinhosas) e o estrato córneo (SOUCI & DENESVRE, 2021).

- Derme

A derme (cório) é composta por fibras colágenas reticulares tipo I e III e fibras elásticas associadas a uma substância mucopolissacarídea basal. Esta substância fundamental é composta de ácido hialurônico e sulfato de condroitina; é o principal componente da derme. Noventa por cento das fibras dérmicas são compostas de colágeno. Fibroblastos, macrófagos, plasmócitos e mastócitos presentes em toda a derme são mais numerosos na camada dérmica superficial. Ocasionalmente cromatóforos e células de gordura são notados. A derme contém a rede capilar cutânea, vasos linfáticos, componentes nervosos, músculos eretores do pêlo, folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas (BUOTE, 2022). A derme do cão e do gato é dividida em estrato papilar superficial e o estrato reticular profundo. O estrato papilar possui finas fibras

elásticas e reticulares em feixes de colágeno densamente entrelaçados. A membrana basal é formada por fibras reticulares e uma camada basal viscosa, e o estrato basal é ligado à membrana basal através de processos citoplasmáticos. A pele do gato contém feixes de colágeno, que geralmente são mais grossas e densas que a pele canina. Os músculos eretores do pelo também são maiores do que os do cão. O estrato papilar da pele felina contém fibras colágenas finas e mais uniformes, que geralmente são paralelas à epiderme. No estrato reticular, essas fibras são densas, irregularmente dispostas e três vezes maiores que as da derme papilar (SOUICI & DENESVRE, 2021).

- Matriz extracelular

O componente tecidual fora das paredes celulares dos órgãos é chamado de matriz extracelular (MEC). As células teciduais e a MEC estão em um estado de “reciprocidade dinâmica”. No desenvolvimento embrionário, sua interação desempenha um papel essencial na diferenciação e função celular. As células, por sua vez, secretam macromoléculas em seu ambiente imediato, formando uma matriz entre células. O tecido mesenquimal embrionário regional induz a diferenciação celular epitelial: as células epiteliais, por sua vez, influenciam o desenvolvimento e a estrutura do tecido mesodérmico. A MEC inclui as proteínas fibrilares e glicosaminoglicanos (GAGS) que se ligam às proteínas centrais, formando proteoglicanos.

A MEC dérmica pode ser descrita como uma rede de proteínas fibrilares organizadas dentro de um gel hidratado de proteoglicanos (KRISHNASWAMY *et al.*, 2017). Os dois principais tipos de MEC da pele são a membrana basal (ou lâmina basal) em contato com as células epiteliais basais e o estroma subjacente ou tecido conjuntivo. O tecido estromal fornece integridade estrutural e suporte aos componentes celulares da pele. Os colágenos são as principais proteínas da MEC (RICARD BLUM, 2011). Entretanto, a MEC compreende uma variedade de proteínas extracelulares que podem ser classificadas funcionalmente: estruturais (lâmina basal e tecido conjuntivo) ou adesivas (fibrina e fibronectina); remodelante ou contra adesivo (trombospondina, tenascina, SPARC — proteína secretada ácida e rica em cisteína); proteolítico (proteases de serina, metaloproteases de matriz [MMPS]) e antiproteolítico (serpinas, inibidor do ativador de plasminogênio-1, inibidores teciduais de metaloproteases [TIMPs]). Essas proteínas têm uma inter-relação complexa durante a cicatrização de feridas (ZHOU *et al.*, 2022).

- Hipoderme

A hipoderme (subcutâneo), ou fáscia superficial, está associada à derme sobrejacente. Esse tecido subcutâneo é composto principalmente por gordura com trabéculas colágenas frouxas e fibras elásticas. Ela varia em espessura regionalmente, mas é pouco desenvolvida sob as pálpebras, orelhas e escroto e outras áreas onde a pele está intimamente ligada às estruturas subjacentes. A elasticidade inerente da pele; sua falta de fixações firmes ao osso, músculo e fáscia; e o comprimento e a extensibilidade dos vasos cutâneos diretos são responsáveis pelo alto grau de mobilidade da pele sobre a cabeça, pescoço e tronco do cão e do gato. Em um estudo histológico, duas camadas distintas da hipoderme foram relatadas: o estrato adiposo subcutâneo (contendo gordura) e um estrato fibroso subcutâneo mais profundo, que inclui a camada muscular do panículo. Essa camada gordurosa fornece isolamento para o corpo, serve como amortecedor para impactos externos e uma fonte de armazenamento de energia (KÖNIG *et al.*, 2017).

Tabela 1 Células da pele e suas funções

Tecido	Célula	Função
Epiderme	Queratinócitos	Produção de queratina
	Melanócito	Produção de melanina
	Células de Langerhans	Resposta imune adaptativa
	Células de Merkel	Percepção tátil
Derme	Fibroblastos	Síntese e depósito de componentes da MEC
	Mastócitos	Respostas inflamatória e imunológica
Hipoderme	Adipócitos	Estoque de energia

1.2 Disbiose e o processo de cicatrização

Quando ocorrem lesões tegumentares, devido a trauma ou resultantes de uma condição patológica específica, essa barreira física da pele se rompe. Nesse momento, o primeiro objetivo fisiológico é restaurar a homeostase, um processo que se inicia imediatamente após a lesão (FERNÁNDEZ-GUARINO *et al.*, 2024). Por meio de estímulos e processos altamente regulados, inicia-se uma cascata linear na qual fatores estimulam a proliferação celular, que pode durar de algumas horas a anos (SORG H, 2023). Os eventos celulares e bioquímicos no reparo tecidual podem ser divididos nas fases de hemostasia, reação inflamatória, proliferação

celular e síntese dos elementos que compõem a MEC, e o período subsequente, denominado remodelamento (NAYAK, SANDIFORD & MAXWELL, 2009). (Figura 3 e Quadro 1)

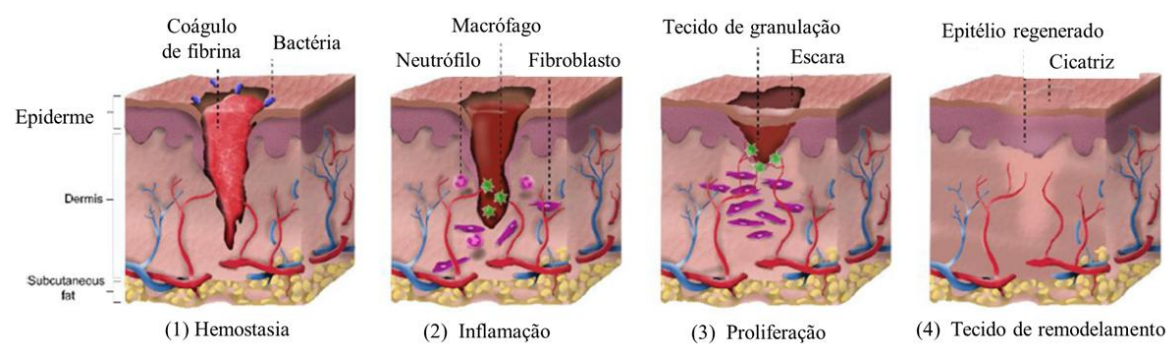
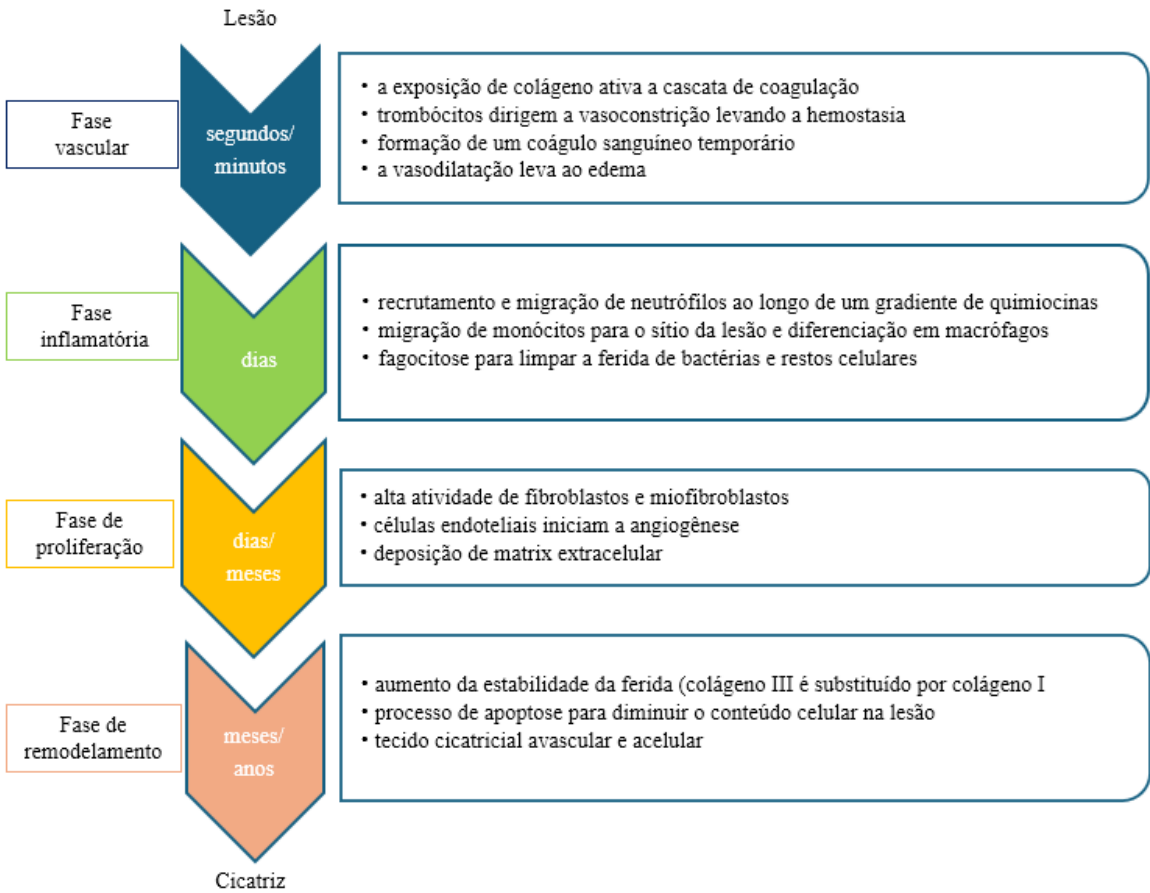


Figura 3: Fases consecutivas ou sobrepostas da cicatrização de lesõe na pele, desde o ferimento até a cicatrização. (Adaptado de YANG., G. 2021)



Quadro 1: Descrição dos processos e participantes mais importantes em cada fase. (Adaptado de SORG H, 2023)

1.2.1 – Componentes celulares em cada fase do processo de cicatrização

Na primeira etapa, as plaquetas e a ativação da cascata de coagulação são os principais atores, e os filamentos de fibrina aderem nos primeiros segundos; há a formação de um trombo ou um coágulo, e as plaquetas ficam presas na área da ferida com o objetivo de conter a perda de sangue. A fase inflamatória é desencadeada pelo recrutamento de células inflamatórias para o local da ferida, que tentarão eliminar as células danificadas e os patógenos da área da ferida. Os leucócitos recrutados para este local — primeiro os neutrófilos, depois os monócitos, seguidos por outros — secretam fatores de crescimento, enzimas e quimiocinas que produzem inchaço, calor, vermelhidão e dor. Se esta fase for prolongada e um número excessivo de células ativadas for recrutada no local lesionado, a inflamação não auxiliará o processo de cicatrização da lesão. Na fase proliferativa, o principal objetivo é cobrir e preencher a lesão; as margens da lesão começam a se contrair por fibroblastos que são ativados e diferenciados em miofibroblastos. Posteriormente, inicia-se o processo de reepitelização; esta fase é desencadeada pela deposição de MEC, principalmente de colágeno. Finalmente, durante a fase de maturação, as fibras de colágeno se reorganizam de colágeno tipo III para tipo I, e o tecido se remodela, ganhando força e flexibilidade lentamente, promovendo a epitelização e a neovascularização. (GUILLAMAT-PRATS R. 2021) (Figura 4).

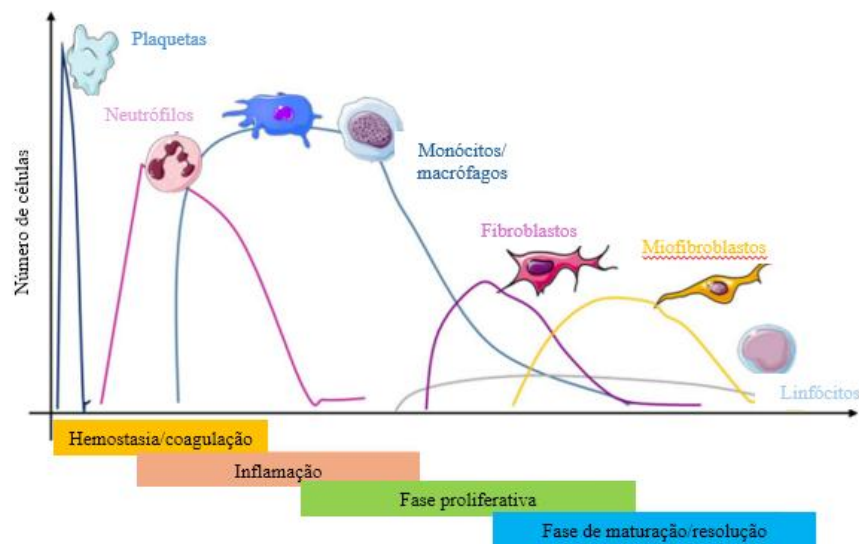


Figura 4: Células recrutadas para uma lesão nas várias etapas da cicatrização. (Adaptado de GUILLAMAT-PRATS R. 2021)

1.3 Cicatrização *versus* regeneração

Os processos de reparo subsequentes à lesão tecidual podem culminar na formação de cicatriz ou na regeneração do tecido. A regeneração tem sido estudada principalmente em vertebrados inferiores e mamíferos recém-nascidos, restaurando completamente a arquitetura e a função originais do tecido, seja em resposta à perda celular cotidiana ou a danos causados por lesões. (PAUL & SHARMA, 2021).

Os princípios de organização tecidual, vias moleculares e respostas a lesões são conservados ao longo da filogenia, e espécies como os metazoários possuem capacidades regenerativas que podem servir como modelos para mamíferos. A maioria dos filos de metazoários inclui espécies representativas com habilidades documentadas para regenerar órgãos e estruturas complexas. Embora ausente em todos os vertebrados, ecdisozoários e algumas outras linhagens dispersas, a regeneração de corpo inteiro é um fenômeno generalizado entre os metazoários (BIDEAU, L, 2021) (Figura 5).

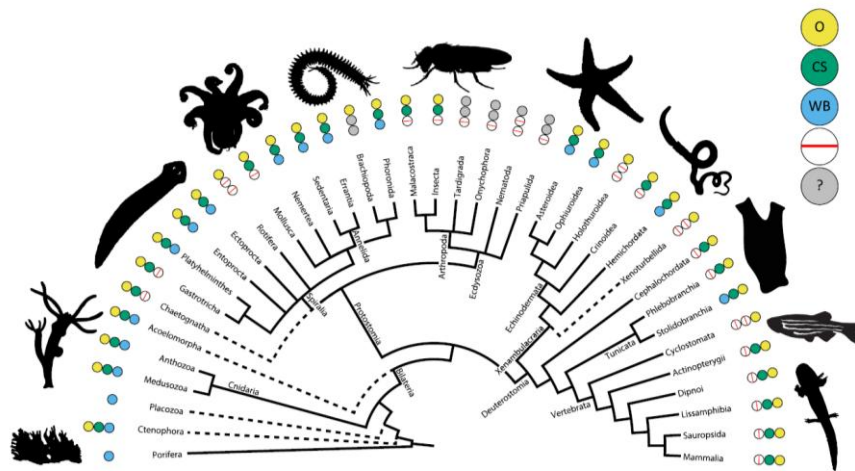


Figura 5: Mapeamento dos tipos de regeneração na árvore filogenética de metazoários. Regeneram órgãos (O – *Organs*, círculos amarelos) e estruturas complexas (CS – *Complex structures*, círculos verdes). Não regeneram (círculos riscados). Regeneração de corpo inteiro (WB - *Whole body*, círculos azuis). (Adaptado de BIDEAU, L, 2021)

As habilidades regenerativas e seus mecanismos variam significativamente entre diferentes espécies, órgãos e tipos de lesão. Salamandras e teleósteos, por exemplo, apresentam uma notável capacidade de regenerar membros, coração, medula espinhal e outros tecidos. No entanto, mesmo nesses animais, o mecanismo regenerativo acaba cedendo com o tempo, a

regeneração enfraquece e o envelhecimento prevalece (POSS, 2024). (Figura 6). Em contraste, feridas tegumentares que ocorrem em mamíferos adultos tipicamente resultam na perda de tecido funcional e no desenvolvimento de uma cicatriz fibrosa (RABILLER *et al.*, 2021).

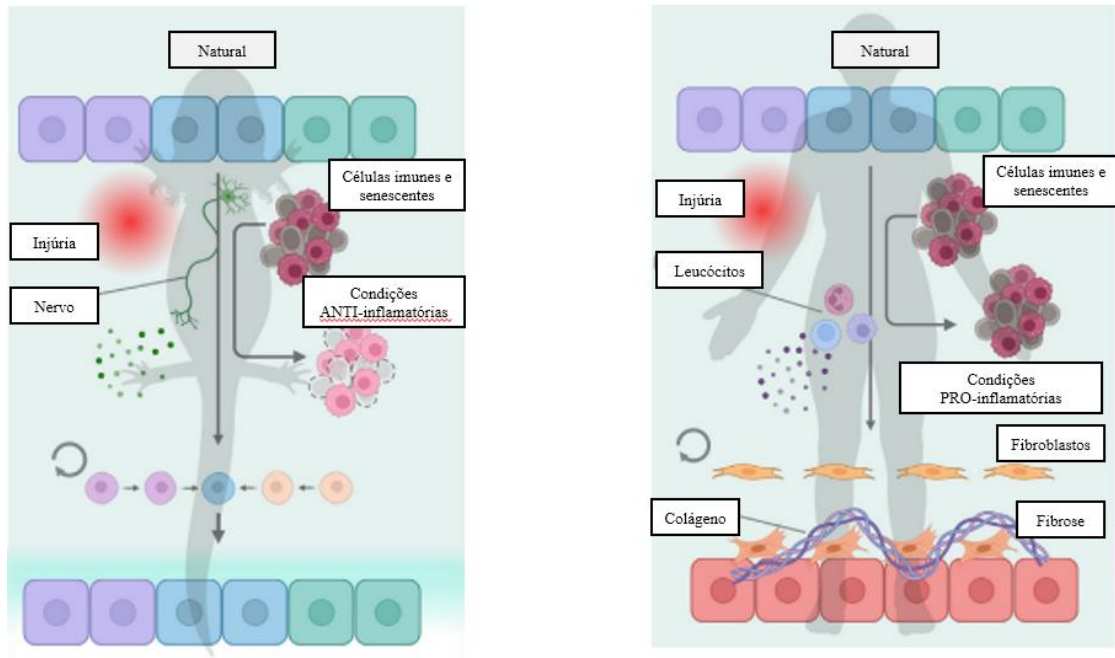


Figura 6: Representação das características de regeneração em modelos proficientes e ineficientes. Principais eventos celulares e de sinalização que ocorrem durante a regeneração de membros na salamandra (esquerda). A lesão em membro humano leva à fibrose, sem restauração dos padrões teciduais. (direita). (Adaptado de POSS, 2024)

Dessa forma, o desenvolvimento de um procedimento para regeneração de feridas tegumentares em mamíferos adultos no lugar do processo de cicatrização é imperativo, e o tratamento de feridas é um campo em constante mudança na medicina, pois novos tratamentos celulares e novos curativos tópicos surgem o tempo todo (BUOTE, 2022).

Embora diversos mecanismos moleculares e funções celulares específicas envolvidos na reparação tecidual tenham sido caracterizados, inúmeros aspectos dos processos (pato) fisiológicos subjacentes à cicatrização de feridas ainda permanecem pouco esclarecidos. Na atualidade, uma parcela significativa das pesquisas em medicina concentra-se em níveis moleculares e celulares, enquanto evidências clínicas consistentes que fundamentem muitas das terapias atualmente utilizadas são limitadas. Por isso, grande parte do conhecimento científico

recentemente produzido busca uma abordagem efetiva para a prática clínica e para a aplicabilidade terapêutica concreta.

1.4 Regeneração tecidual através de ativação celular

O material inicial mais familiar e elegante para a regeneração é a célula-tronco e seu nicho, pois as células-tronco podem se autorrenovar e dar origem a outros tipos de célula, e podem ser colhidas de uma variedade de fontes, incluindo tecido adiposo, medula óssea, cordão umbilical, folículo piloso e polpa dentária (XIN S. 2020) As células-tronco contribuem para a regeneração tecidual por meio de múltiplos mecanismos além da diferenciação direta, tais como: 1) sinalização parácrina com secreção de citocinas e moléculas bioativas que estimulam mecanismos endógenos de reparo, 2) ativação de células-tronco endógenas que estimula populações de células-tronco residentes, 3) modulação do microambiente com a criação de condições favoráveis ao reparo tecidual e 4) indução da angiogênese, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos (LUKOMSKYJ, A., 2022).

A pele e seus anexos contêm populações dinâmicas de células-tronco que regeneram a barreira epitelial, bem como o crescimento e a coloração dos pelos. Outros exemplos espetaculares de regeneração envolvem populações de células-tronco pluripotentes, por exemplo, em planárias, onde células-tronco na forma de neoblastos povoam os espaços interorgânicos das planárias e mediam a renovação celular (Figura 7) (POSS., 2024).

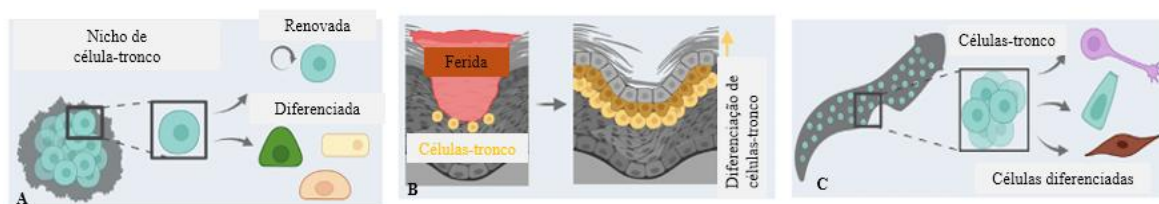


Figura 7: Ativação de fontes celulares. As células-tronco residem em um nicho que mantém a quiescência antes de despertarem para se renovarem e se diferenciarem após perda ou dano celular. (B) Populações dinâmicas de células-tronco na pele regeneram a barreira epitelial. (C) Células-tronco pluripotentes povoam espaços interorgânicos em planárias e substituem células diferenciadas no processo de renovação (Adaptado de POSS., 2024).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) têm se mostrado particularmente promissoras em diversas aplicações. As MSCs derivadas do tecido adiposo aumentam a regeneração tecidual e a sobrevivência do arcabouço na substituição traqueal (RWIK, S. 2021). Células -tronco da

polpa dentária humana combinadas com arcabouços demonstram potencial significativo para regeneração óssea em modelos animais (XIN S. 2020). Estudos recentes também destacaram o potencial terapêutico dos exossomos derivados de células-tronco, que podem promover a regeneração tecidual, evitando algumas complicações associadas ao transplante direto de células (SABERIAN, E., 2024).

1.5 Fatores de crescimento que apoiam a regeneração tecidual

A regeneração do tecido tegumentar é um processo que também requer fatores de crescimento específicos que servem como biomoléculas de sinalização essenciais para ativar vias específicas. As principais categorias desses fatores incluem: estimular a produção de colágeno (FGF-2, IGF-1, TGF- β), estimular a angiogênese (FGF-2, VEGF-A, HIF-1 α , TGF- β) e estimular a reepitelização (EGF, FGF-2, IGF-1, TGF- α) (ANITUA *et al.*, 2005). De acordo com (STELLOS *et al.*, 2010 e GODOI *et al.*, 2022) esses fatores podem ser produzidos por diversos tipos celulares e sua quantidade varia nas feridas agudas e crônicas, como demonstrado na Tabela 2

Tabela 2: Principais fatores de crescimento produzidos por diferentes tipos celulares, sua função e níveis de produção em feridas agudas e crônicas. (Extraído de BARRIENTOS, S., 2008).

Growth Factors	Cells	Acute Wound	Function	Chronic Wound
EGF	Platelets Macrophages Fibroblasts ^{44,45}	Increased levels ^{46,47}	Reepithelialization ⁴⁸	Decreased levels ⁵¹
FGF-2	Keratinocytes Mast Cells Fibroblasts Endothelial cells Smooth muscle cells Chondrocytes ^{58,75,76}	Increased levels ^{79,81}	Granulation tissue formation Reepithelialization Matrix formation and remodeling ²⁷⁷	Decreased levels ⁵²
TGF- β	Platelets Keratinocytes Macrophages Lymphocytes Fibroblasts ^{92,93,96}	Increased levels ⁹⁸	Inflammation Granulation tissue formation Reepithelialization Matrix formation and remodeling ^{81,101,107}	Decreased levels ⁵²
PDGF	Platelets Keratinocytes Macrophages Endothelial cells Fibroblasts ^{58,140,141}	Increased levels ¹⁴⁴	Inflammation Granulation tissue formation Reepithelialization Matrix formation and remodeling ^{141,142,146,153}	Decreased levels ⁵²
VEGF	Platelets Neutrophils Macrophages Endothelial cells Smooth muscle cells Fibroblasts ^{69,160-164}	Increased levels ¹⁸⁵	Granulation tissue formation ^{177,180}	Decreased levels ⁵²
IL-1	Neutrophils Monocytes Macrophages Keratinocytes ^{13,60}	Increased levels ²⁴²	Inflammation Reepithelialization ²⁴⁴	Increased levels ⁵¹
IL-6	Neutrophils Macrophages ²⁴⁵	Increased levels ²⁴⁵	Inflammation Reepithelialization ^{77,78}	Increased levels ²⁴⁵
TNF- α	Neutrophils Macrophages ^{60,242}	Increased levels ⁵¹	Inflammation Reepithelialization ⁵¹	Increased levels ⁵¹

1.6 Fatores que contribuem para a cronicidade das feridas

Como em qualquer processo biológico, perturbações no sistema podem resultar em anormalidades que, no contexto das feridas, se manifestam como cicatrização excessiva em um extremo ou como falha na cicatrização completa no outro. Feridas que não cicatrizam (definidas geralmente como aquelas que permanecem sem cicatrização após 12 semanas) são denominadas feridas crônicas. Elas afetam principalmente idosos e diabéticos, são altamente prevalentes e representam um grande fardo socioeconômico (GUEST, J., 2015).

Um manejo clínico mais eficaz evitaria o desenvolvimento dessas feridas, mas muitas permanecem refratárias aos tratamentos atuais, destacando a necessidade de melhor compreender a base celular da patologia das feridas para desenvolver tratamentos terapeuticamente viáveis. Sabemos que a pele de mamíferos idosos e diabéticos é mais predisposta a lesões, pois sofre atrofia, com barreira cutânea alterada e hidratação reduzida. Tanto o envelhecimento quanto o diabetes levam à perda gradual da matriz dérmica, com alterações correspondentes na mecânica dos tecidos, perda de resiliência e aumento da suscetibilidade a danos por atrito (BERMUDEZ.,2011).

Uma vez ocorrida a lesão, uma série de perturbações moleculares e celulares contribui para o comprometimento geral da cicatrização. Um fator amplamente implicado na patologia de feridas é a senescência celular (DIRIDOLLOU, S., 2001). As células mitóticas tornam-se senescentes e não proliferativas em resposta a uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos. Células senescentes adquirem um fenótipo hiper secretor, associado a senescência (SASP) produzindo um secretoma rico em citocinas pró-inflamatórias e proteases degradadoras de tecidos (revisado CHILDS, 2015). O ambiente de feridas crônicas é a plataforma perfeita para a indução de células senescentes devido aos altos níveis de inflamação e estresse oxidativo pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que intensifica a inflamação. Foi demonstrado recentemente que a alta carga de células senescentes contribui para a cronicidade de feridas diabéticas, onde o bloqueio do receptor de senescência proposto, CXCR2 (CXC motif chemokine receptor 2), atenua a senescência dos macrófagos e melhora a cicatrização em camundongos diabéticos. Por fim, altas quantidades de produtos de glicação avançada (AGEs) também contribuem para a inflamação e a senescência celular no ambiente da ferida. (WILKINSON, H. *et al* 2019) (Figura 8).

Outro fator-chave que contribui para a cronicidade de feridas é a inflamação excessiva, que perpetua a cronicidade por meio da destruição contínua do tecido. Feridas crônicas são

caracterizadas por um elevado número de células de Langerhans, neutrófilos, macrófagos pró-inflamatórios, e proteases, associados à gravidade clínica da úlcera (WETZLER, 2000). Juntamente com a infiltração elevada de subconjuntos específicos de células imunes a função patológica das células imunes é perturbada e, coletivamente, contribui para a cicatrização deficiente. Nesses casos, os neutrófilos são excessivamente preparados para produzir armadilhas extracelulares, que são citotóxicas e retardam a cicatrização da ferida (SAFFARZADEH, M.,2012).

Em camundongos diabéticos, os neutrófilos são mais resistentes à apoptose e menos eficazmente eliminados pelos macrófagos, o que favorece sua presença excessiva em feridas patológicas. Macrófagos diabéticos também apresentam eferocitose defeituosa de células apoptóticas, fagocitose bacteriana prejudicada e capacidade reduzida de polarização para um estado anti-inflamatório (BANNON P, 2013). Fato interessante é que mesmo antes da ulceração, a pele de humanos e camundongos diabéticos apresenta números maiores de mastócitos e macrófagos preparados para o estado pró-inflamatório. A inflamação elevada também pode persistir devido à infecção crônica da ferida, mantendo a ferida em um ciclo contínuo de infecção, inflamação e reparo inadequado. O comprometimento celular não se restringe apenas à inflamação, mas também se estende à reepitelização e à remodelação dérmica.

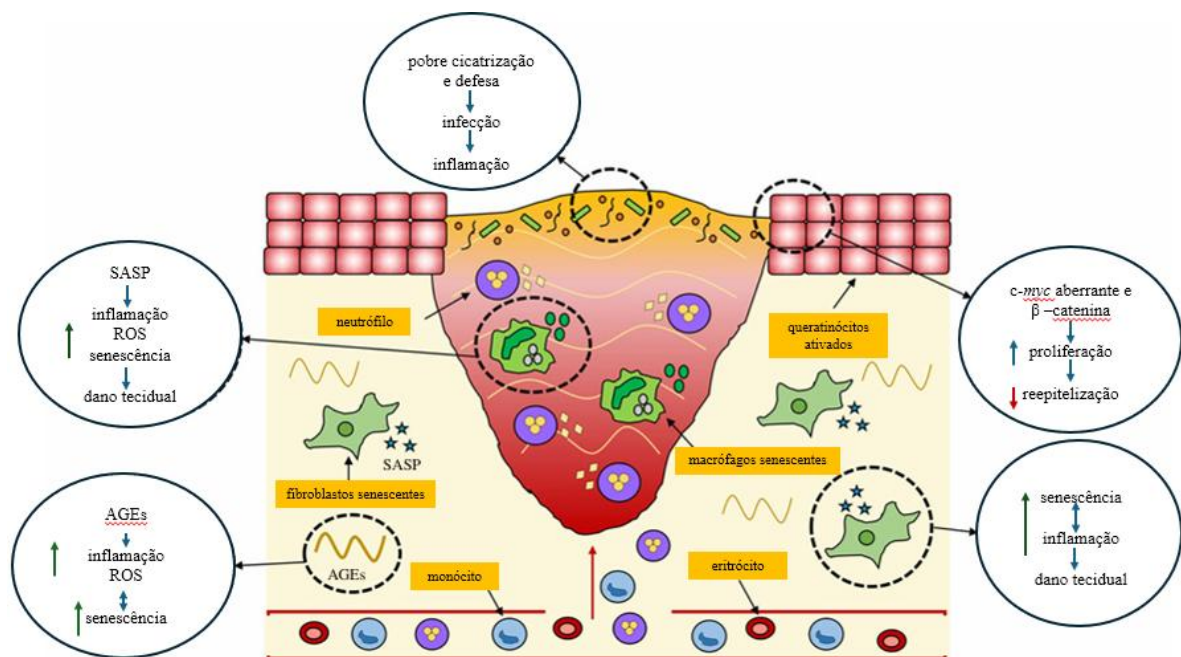


Figura 8: Fatores que contribuem para a cicatrização de feridas crônicas (adaptado de WILKINSON, H., *et al* 2019).

1.7 Superfamília “*Metzinc*” —Metaloproteínases de matriz (MMPs)

As metaloproteínases de matriz (MMPs) compreendem um grupo de endopeptidases de zinco que possuem a capacidade de clivar as ligações peptídicas na MEC. Existem dois subgrupos de metaloproteínases: metaloexopeptidase e metaloendopeptidases, que incluem proteínas disintegrina e metaloproteinase e MMPs. As MMPs podem ser compostas por collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-17), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), tipo de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24 e MMP-25) e outros tipos (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-28 e MMP-29) (HAMZEH A. 2016).

A maioria das MMPs possui uma arquitetura de domínio conservada, composta por um peptídeo sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico, um peptídeo ligante e um domínio hemopexina (ABDEL-HAMID, 2021). (Figura 9)

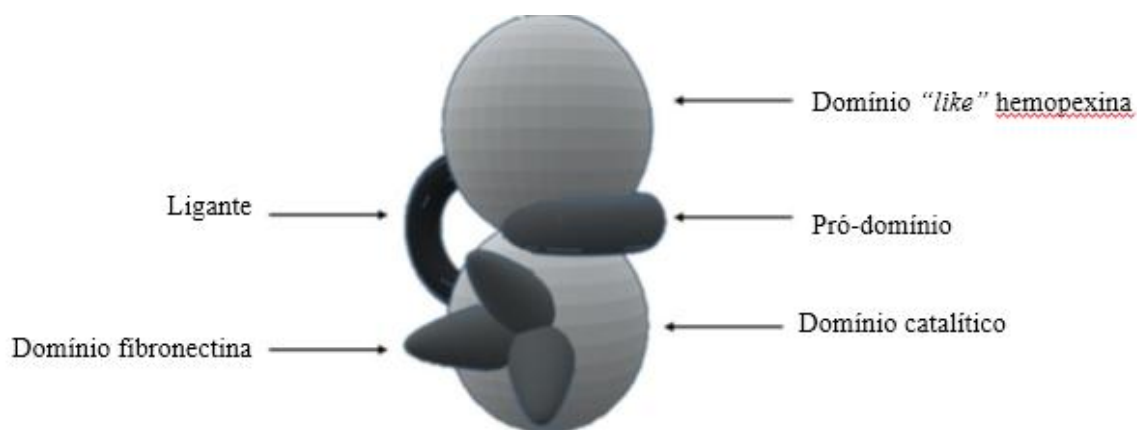


Figura 9: Representação esquemática da estrutura geral das MMPs (Adaptado de LARONHA, H.,2020).

O domínio catalítico representa a unidade funcional central, contendo o motivo de ligação ao zinco que permite a atividade proteolítica. O pró-domínio atua como um mecanismo autoinibitório, mantendo a enzima em uma forma zimogênica inativa até que a ativação seja necessária. O domínio hemopexina contribui para a especificidade do substrato e para as interações proteína-proteína. (LARONHA, H., 2020) (Figura 10).

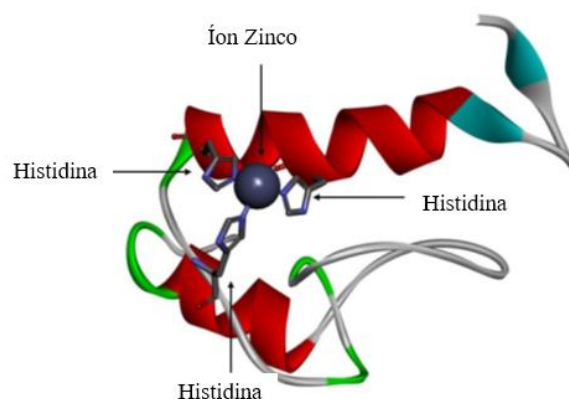


Figura 10: Sítio ativo da metaloproteínase da matriz (MMP)-1. O catalisador de zinco é representado pela bola cinza e os três resíduos de histidina são representados por bastões. (Adaptado de LARONHA, H.,2020).

1.7.1 – As Colagenases

Considerando que o colágeno representa de 70 a 80% do peso seco da pele, sua degradação controlada é fundamental para a cicatrização adequada. Por isso, enzimas como colagenases são sintetizadas por células-chave no processo de cicatrização, como macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, e sua expressão e atividade são rigidamente reguladas (JUNG, W., 1998).

O colágeno é a proteína mais abundante na MEC, fornecendo suporte estrutural às células. O colágeno pode apresentar-se em duas formas principais fibrilar e não fibrilar. Os colágenos fibrilares compartilham a estrutura característica de uma **hélice tripla contínua** com regiões terminais que permitem o empacotamento em fibrilas estriadas conferindo resistência mecânica e suporte estrutural aos tecidos. Eles são os mais abundantes e bem caracterizados entre os tipos de colágeno (tipo I, II, III, V e XI, XXIV e XXVII)

Já os colágenos não-fibrilares são aqueles associados à fibrilação facilitada com hélice tripla interrompida (tipo IX, XII, XIV, XIX e XXI); cadeia curta (tipo VIII e X); membrana basal (tipo IV); multiplexina (tipo XV e XVIII); colágenos associados à membrana FACIT com hélice tripla interrompida (tipo XIII e XVII) e outros tipos (tipo VI, VII e VIII) (Figura 11).

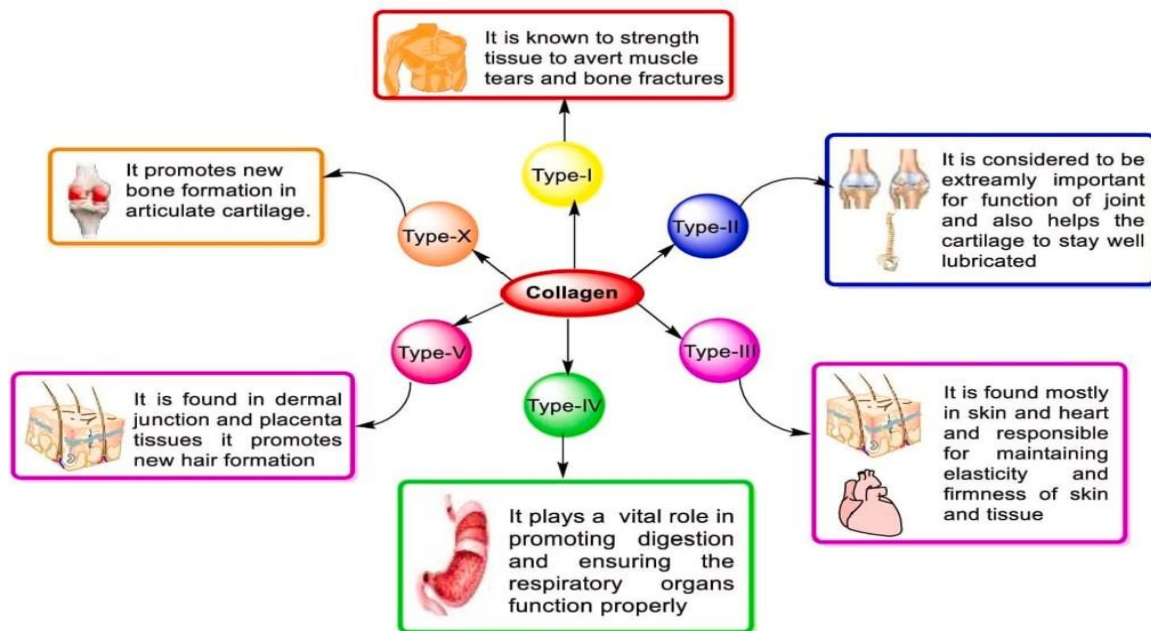


Figura 11: Diferentes tipos de colágeno e sua função no organismo. (Extraído de CHUNG, H. 2008).

A proteína do colágeno consiste em três cadeias, em hélice tripla, onde duas cadeias são quimicamente semelhantes (1 e 2), com dimensões aproximadas de 300 1,5 nm. O alto teor de glicina é importante para a estabilização da hélice de colágeno, pois permite a combinação das cadeias alfa de colágeno, facilitando a formação de pontes de hidrogênio e ligações cruzadas. (RICARD-BLUM S.,2011). (Figura 12)

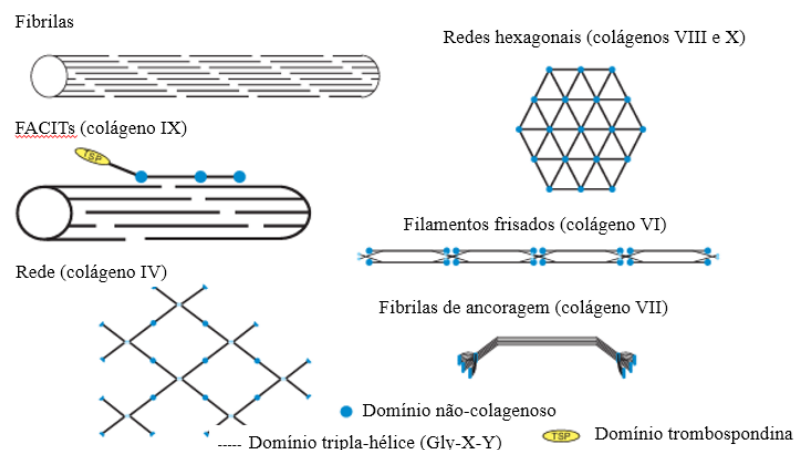


Figura 12: Conjuntos supramoleculares formados por colágenos (Adaptado de RICARD-BLUM S.,2011).

Em condições fisiológicas, a atividade das collagenases endógenas é suficiente para promover a remoção de tecido desvitalizado e facilitar a regeneração cutânea. No entanto, em feridas crônicas — como úlceras por pressão, úlceras venosas e úlceras diabéticas — fatores como doenças sistêmicas, senescência cutânea, estado nutricional deficiente e uso de medicamentos podem comprometer a síntese e a atividade dessas enzimas. O uso de enzimas proteolíticas é um método estabelecido, especialmente em úlceras de difícil cicatrização que não respondem aos procedimentos normais e não progridem para a cicatrização. (Figura 13).

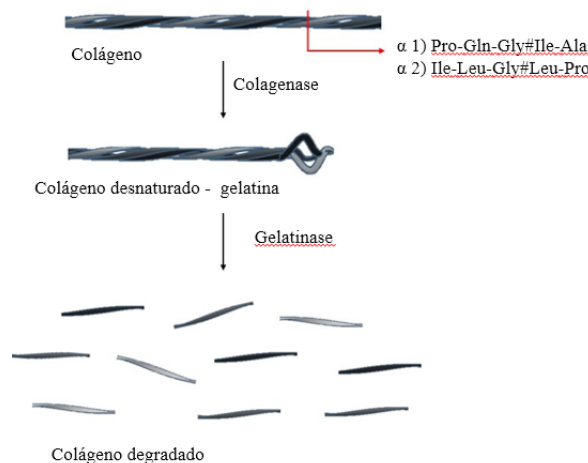


Figura 13: Degradação do colágeno. A enzima com atividade collagenolítica (colagenases) cliva a tripla hélice em dois fragmentos: 3/4 N-terminal e 1/4 C-terminal. Cada cadeia (1 e 2) possui uma sequência de clivagem específica (# representa o local de clivagem). Figura 3. Degradação do colágeno. A enzima com atividade collagenolítica (colagenases) cliva a tripla hélice em dois fragmentos: 3/4 N-terminal e 1/4 C-terminal. Cada cadeia ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) possui uma sequência de clivagem específica (# representa o local de clivagem).

Nesses contextos, a aplicação de collagenase, seja na forma injetável ou tópica, pode ser uma estratégia eficaz para promover a degradação controlada do colágeno excedente. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as collagenases possuem múltiplas propriedades terapêuticas, com efeitos benéficos no processo de cicatrização de feridas e queimaduras, no tratamento de fissuras mamilares dolorosas, bem como em condições clínicas como discinesia intervertebral, queloides, celulite e lipomas, certos tipos de fibrose, dentre outros promovendo o crescimento, a migração e a diferenciação celular, ajustando a composição e a estrutura da MEC, fornecendo suporte para o reparo e a regeneração tecidual (SHARMA, S.,2022).

1.8 Métodos de Tratamento de Feridas Cutâneas

O tratamento de feridas envolve tanto abordagens tópicas quanto invasivas, que empregam agentes de natureza química, biológica ou física (como o desbridamento mecânico). Para feridas agudas (não crônicas) normalmente são usados pomadas, sprays e coberturas que podem conter hidrocolóides, hidrogéis, alginato ou colágeno. Já para as feridas crônicas, o tratamento de feridas crônicas é complexo e multidimensional, pois envolve não só o cuidado local da lesão, mas também o controle das causas sistêmicas que impedem a cicatrização.

O desbridamento de tecido infectado e necrótico, seguido pelo uso de curativos personalizados, é comum no tratamento de feridas crônicas, com o objetivo de reduzir a carga microbiana, atenuar a inflamação e proporcionar um ambiente mais adequado para a cicatrização. Terapias antimicrobianas estão surgindo para romper biofilmes e remover seletivamente organismos patogênicos, em vez de comensais (HU, Y., 2024). Terapias celulares, como células-tronco mesenquimais (MSCs), podem beneficiar múltiplos aspectos do reparo de feridas. (PRIESTER *et al.*, 2020) Por fim, o tratamento da senescência crônica de feridas com senolíticos (por exemplo, metformina ou antagonistas do CXCR2) pode ser uma opção viável para reduzir a inflamação e promover a cicatrização (Figura 14) (WILKINSON, H, 2020).

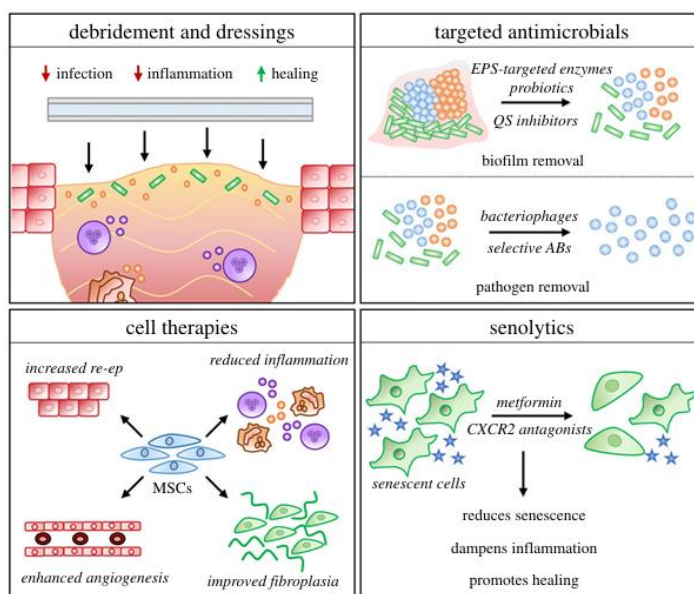


Figura 14: Tratamentos tradicionais e inovadores de feridas crônicas e seus principais efeitos nos tecidos. (EPS = substância polimérica extracelular. QS = quorum sensing. ABs = antibióticos). (Extraído de WILKINSON, H. 2020).

1.8.1 Biotintas como substitutos de pele

As biotintas são combinações de células vivas e biomateriais que, às vezes, são misturadas com fatores teciduais ou outras biomoléculas para fins de extrusão, caso se deseje efeito (Figura 15). Os substitutos de pele, também chamados de biotintas (*bioinks*) podem ser categorizados como epidérmicos, dérmicos e compostos dependendo do componente da pele que eles contêm. Além disso podem ainda ser divididos em diferentes categorias, dependendo de sua composição e fonte de material, incluindo enxertos xenogênicos, aloenxertos acelulares, aloenxertos celulares, enxertos autógenos e substitutos de pele sintéticos. Como não existe uma opção ideal para substitutos de pele que atendam a todos os critérios para a cicatrização ideal de feridas, há pesquisas em andamento avaliando e desenvolvendo diferentes opções de substitutos de pele. (DAI, C., 2020) (Figura 16).

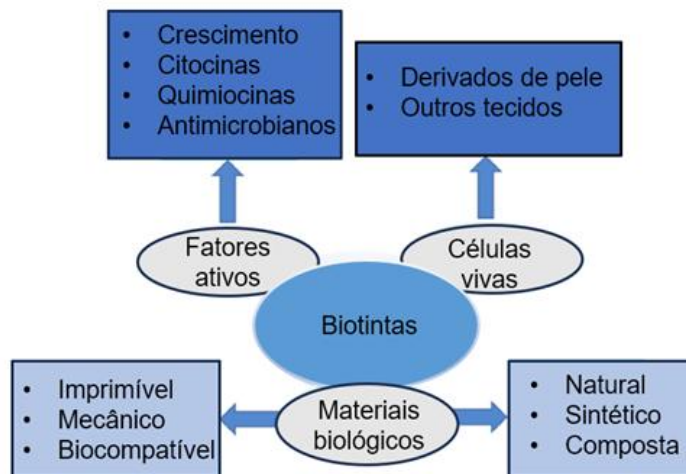


Figura 15: Mosaico da construção das biotintas




Epidermal 	<ul style="list-style-type: none"> • Autogênica • Pode requerer longo tempo de produção • Potencial para integração permanente 	EpiCel EpiDex ReCell
Dermal 	<ul style="list-style-type: none"> • Alogênica ou xenogênica • Relativamente fácil de produzir • Pode incluir fibroblastos • Risco de rejeição ou imunogenicidade 	AlloDerm GraftJacket
Composta 	<ul style="list-style-type: none"> • Alogênica ou xenogênica • Pode incluir fibroblastos • Risco de rejeição ou imunogenicidade 	Apligraf OrCel

Figura 16: Exemplos de substitutos de pele (biotintas) comercialmente disponíveis.

1.8.2 Biotinta e plasma rico em plaquetas

A regeneração de tecido tegumentar é um processo que necessita de fatores que estimulem a produção de colágeno (FGF-2, IGF-1, TGF-β), que estimulem a angiogênese (FGF-2, VEGF-A, HIF-1α, TGF-β) e o processo de reepitelização (EGF, FGF-2, IGF-1, TGF-α). As plaquetas são capazes de produzir vários fatores fundamentais à regeneração tecidual, (BHATNAGAR ET AL., 2022) e atualmente o plasma rico em plaquetas tem sido amplamente utilizado em diferentes áreas médicas, incluindo o tratamento de diversas lesões, pois melhora o processo de cicatrização e a regeneração tecidual em feridas crônicas (TÁBORSKÁ ET AL., 2023). (Figura 17)

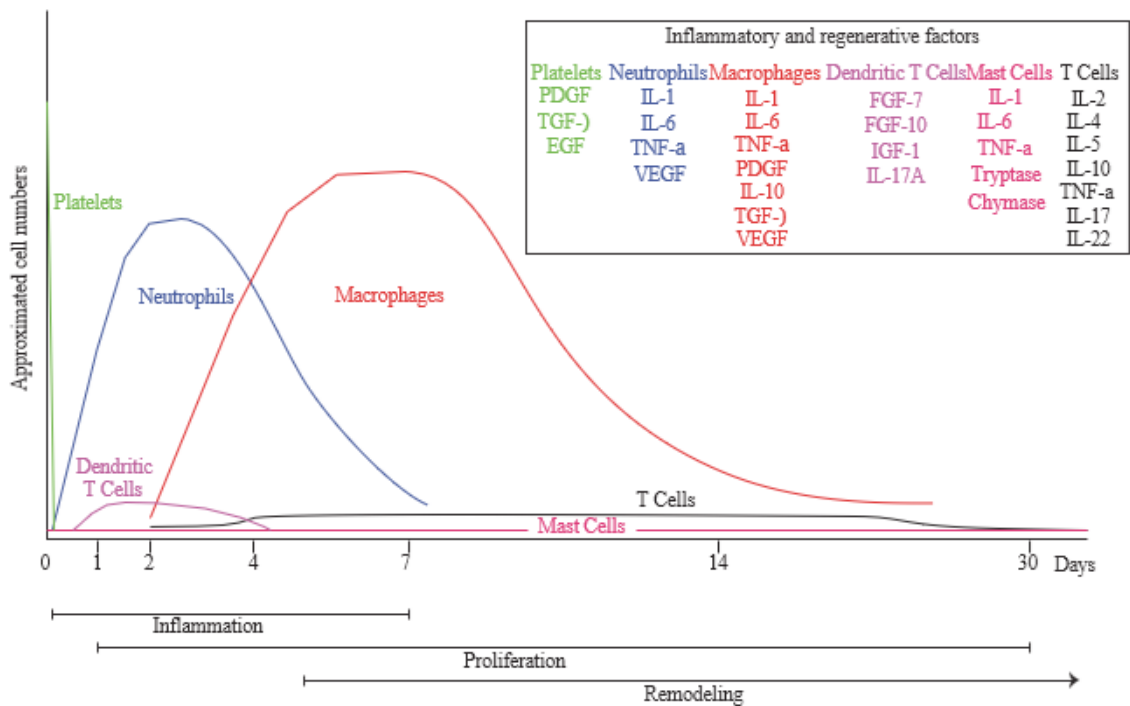


Figura 17: Tipos e quantidade de células em cada fase do processo de cicatrização (Extraído de CAÑEDO-DORANTES, L., 2019).

O plasma rico em plaquetas (PRP) e seus derivados, incluindo o lisado plaquetário e a fibrina rica em plaquetas, têm ganhado atenção significativa na medicina regenerativa, particularmente nas áreas de engenharia de pele e tecidos. Esses produtos são ricos em fatores de crescimento e citocinas, que desempenham papéis cruciais na promoção da regeneração tegumentar (AHMED *et al.*, 2024).

O PRP é uma terapia biológica no âmbito da regeneração cuja intenção é explorar o potencial terapêutico das plaquetas. Para isso, um pequeno volume de sangue do paciente é coletado para obtenção de uma fração plasmática com concentração de plaquetas semelhante ou superior aos níveis sanguíneos (BEITIA *et al.*, 2023).

Os vários fatores biologicamente ativos e proteínas de adesão ao microambiente presentes no PRP levam à liberação de seu conteúdo biomolecular, que atuará nos tecidos e células alvo, contribuindo para iniciar a cascata hemostática, vascularização e regeneração tecidual sob uma concentração de vários fatores de crescimento e citocinas sem efeitos adversos conhecidos (LI *et al.*, 2023). Portanto, distintas classes de mediadores bioativos, incluindo proteínas adesivas, fatores de crescimento, quimiocinas, fatores de coagulação e proteínas integrais de membrana, além de mediadores imunológicos, são armazenados e prontos para responder à lesão tecidual. Os mediadores influenciam positivamente o crescimento, a proliferação, a diferenciação e a re-epidermização celular em feridas tratadas com PRP (AKBARZADEH *et al.*, 2021). O processo de produção de PRP baseia-se em dois mecanismos: o primeiro consiste na separação do plasma total do sangue periférico e o segundo através da separação de duas frações do plasma, sendo a primeira o plasma pobre em plaquetas (PPP) e a segunda o plasma rico em plaquetas (PRP). Com o PPP, o hidrogel é formado por meio de temperatura e logo após é misturado ao PRP para obtenção da biotinta (CENGIZ *et al.*, 2018 e FARAMARZI *et al.*, 2018).

O efeito do PRP na migração e proliferação de queratinócitos, etapas fundamentais para a cicatrização de feridas foi investigado em pacientes. Nota-se que seus efeitos clínicos não ocorrem apenas em úlceras crônicas, mas também se aplica a outros tipos, como úlcera venosa da perna, úlcera por queimadura, úlcera traumática e aguda, mostrando efeitos claros do PRP na melhora da reepitelização (KIM *et al.*, 2013) promovendo a colagenização e melhorando a remodelação estrutural da matriz da ferida. O PRP desempenha um papel crucial na modulação da resposta inflamatória, prevenindo a inflamação excessiva que pode prejudicar a regeneração tecidual. Essas propriedades contribuem para a capacidade do PRP de criar um microambiente propício ao reparo tecidual. Evidências consistentes de pesquisas recentes destacam seu potencial terapêutico, consolidando como uma abordagem promissora para o aprimoramento da cicatrização de feridas, sobretudo por sua capacidade de modular a imunidade inata e promover a regeneração tecidual de forma eficaz, o que o torna uma ferramenta valiosa em contextos clínicos.

1.9 Técnicas de bioimpressão

O termo "bioimpressão" refere-se a um método relativamente novo que envolve a aplicação ou deposição de soluções de biomateriais ou biotintas para produzir construções tridimensionais (3D) com topologias e qualidades mecânicas/biológicas semelhantes às de tecidos ou órgãos humanos genuínos. Estruturas impressas são amplamente utilizadas na engenharia de tecidos para curar ou reparar tecidos ou órgãos danificados. Também podem ser usadas na modelagem de tecidos *in vitro* para testar e validar medicamentos e vacinas recém-criados antes de serem administrados a pacientes, apoiando e direcionando o desenvolvimento celular em direção ao seu entorno nativo. (ZHOU *et al.*, 2022). Quando se trata da formação de estruturas biológicas, um dos desafios mais importantes é garantir que sinais físico-químicos e biológicos específicos estejam presentes de forma harmoniosa para regular a atividade das células. Além disso, para estimular a diferenciação de células-tronco em direção a determinados tecidos, conjuntos exatos de estímulos devem ser estabelecidos.

Inúmeros trabalhos surgiram na tentativa de gerar uma impressão 3D de estruturas semelhantes à pele que podem substituí-la em casos de lesões de grandes áreas (ZHOU *et al.*, 2022) ou mesmo na tentativa de estabelecer um mecanismo para levar drogas para os vários tipos de tratamentos médicos (HO *et al.*, 2022). As técnicas de impressão 3D para aplicações biológicas têm visto um rápido crescimento durante a última década, e esses métodos abriram novos caminhos na pesquisa regenerativa. Embora a técnica de bioimpressão 3D esteja em um estágio relativamente inicial de desenvolvimento e se mostrado muito promissora por possuir recursos robustos para melhorar estratégias regenerativas, ainda existem várias limitações que precisam ser resolvidas (MOBARAKI *et al.*, 2020).

Uma das tecnologias mais promissoras atualmente é a impressão de órgãos e tecidos por meio da bioengenharia e bioimpressão 3D (MURPHY & ATALA, 2014). As tecnologias de bioimpressão têm a capacidade de combinar vários fenótipos de células animais, proteínas de sinalização, componentes da matriz extracelular e outros biomateriais semelhantes, que estão sendo explorados para encontrar possíveis caminhos na fabricação da pele animal (KANG *et al.*, 2023). A diferença entre impressão 3D e bioimpressão 3D está nos detalhes. Ambos os processos funcionam com impressão camada por camada. No entanto, a bioimpressão 3D usa biotintas (biogéis) carregadas com células ou outros compostos biológicos para criar tecidos vivos, enquanto a impressão 3D não usa células ou tecidos vivos (LIAW & GUVENDIREN, 2017). Os hidrogéis podem ser de origem sintética ou natural e servem como material de suporte para as células que serão utilizadas na bioimpressão (RAEES *et al.*, 2023). Os principais

compostos naturais utilizados nos hidrogéis são: colágeno, alginato, gelatina, fibrina, quitosana e ácido hialurônico, trazendo muitos benefícios quando se trata de proliferação e viabilidade celular (ANTICH *et al.*, 2020).

Entre as principais tecnologias de bioimpressão estão a impressão a jato de tinta, laser e extrusão, cada técnica apresentando seus pontos positivos e negativos, além de possuir suas particularidades e distintas aplicações. Nesse contexto a impressão por extrusão mostra-se uma excelente alternativa para a impressão de tecidos moles, dentre eles, a pele (MCCORMACK *et al.*, 2020). A impressão por extrusão pode ser definida como a modificação da impressão jato de tinta, propiciando a deposição de materiais mais viscosos (MURPHY & ATALA, 2014).

II OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Entender os eventos de cicatrização da pele artificial em ratos, cães e gatos para atender à demanda clínica por equivalentes de pele animal, desde curativos avançados para feridas crônicas até enxertos biomiméticos de pele para ajudar a restaurar a função de barreira em úlceras, lesões complexas, queimaduras ou outros tipos de feridas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma pele artificial através da tecnologia de biomateriais associada a impressão 3D que estimule regeneração tegumentar.
- Avaliar a eficácia do uso da pele artificial utilizando um protocolo de estruturação de úlceras artificiais em ratos.
- Avaliar histologicamente a regeneração tecidual das feridas tratadas com a pele artificial em ratos, por meio da microscopia óptica.
- Avaliar a ultraestrutura da lesão tratada com a pele artificial através de análises dos explantes por microscopia eletrônica de transmissão e varredura
- Avaliar as proteínas diferencialmente expressas nos explantes após diferentes tratamentos por meio de análise proteômica

III MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ensaios de impressão 3d

3.1.1 Extração de colágeno para produção da biotinta

No protocolo para extração de colágeno, quinze tendões de cauda de rato foram processados. Todos os procedimentos foram realizados a 4 °C com agitação contínua, e cada tendão mantido em etanol até ser processado, primeiro cortado em pedaços pequenos (0,5 cm) e lavado com água deionizada por 6 horas (1 g tendão/ 10 ml H₂O), trocada duas vezes. Em seguida, o tendão cortado foi homogeneizado em ácido acético 0,83 M e a dissolução realizada por 36 horas. Em seguida, a extração foi interrompida aumentando o pH até 7,0 com NaOH 1,0 M. Doze horas depois, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min. Após a obtenção do colágeno, homogeneizamos com alginato de sódio (Sigma-A-1112) na proporção de 10% peso por volume de alginato.

3.1.2 Biotinta, bioimpressão e aplicação na ferida

Foi utilizada uma impressora extrusora para impressão de filmes proteicos (BioX Cellink 3D Bioprinter). Sangue de cão, gato ou rato foi centrifugado a 500 x g por 10 min e a fração plasmática (pobre em plaquetas) foi gelificada a 80°C por 15 min e misturada ao PRP (FARAMARZI *et al.*, 2019). Essa primeira biotinta foi misturada ao homogeneizado de colágeno-alginato, gerando uma segunda biotinta que foi impressa sobre gaze de algodão. Para isso foi utilizada uma agulha ejetora de proteína 21G, a uma velocidade de 0,2 mm/s, atingindo uma espessura final de 2 mm, denominada como "pele artificial impressa" (NOCERA *et al.*, 2018) ou utilizada sem bioimpressão (pele artificial não impressa). Para cada animal tratado, foram necessários 10 mL de sangue total para obter a fração plasmática para cães e gatos, e 1 mL de sangue para ratos.

A segunda biotinta foi uma mistura da primeira biotinta com o homogeneizado de colágeno-alginato na proporção de 20% a 80%, respectivamente; no entanto, uma nova versão da segunda biotinta, com uma mistura de 10% a 90%, respectivamente, também foi testada em ratos. As feridas foram tratadas em dois cães com a pele artificial impressa, mas um cão, o gato e os ratos, foram tratados com pele artificial não impressa. A pele artificial impressa foi aplicada diretamente sobre a ferida cutânea, enquanto a pele artificial não impressa foi adicionada com auxílio de uma seringa.

3.2 Protocolo de estruturação de úlceras em ratos

Para o desenvolvimento da ferida tegumentar, realizamos a sedação e analgesia através da injeção intraperitoneal de 0,1 mL da solução contendo cetamina: 100 mg/kg (analgésico) e xilazina 10 mg/kg (sedativo) seguindo o protocolo adaptado de Flecknell, Neves, Mancini Filho e Menezes (2013).

Um molde circular metálico com 22 mm de diâmetro foi utilizado para cortar a pele, que foi removida com bisturi. O uso desses animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade, protocolo 486.

3.2.1 Tratamento da úlcera artificial em ratos

Os ratos foram divididos em três grupos experimentais, cada um contendo 4 animais: Grupo 1: Controle (tratado com PBS), Grupo 2: tratado com pele artificial e Grupo 3: tratado com Kollagenase®.

Realizamos diariamente o tratamento dessas lesões com PBS (controle), Pele artificial e Kollagenase® até 5, 10 e 20 dias, os animais foram sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ para excisão e retirada cirúrgica da cicatriz cutânea tratada para análises posteriores. As lesões foram medidas diariamente com paquímetro.

3.2.2 Análise morfológica da pele artificial produzida com impressora por 3d através de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura

Amostras de tecido de rato foram fixadas com 4% de formaldeído recém-preparado e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h. As amostras foram pós-fixadas com 0,1% de OsO₄ em tampão cacodilato de sódio, desidratadas em acetona, embebidas em resina epóxi. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1400 Plus.

Para microscopia eletrônica de varredura, amostras fixadas foram pós-fixadas com 0,1% de OsO₄ em tampão cacodilato de sódio, desidratadas em acetona, secas no ponto crítico com CO₂, montadas em stubs, revestidas por pulverização catódica com ouro e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-IT201.

3.2.3 Procedimento para análises histológicas

Após 5, 10 e 20 dias de tratamento as amostras de tecido foram fixadas em formaldeído a 4% em PBS por 1 hora. Para a desidratação, as amostras de tecidos foram imersas em banhos

sucessivos de etanol (50%, 70%, 95% e 100%), clarificadas em xilol e posteriormente embebidas em parafina de baixo ponto de fusão. Usando um micrótomo rotativo (Leica), múltiplas seções foram cortadas de cada bloco de parafina e coradas seguindo protocolos padrão por hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff. As lâminas foram examinadas usando um microscópio óptico Zeiss e as imagens obtidas usando uma câmera digital AxoCAM e depois processadas pelo programa Axoimager (Zeiss). A espessura das camadas papilares na pele recuperada foi medida utilizando o programa ImageJ em 10 campos por grupo

3.3 Seleção de pacientes cães e gatos com lesões cutâneas

Cães e gatos foram selecionados por médicos do Hospital Veterinário da UENF de acordo com as lesões tegumentares. Os critérios de seleção foram divididos de acordo com o tipo de lesão (avulsões, lacerações, abrasões, queimaduras, auto traumatismo, trauma, acidente ofídico e iatrogênicas), origem da lesão, tempo de evolução, presença de infecção e comprometimento do tecido. Os tipos de lesões considerados para essa pesquisa, foram as feridas abertas com diferentes origens excluindo-se apenas as lesões de origem neoplásicas

O estudo incluiu 17 cães e 4 gatos. Inicialmente, suas feridas foram limpas com cloreto de sódio a 0,9% e gaze estéril utilizada para remover a sujidade. Pele artificial impressa em um curativo estéril foi aplicada no ferimento de 2 cães. Além disso, pele artificial não impressa foi testada em 1 cão, que recebeu uma camada de 0,5 mm de espessura sobre o ferimento. Em ambos os casos, após a aplicação da pele artificial, gaze estéril foi colocada sobre ela, seguida de um curativo protetor ao redor da área afetada. As trocas de curativo variaram dependendo de cada caso: se houvesse grande quantidade de exsudato, o curativo era trocado a cada 3 dias.

3.3.1 Classificação das feridas

A classificação da ferida quanto à sua evolução foi dividida em dois critérios: aguda e crônica (lesão de longa duração que se desvia do processo de cicatrização). A classificação com base na presença de infecção foi a seguinte: limpa (ferida livre de microrganismos), limpa contaminada (lesão com duração inferior a 6 horas entre o trauma e o atendimento inicial), contaminada (feridas cujo tempo de tratamento foi superior a 6 horas após o trauma), infectada (presença de agente infeccioso local).

O envolvimento do tecido nas feridas foi avaliado em dois estágios: estágio 1, ferida profunda com envolvimento de toda a pele, incluindo necrose do tecido subcutâneo, mas não se estendendo à fáscia muscular; estágio 2, destruição extensa do tecido com dano ósseo ou muscular; estágio 3, destruição extensa do tecido e dano ósseo ou muscular.

Toda a metodologia empregada obedeceu aos preceitos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e foi submetida a apreciação e aprovação pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da UENF sob o protocolo número 486.

3.3.2 Aplicação e manutenção do curativo

Inicialmente, os pacientes foram posicionados de forma que possamos realizar a limpeza ideal da ferida com cloreto de sódio 0,9% aquecido (solução salina) para remover qualquer sujidade, podendo ser utilizada gaze estéril. Em seguida, a pele artificial será aplicada sobre a ferida em gaze estéril ou diretamente sobre a ferida. Em ambos os casos, após a aplicação do produto, foi colocada uma camada de gaze estéril, seguida de uma bandagem ao redor para proteger a área afetada. As trocas de curativos variaram de acordo com o caso, quando houve produção de grande quantidade de exsudato, a troca de curativos foi feita a cada 24 ou 48 horas. Porém, se a ferida não for exsudativa, a troca do curativo e o produto foi feito a cada 5 dias

3.4 Extração e digestão de proteínas

As proteínas foram extraídas usando o método descrito por (Reis et al., 2016). Três réplicas biológicas (300mg cada) dos tratamentos C/P/K, foram maceradas em nitrogênio líquido. Cada réplica biológica consistia em uma placa de Petri contendo três fragmentos de pele. As amostras foram acondicionadas em microtubos de 2 mL, e foi adicionado 1 mL de tampão de extração Uréia/Tiouréia (composto por 7 M de Uréia, 2 M de Tiouréia, 2% Triton X-100, 1% Dithiothreitol (DTT), e 1 mM de PMSF). A concentração das proteínas foi determinada através do uso de 2-D Quant Kit®. Em seguida, a digestão trípica foi realizada utilizando o método FASP (filter-aided sample preparation), como descrito por (WISNIESKI *et al.*, 2009). Os peptídeos foram secos a vácuo e solubilizados em 50 µL de uma solução contendo 5% (v/v) de acetonitrila (Thermo Fisher Scientific) e 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água de grau MS (Sigma-Aldrich). A concentração de peptídeos foi estimada medindo A205nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Os peptídeos foram armazenados a -80 °C antes das análises por espectrometria de massa.

3.5 Análise proteômica *label free*

A etapa foi realizada a partir dos explantes de pele tratada dos ratos Wistar. Para análise proteômica *label free* foram utilizados 2 µg de peptídeos para corrida no espectrômetro de massas. A aquisição dos espectros de massas foi realizada utilizando um nanoACQUITY UPLC

ligado a um espectrômetro de massa SYNAPT G2 Si (Waters) para análise de LC-ESI-MS/MS, de acordo com as configurações descritas por (REIS *et al.*, 2016). O processamento dos espectros, identificação e quantificação *label-free* das proteínas foram realizados usando os programas ProteinLynx Global Server (PLGS; versão 3.0.2) e ISOQuant (PASSAMANI *et al.*, 2018). (HE, C 2018). Para a identificação das proteínas foram utilizados os bancos de dados disponíveis ratos Wistar (ZHENG *et al.*, 2016).

A fim de assegurar a qualidade dos resultados pós-processamento dos dados, apenas as proteínas que estavam presentes ou ausentes (no caso de proteínas únicas) em todas as três réplicas biológicas foram incluídas na análise de acúmulo diferencial entre a comparação 50 μ M de 5-AzaC / controle. Os dados foram analisados usando o teste t de Student (bicaudal, $P < 0,05$). Proteínas foram consideradas up-acumuladas se os valores de log2 de fold change (FC) fossem maiores que 0,60 e down-acumuladas se os valores de log2 FC fossem menores que -0,60. A anotação funcional foi realizada utilizando o software OmicsBox (www.biobam.com/omicsbox) (versão 2.2). A predição de redes de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) foi construída com valores de confiança $> 0,70$, identificadas através da busca no software STRING (V.12.0; <https://string-db.org>), seguida por análises downstream no software Cytoscape (versão 3.9).

3.6 Análise estatística e interpretação de dados

A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA *two way*. Os resultados foram analisados através de mediana de escores (estatística descritiva) e utilizamos a análise descritiva para avaliar a amostra do estudo.

VI RESULTADOS

4.1 - Estrutura da pele artificial impressa

A microscopia de campo claro mostrou que a pele artificial apresentava uma estrutura homogênea com células presentes (Figura 18A). As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram que a pele artificial impressa era muito porosa (Figura 18B), o que, muito provavelmente, permitiu a entrada de células na estrutura da pele artificial durante o tratamento das feridas.

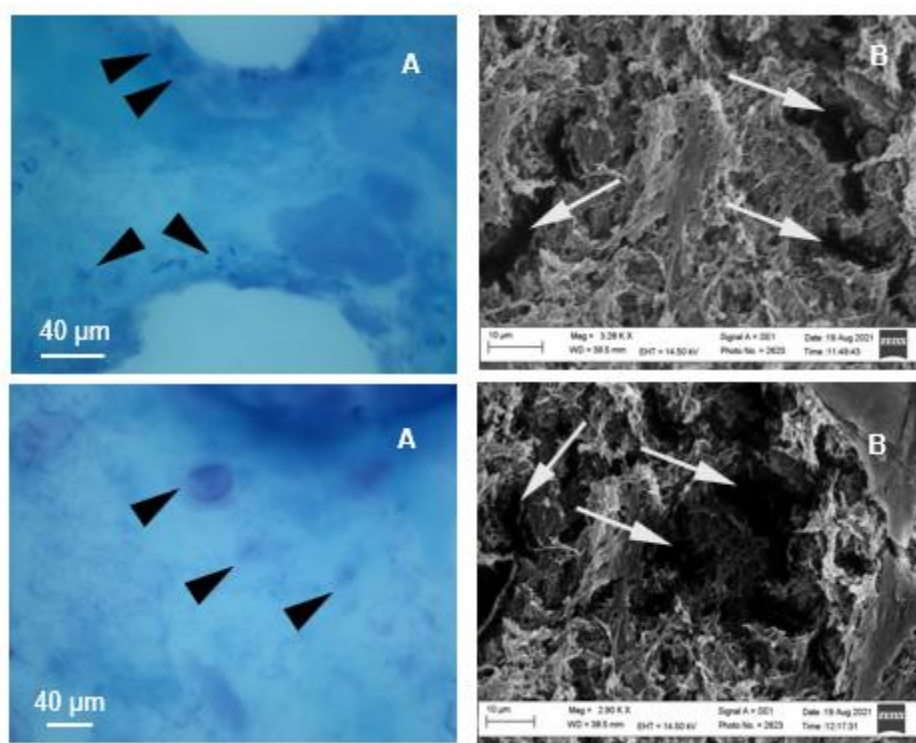


Figura 18: Análise estrutural da pele artificial impressa em 3d. A – Pele artificial observada por microscopia de campo claro após coloração com Hematoxilina-Eosina e ácido periódico de Schiff. Observe a presença de células (pontas de seta). B – Ultraestrutura da pele artificial por microscopia eletrônica de varredura. Uma estrutura porosa pode ser observada (setas).

4.2 Tratamento de feridas em casos clínicos

O estudo apresentou 4 casos de tratamento de feridas: 3 em cães e 1 em um gato, do total de 21 casos clínicos tratados. A Pele artificial impressa foi utilizada em 2 cães (casos 1 e 2), enquanto a pele artificial não impressa foi aplicada em 1 cão (caso 3) e 1 gato (caso 4). As feridas em cães foram causadas por atropelamento, com extensa perda de pele (Figuras 19, 20

e 21). O caso do gato foi de uma ferida ulcerada com exposição óssea causada por esporotricose (Figura 22).

4.2.1 Caso clínico 1

O caso mostra o tratamento de um cão com ferida traumática (incluindo fratura óssea), estágio 2 (Figura 19A). A ferida do animal persistiu por 6 meses, caracterizando uma lesão crônica. Essa lesão foi tratada por 7 dias, resultando em uma ferida quase completamente fechada (Figura 19B).



Figura 19: Caso clínico 1 Cão com ferida de origem traumática (incluindo fratura óssea após atropelamento), crônica, contaminada, estágio 1. O cão apresentava ferida ulcerada há 6 meses (A). Após 7 dias de tratamento com uma única troca de pele artificial impressa em 3 dias, a ferida fechou (B).

4.2.2 Caso clínico 2

O caso 2 mostra o tratamento de um cão com ferida traumática, aguda, infectada, estágio 2 (Figura 20A). A lesão traumática foi tratada por 21 dias. Após 7 dias de tratamento, a maior parte do osso exposto estava coberta por tecido conjuntivo com bordas regulares, tecido de granulação evidente e leito da ferida avermelhado (Figura 20B). Após 14 dias, o osso estava

totalmente coberto e a pele da periferia da ferida recuperada (Figura 20C). Após 21 dias, a ferida estava quase totalmente fechada, com nítida regeneração tecidual, incluindo o retorno da cor original da pelagem do animal (Figura 20D).



Figura 20:Caso clínico 2 Cão com ferimento de origem traumática (atropelamento), agudo, infectado, estágio 2. O ferimento foi tratado por 21 dias com a pele artificial impressa, que era trocada a cada 3 dias. A – Ferimento após limpeza. B – Após 7 dias de tratamento, havia tecido conjuntivo presente na borda do ferimento. C – Ferimento após 14 dias de tratamento. Observe o crescimento de tecido ao redor do ferimento (seta). D – Após 21 dias de tratamento, a pele do cão recuperou os pelos, preservando sua cor original (seta).

4.2.3 Caso clínico 3

O caso 3 mostra o tratamento de uma ferida canina de origem traumática, aguda, contaminada, estágio 2 (Figura 21A). Após 7 dias de tratamento, um tecido homogêneo cresceu sobre a periferia da ferida (Figura 21B). Após 21 dias de tratamento, o tecido apresenta características de recuperação da cor e presença de pelos na área regenerada (Figura 21C).



Figura 21: Caso clínico 3 Cão com ferimento traumático (atropelamento), agudo, contaminado, estágio 1. O ferimento foi tratado com pele artificial não impressa por 21 dias, trocando-a a cada 3 dias. O ferimento fechou e características secundárias da pele, como cor e pelagem, retornaram. A - Ferimento após limpeza e remoção da pele sobre a lesão. B - Após 7 dias de tratamento, tecido conjuntivo estava presente na borda do ferimento. C - Ferimento após 21 dias de tratamento.

4.2.4 Caso clínico 4

O caso 4 mostra o tratamento de uma lesão em pata de gato com ossos expostos devido a uma infecção por esporotricose, crônica, infectada, estágio 3 (Figura 22A). Após a eliminação do fungo, a pata de gato foi tratada por 21 dias. Após 7 dias de tratamento, o tecido conjuntivo cresceu sobre os ossos expostos da pata do gato (Figura 22B). Aos 21 dias de tratamento, o tecido se regenerou sobre os ossos expostos, incluindo o retorno do epitélio e da pelagem da pata do gato (Figura 22C).



Figura 22: Caso clínico 4 Gato com lesão na pata de origem patológica (esporotricose), crônica, infectada, estágio 2. A - O fungo foi tratado e o gato apresentou lesão com exposição óssea (seta e detalhe). B - Após 7 dias de tratamento com a pele artificial não impressa, a pata do gato apresentou crescimento de tecido conjuntivo sobre os ossos (setas). C - Após 21 dias de tratamento com trocas a cada 5 dias, a área lesionada pela infecção na pata do gato estava preenchida com tecido conjuntivo e a reepitelização havia iniciado (setas).

Os demais casos de tratamento estão incluídos na Tabela 3

Tabela3: Classificação das feridas nos casos clínicos dos animais estudados, apresentando o tamanho inicial e o tempo de fechamento da úlcera após tratamento com pele artificial

Casos(animal)	Classificação da ferida						Tratamento				
	Evolução		Presença de infecção				Estágio do envolvimento tecidual			Tamanho inicial da lesão (cm)	Tempo de fechamento da lesão (dias)
	Aguda	Crônica	Limpa	Limpa/contaminada	Contaminada	Infectada	1	2	3		
1 (cão)		X			X			X		16	23
2 (cão)	X		X					X		14	20
3 (cão)	X		X					X		10	18
4 (cão)	X		X				X			28	20
5 (cão)	X			X				X		16	15
6 (cão)	X					X		X		7	6
7 (cão)		X	X						X	17	21
8 (cão)	X			X				X		28	21
9 (gato)		X			X				X	10	21
10 (cão)	X		X						X	10	15
11 (cão)	X				X			X		12	20
12 (gato)		X	X						X	18	33
13 (cão)	X				X			X		14	23
14(cão)	X			X					X	9	30
15(cão)		X	X						X	8	14
16(cão)		X	X						X	6	9
17(cão)	X			X					X	12	26
18(gato)	X				X				X	7	33
19(cão)	X			X					X	15	25
20(gato)		X	X					X		13	28
21(cão)	X				X			X		10	35

4.3 Tratamento de lesões tegumentares em ratos

Feridas tegumentares homogêneas e bem definidas foram produzidas com sucesso em ratos (Figura 23A). Após 5 dias, as feridas do grupo controle eram maiores em relação às feridas tratadas com Kollagenase® ou pele artificial não impressa (Figura 23B). Após 10 dias, as feridas tratadas com pele artificial não impressa apresentaram tamanho reduzido em comparação ao grupo controle e ao tratamento com colagenase (Figura 23C). Após 20 dias, independentemente do grupo, tamanhos de feridas semelhantes foram observados (Figura 23D). A quantificação do tamanho das feridas dos diferentes grupos durante o período experimental confirmou uma redução mais rápida no tamanho das feridas após o tratamento com pele

artificial não impressa em relação ao tratamento com collagenase e ao grupo controle, mas após 20 dias os tamanhos das feridas foram semelhantes (Figura 23E).

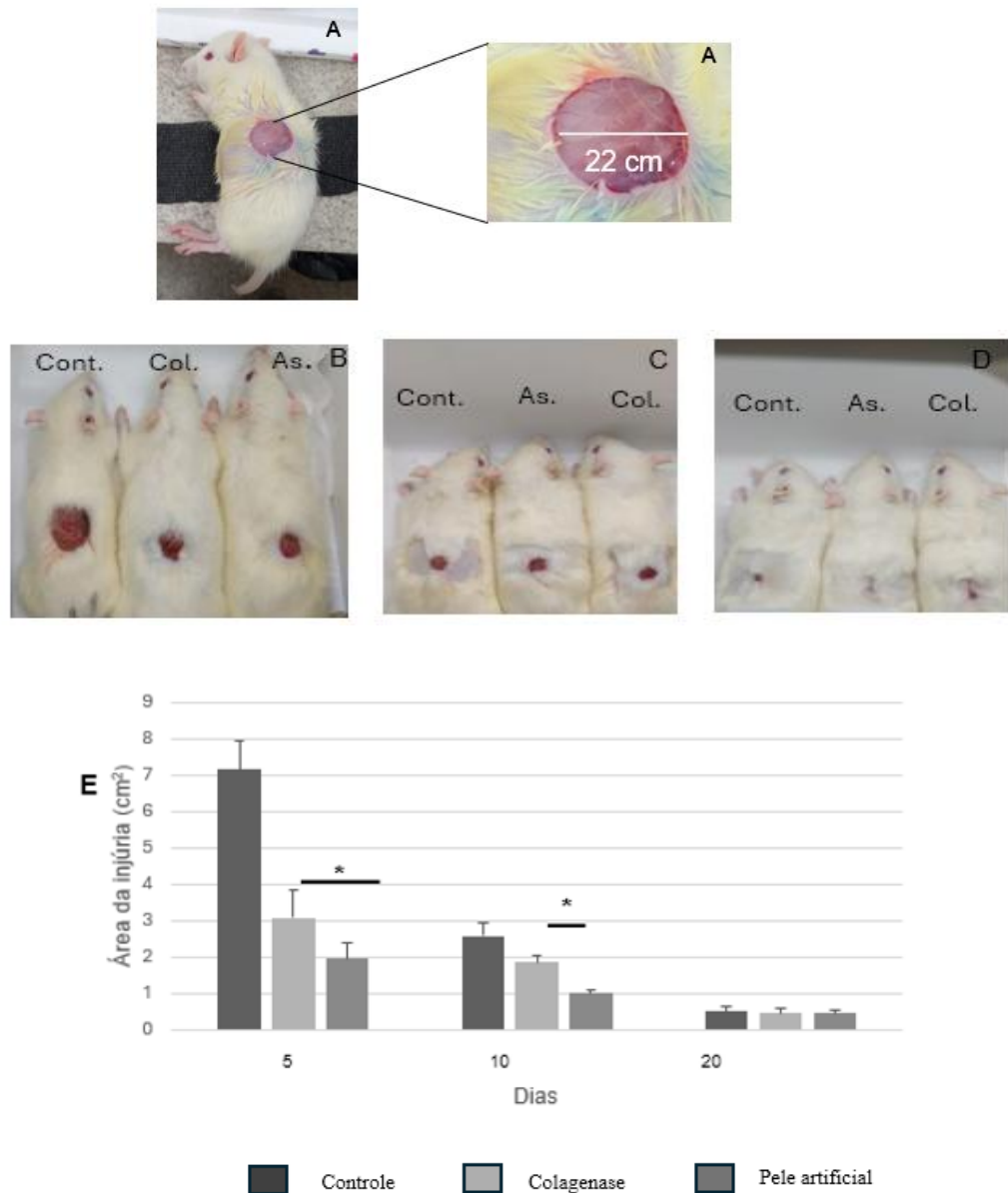


Figura 23: Tratamento de feridas tegumentares em ratos experimentais. A – Ferida recentemente gerada realizada em um rato (22 mm de diâmetro). Feridas com bordas retas na epiderme e derme são vistas. B – Aparência das feridas após 5 dias no grupo controle (sem tratamento – Cont.), tratamento com pele artificial não impressa (As.) e tratamento com collagenase (Col.). C – Após 10 dias, os tamanhos das feridas reduziram no controle, tratamento com collagenase e pele artificial, mas estes últimos foram menores. D - Após 20 dias, os tamanhos das feridas foram semelhantes independentemente do grupo

E - Área das feridas durante o período experimental entre os grupos (controle, collagenase e tratamento com pele artificial não impressa). O tratamento com collagenase e pele artificial resultou em redução mais rápida do tamanho da pele, com tamanho menor para o tratamento com pele artificial após 10 dias, mas tamanhos semelhantes em todos os grupos no final do experimento. * $P < 0,05$.

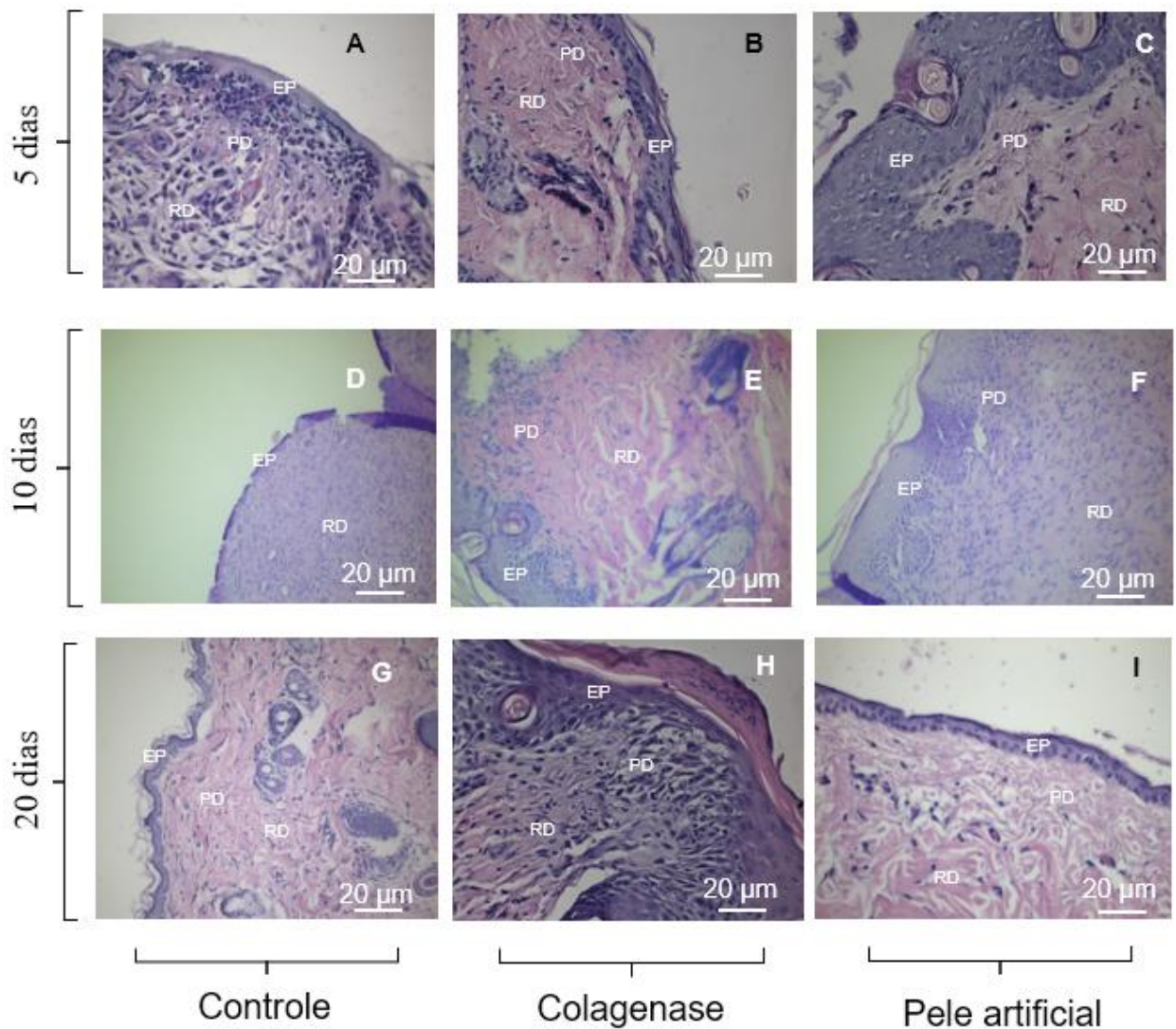
4.4 Análise histológica do explante da pele tratada

A histologia após 5 dias mostrou que o controle apresentou pouca recuperação da epiderme e muitos infiltrados inflamatórios na derme (Figura 24A). O tratamento com collagenase no mesmo período demonstrou aumento da fibrose na derme papilar (Figura 24B), mas o tratamento com pele artificial não impressa demonstrou uma construção tecidual com camadas bem definidas de epiderme, derme papilar e derme reticular (Figura 24C). Resultados semelhantes foram observados após 10 dias (Figura 24D, 24E, 24F) e 20 dias (Figura 24G, 24H, 24I). Além disso, a espessura da derme papilar foi maior no tratamento com pele artificial quando comparada ao controle e ao tratamento com Kollagenase®, mas só funcionou quando 20% da primeira biotinta foi misturada com 80% do homogeneizado de colágeno-alginato (Figura 24J). A derme papilar apresentou cerca de 204 micrômetros de espessura em secção transversal (Figura 24J - detalhe). Essa estrutura desempenha um papel crucial na cicatrização de feridas, pois se forma a partir dos remanescentes da bainha fibrosa da raiz.

No grupo Controle (quadros A D e G) que foi tratado apenas com PBS, visualizamos uma fina camada (mais externa) de queratina, seguida de um número aumentado de neutrófilos polimorfonucleares de forma bem desordenada 5 dias após a estruturação da úlcera artificial (quadro A), o que demonstra um intenso processo inflamatório em decorrência da ruptura da pele do animal. Essa inflamação diminui com o tempo (quadro D – 10 dias) e praticamente desaparece ao final do tratamento (quadro G) onde os neutrófilos dão lugar os fibroblastos: as células responsáveis pela estruturação do novo tecido através da produção de fibras de colágeno. Quando olhamos para o grupo tratado com Kollagenase®, (quadros B E e H) em 5, 10 e 20 dias, respectivamente, o processo inflamatório diminui consideravelmente ao mesmo tempo que a quantidade de fibroblastos e produção de fibras de colágeno aumenta. Ao longo do tratamento, a derme do animal vai sendo, portanto, cicatrizada; porém algumas fibras de colágeno são destruídas pela ação enzimática da pomada que tem a capacidade de decompor o

colágeno em seu estado natural ou desnaturado, contribuindo na formação de tecido novo, que chamamos de granulação e subsequente cicatrização da ferida.

No grupo tratado com a Pele Artificial associada a biotinta (quadros C, F e I) em 5, 10 e 20 dias, respectivamente, notamos que o processo inflamatório é extremamente controlado: poucos neutrófilos são necessários para manter a homeostase do tecido. A partir de 10 dias de tratamento (quadro F), a derme mostra-se mais estruturada e organizada, resultado da grande quantidade de colágeno. Em 20 dias de tratamento (quadro I) já notamos a produção de uma fina camada de queratina, seguida pela epiderme, e a derme, resultando no fechamento da úlcera artificial através de um processo fisiológico mais organizado e controlado que chamamos de remodelamento.



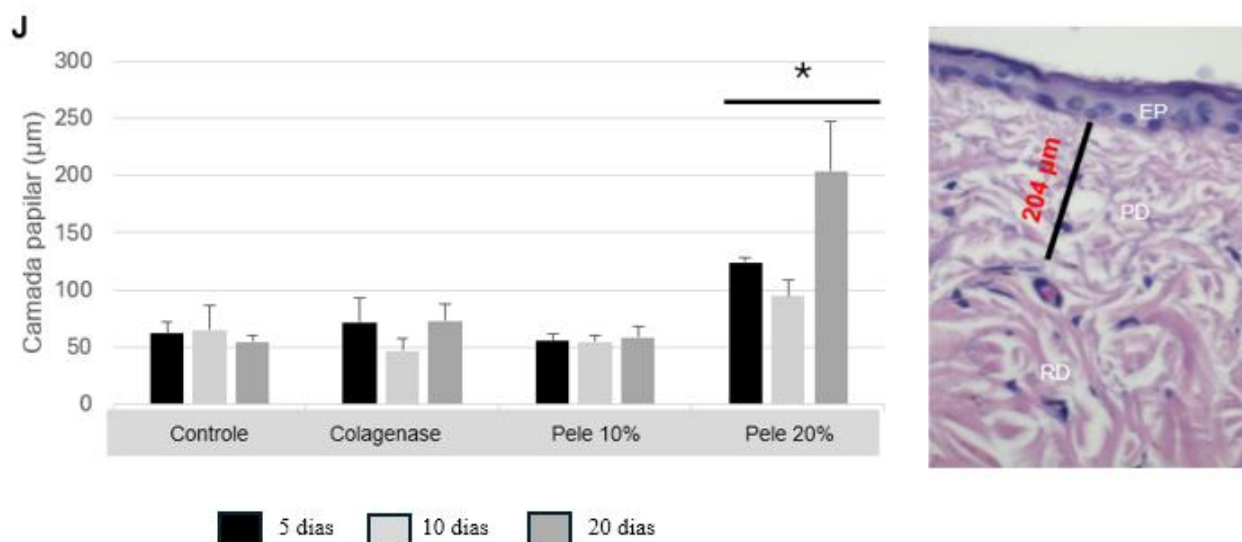


Figura 24: Imagens histológicas de feridas cutâneas após coloração com hematoxilina e eosina e ácido periódico de Schiff em 5 (A, B, C), 10 (D, E, F) e 20 (G, H, I) dias; controle (A, D, G), tratamento com colagenase (B, E, H) e tratamento com pele artificial não impressa (C, F, I). Em 5 dias, o controle apresentou células inflamatórias. A derme papilar foi mais espessa no tratamento com pele artificial em comparação aos tratamentos controle e colagenase. No entanto, esse efeito foi observado apenas quando a primeira biotinta foi misturada em uma proporção de 20% com 80% do homogeneizado de colágeno-alginato (J). A derme papilar tinha cerca de 204 micrômetros de espessura em seção transversal (J - inserção). Derme fibrótica foi observada nas feridas dos grupos controle e tratado com colagenase, enquanto o tratamento com pele artificial apresentou derme papilar e reticular bem definidas após 10 e 20 dias de tratamento. EP – Epiderme, PD – Derme Papilar, RD – Derme Reticular.

4.5 Ultraestrutura da recuperação da ferida cutânea

A microscopia eletrônica de transmissão, após 5 dias de tratamento das feridas, mostrou que o controle apresentou processo inflamatório com macrófagos (Figura 25A) e eosinófilos; após 10 dias, foi detectado colágeno espesso tipo 1 (Figura 25D), que se manteve após 20 dias (Figura 25G). As feridas tratadas com colagenase por 5 dias apresentaram destruição do colágeno e células fibroblásticas danificadas (Figura 10B), o que também foi observado após o tratamento por 10 dias (Figura 10E) e 20 dias (Figura 10H). O tratamento com pele artificial não impressa por 5 dias (Figura 10C) demonstrou produção de colágeno mais espesso (tipo 1),

e um colágeno mais fino (colágeno 3) foi produzido em 10 dias (Figura 10F) e tornou-se mais organizado em 20 dias (Figura 10I).

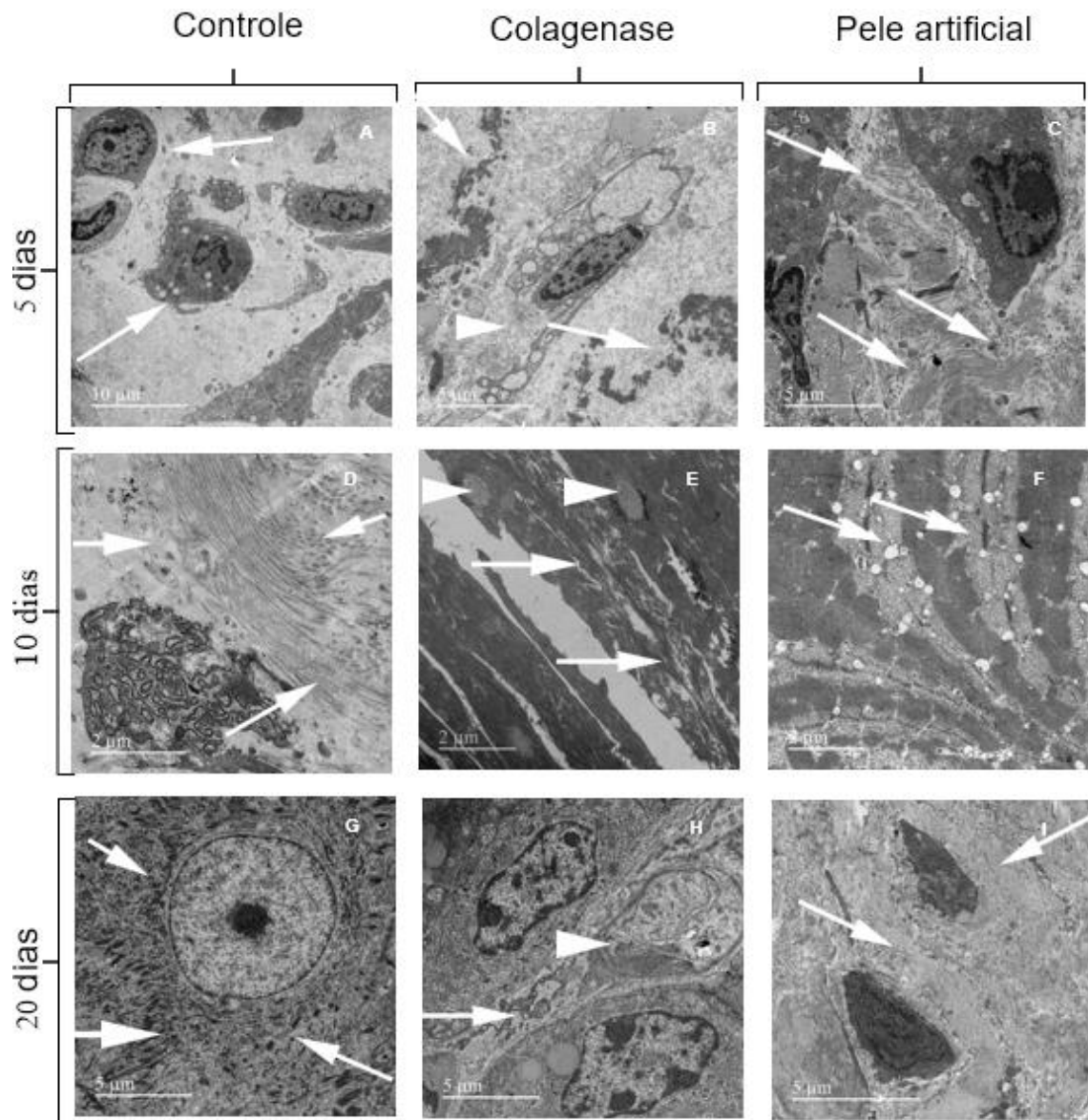


Figura 25: Microscopia eletrônica de transmissão das feridas cutâneas aos 5 (A, B, C), 10 (D, E, F) e 20 (G, H, I) dias com diferentes tratamentos. Aos 5 dias, o controle apresentou células inflamatórias, como macrófagos (A - setas), enquanto aos 10 dias, um colágeno espesso foi produzido e depositado na matriz celular (D - setas) e após 20 dias, o colágeno foi visto dentro das células dos fibroblastos (G - setas). O tratamento com colagenase afetou a integridade do colágeno (setas) e também a integridade dos fibroblastos (pontas de seta) em todos os tempos de tratamento (B, E, H). O tratamento com pele artificial não induziu

a produção de colágeno espesso após 5 dias (C - setas) e após 10 (F) e 20 (I) dias, colágeno fino foi observado (setas).

4.6 Análise das proteínas diferencialmente expressas nos explantes da pele tratada

Em 10 dias de tratamento, encontramos 24 proteínas diferencialmente acumuladas, sendo que 7 dessas estão *upreguladas* na pele artificial e 6 proteínas encontradas *unicamente* na pele (Tabela 4). Esses resultados poderão servir para beneficiar o tratamento clínico de úlceras cutâneas ou doenças com lesões refratárias que envolvam disfunção das células epidérmicas e bloqueio da reepitelização, podendo se tornar um recurso essencial para pesquisa básica e translacional e abrir uma importante porta para a inovação.

Tabela 4: Análise Proteômica dos explantes de após 10 dias de tratamento (P- Pele artificial, K – Colagenase e C -controle)

Protein differential accumulation							
ID	Description	t-test		LOG2 FC		Differential regulation	
		P/C	P/K	P/C	P/K	P/C	P/K
P00564	Creatine kinase M-type	0.0406957	-	2.0530367	-	UP	UNIQUE P
Q4QRB4	Tubulin beta-3 chain	0.00356	0.0132654	1.1824336	0.6061194	UP	DOWN
A0A8I6G322	Tropomyosin 3	0.0427367	0.3390107	0.6897814	0.3700359	UP	UNCHANGED
A0A8I6A9A3	Myosin heavy chain 14	0.0312736	0.9485704	1.8327364	0.0227722	UP	UNCHANGED
A0A0G2K230	Desmocollin 3	0.0327228	0.689196	0.6587613	0.2204946	UP	UNCHANGED
Q7TP75	Alpha-2-HS-glycoprotein	-	0.4885372	-	0.3716842	UNIQUE P	UNCHANGED
P12928	Pyruvate kinase PKLR	-	0.5637722	#DIV/0!	0.2089518	UNIQUE P	UNCHANGED
A0A8I6AE64	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	0.041504	0.9025064	0.7975656	0.0672586	DOWN	UNCHANGED
P36953	Afamin	0.0188137	0.7718159	0.8040597	0.1142868	DOWN	UNCHANGED
A0A8I6A897	Fibrillin 1	0.0272724	0.719141	0.8119642	0.1583814	DOWN	UNCHANGED
A0A8L2R7U3	Tubulin beta chain	-	-	-	-	UNIQUE C	UNIQUE K
A0A8L2QL20	Eukaryotic translation initiation factor 4H	-	-	-	-	UNIQUE C	UNIQUE K
A0A8I5YC61	phosphopyruvate hydratase	-	-	-	-	UNIQUE C	UNCHANGED
Q6IFW2	Keratin type I cytoskeletal 40	-	-	-	-	UNIQUE C	UNCHANGED
A0A8I6A1Y5	Similar to polyubiquitin	-	-	-	-	UNIQUE C	UNCHANGED
P55063	Heat shock 70 kDa protein 1-like	-	-	-	-	UNIQUE C	UNCHANGED
P11980	Pyruvate kinase PKM	0.0962387	0.0079586	0.4659774	1.6225066	UNCHANGED	UP
P19527	Neurofilament light polypeptide	0.0643294	0.031501	0.8368198	0.9213002	UNCHANGED	UP
Q63279	Keratin type I cytoskeletal 19	0.0816727	-	2.7180737	-	UNCHANGED	UNIQUE P
Q6IE52	Murine globulin-2	0.460008	-	0.3612056	-	UNCHANGED	UNIQUE P

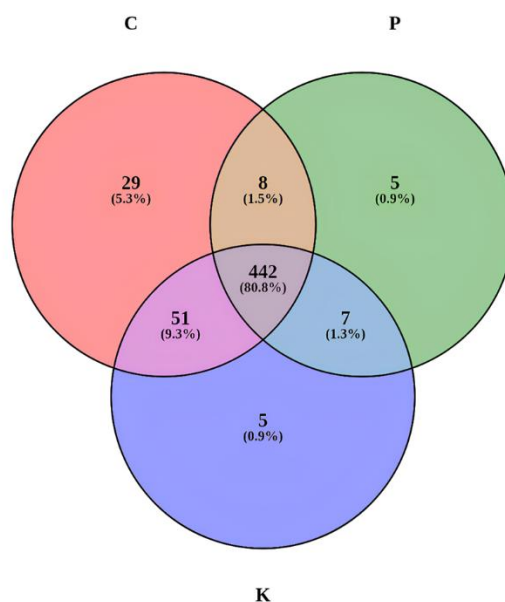


Figura 26: Diagrama de VENN. Mostramos as relações de sobreposição e exclusividade no conjunto de 24 proteínas diferencialmente expressas nos explantes de pele tratada

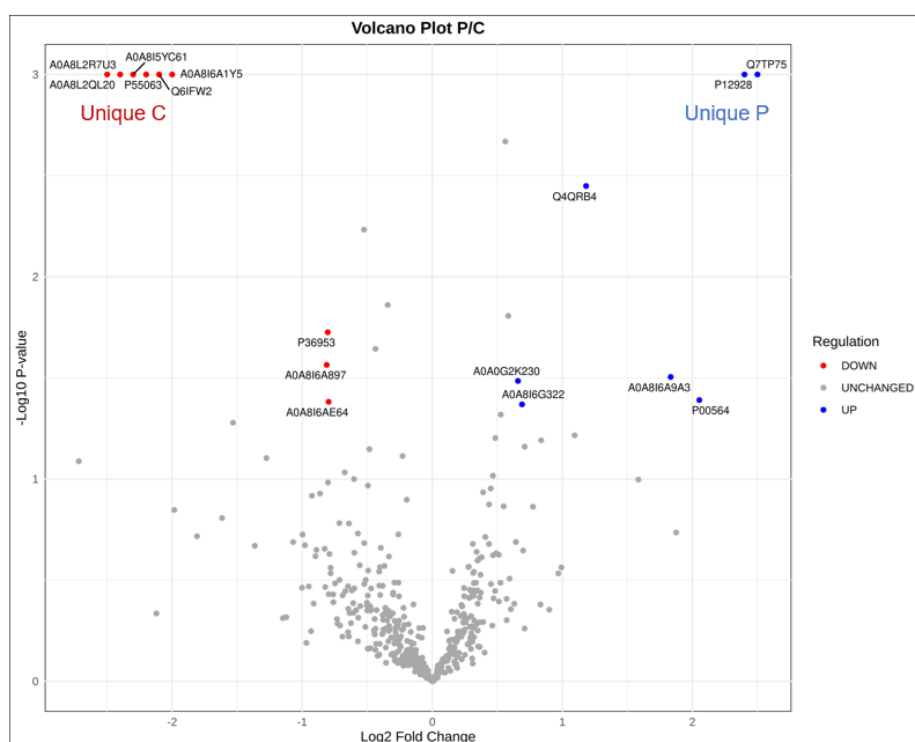


Figura 27: Gráfico Volcano da expressão diferencial entre os grupos Pele artificial e Controle

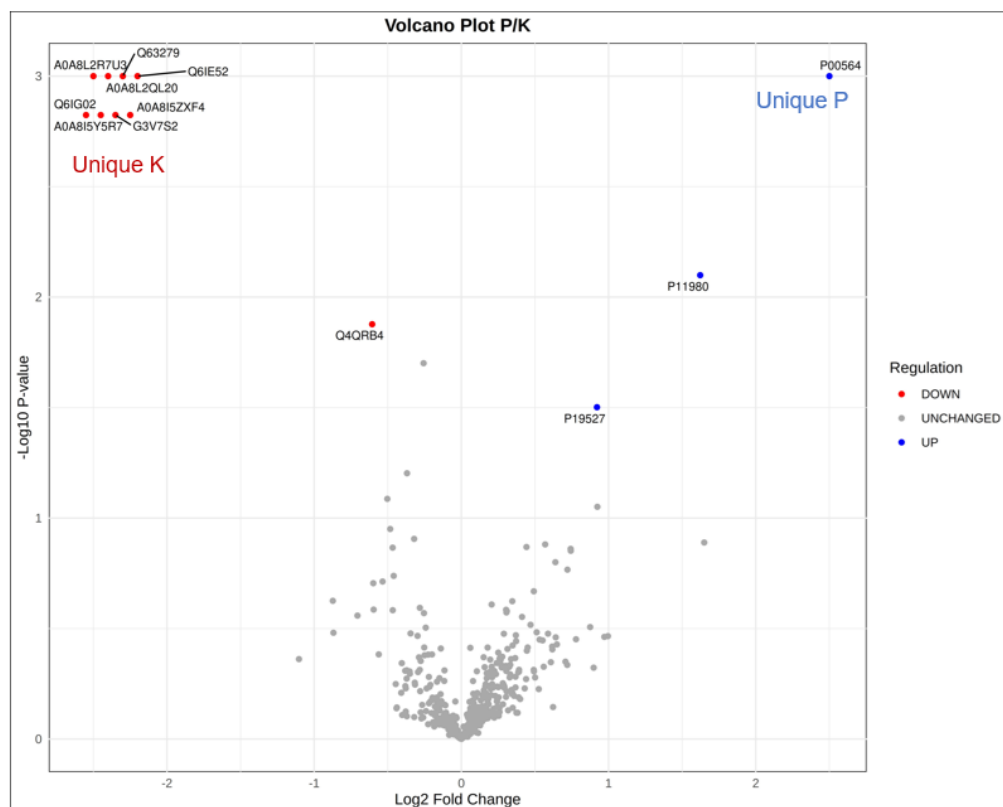


Figura 28: Gráfico Volcano da expressão diferencial entre os grupos Pele artificial e Kollagenase®

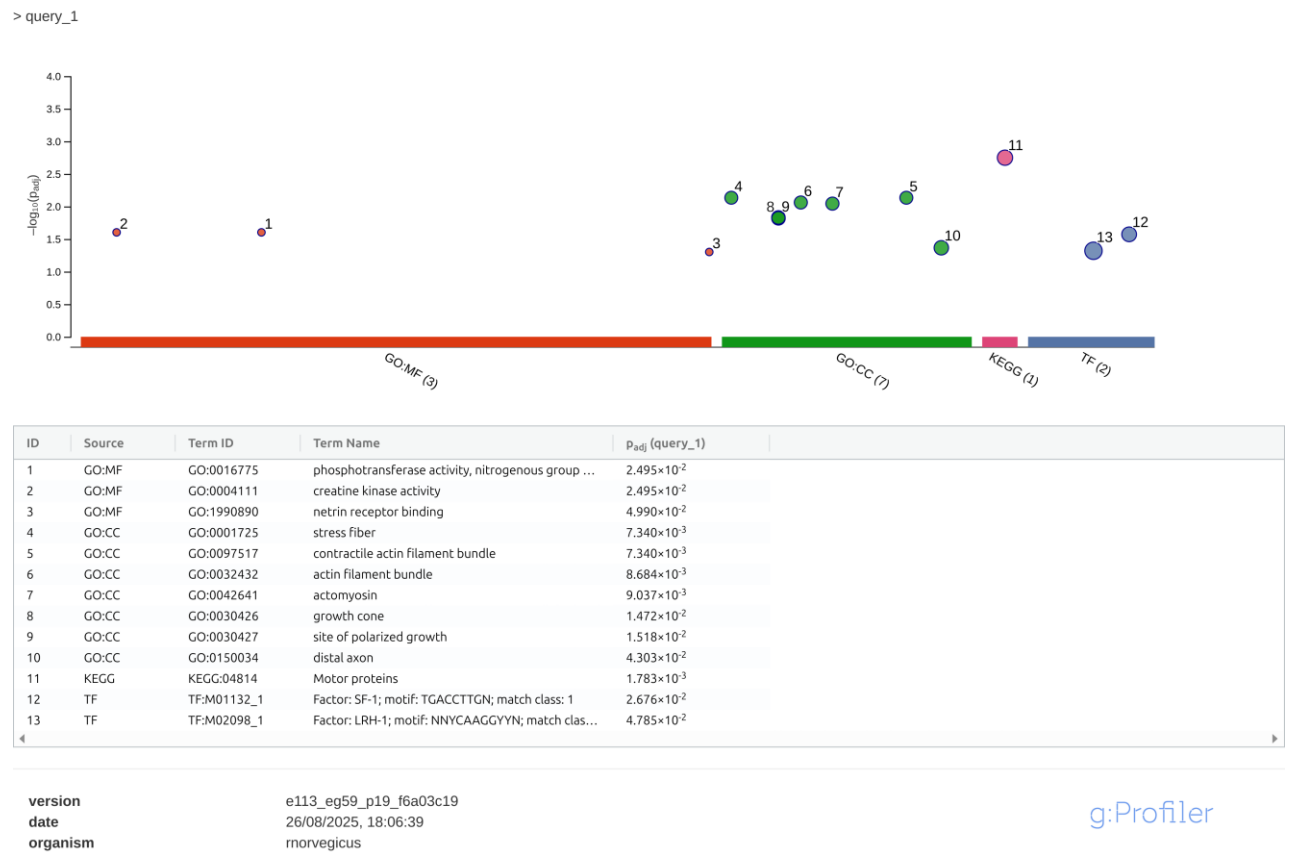


Figura 29: Predição funcional das proteínas diferencialmente acumuladas

V DISCUSSÃO

A lesão tecidual é um grande problema, pois nenhum tratamento existente garante a regeneração completa e a restauração completa da função. Além disso, a lesão crônica pode levar à fibrose e à cicatrização incompleta (CHEN *et al.*, 2022). Avanços como arcabouços biologicamente ativos ajudam a promover a regeneração modulando as vias de sinalização (YANG *et al.*, 2023).

Desenvolvemos uma pele artificial impressa ou não em 3D que proporcionou a regeneração de feridas cutâneas. A pele artificial impressa era porosa e continha células. Feridas em cães cicatrizaram rapidamente com o tratamento com pele artificial impressa, enquanto a pele artificial não impressa também foi igualmente eficaz. Em ambos os casos, as características secundárias da pele foram restauradas. Um gato com ferida infecciosa e osso exposto recuperou-se com tratamento com pele artificial não impressa. Em ratos com feridas cutâneas tegumentares experimentais, o tratamento com pele artificial não impressa levou à regeneração da pele, incluindo a formação de derme papilar e reticular com colágeno bem restaurado. A compreensão desses mecanismos pode orientar terapias para aumentar a regeneração e reduzir a formação de cicatrizes.

Na engenharia de tecidos cutâneos, a impressão 3D é usada para criar andaimes com uma estrutura precisa que replica a arquitetura da pele natural, oferecendo diversas vantagens em relação aos curativos tradicionais. Esses andaimes fornecem um microambiente poroso que suporta a inserção, integração e migração de células, ao mesmo tempo que facilita a entrega de fatores de crescimento essenciais para processos biológicos, como a cicatrização de feridas (YE *et al.*, 2023). O projeto e a fabricação de andaimes porosos são processos complexos que exigem consideração cuidadosa do tamanho, formato e alinhamento dos poros. ULLAH *et al.* (2021) exploram o uso da geometria fractal para modelar e imprimir em 3D estruturas porosas com poros distribuídos aleatoriamente, destacando as limitações dos métodos convencionais baseados em andaimes, que muitas vezes têm dificuldade em atingir a distribuição de poros desejada. Da mesma forma, (ZHANG *et al.* 2021) examinam como a porosidade, o comprimento dos poros, o formato e o alinhamento afetam a liberação de fármacos em produtos farmacêuticos produzidos com aditivos à base de extrusão. O estudo constatou que uma maior porosidade aumenta significativamente as taxas de liberação do fármaco, enquanto o alinhamento dos poros influencia a cinética de liberação quando a largura dos poros é pequena. A estrutura porosa da pele artificial desempenha um papel crucial na migração celular,

promovendo a vascularização — um processo essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes ao tecido recém-formado (MUKASHEVA *et al.*, 2024). Nossos resultados confirmam que a pele artificial impressa apresenta porosidade, permitindo a integração celular eficaz à ferida, de forma aceitável, possibilitando a restauração da lesão.

Cães com feridas agudas e crônicas foram tratados com uma única aplicação de pele artificial impressa, levando ao fechamento quase completo em 7 a 21 dias. Uma ferida canina tratada com pele artificial não impressa também apresentou cicatrização satisfatória. Em comparação, KOŽÁR *et al.* (2022) utilizaram uma esponja de colágeno Suprasorb® C, alcançando o fechamento em 24,6 dias. A pele artificial acelerou a cicatrização em todos os casos caninos, independentemente da ontogenia da ferida, auxiliando na recuperação das características tegumentares secundárias. Notavelmente, a pele artificial não impressa provou ser uma alternativa eficaz, mais rápida e mais econômica. A recuperação da ferida com a presença de pele e pelagem restauradas sugere que a pele artificial foi capaz de regenerar a ferida.

O tratamento com pele artificial em um gato com ferida de esporotricose e osso exposto promoveu o crescimento do tecido conjuntivo e a regeneração epitelial sobre o osso exposto. Enquanto ZHANG *et al.* (2024) demonstraram a eficácia da fibrina rica em plaquetas na cicatrização de feridas em gatos, nosso estudo combinou pele artificial com PRP, aumentando a produção de fatores de crescimento e reduzindo a inflamação — ambos cruciais para a formação de colágeno. Esses achados sugerem que a pele artificial homóloga é eficaz em todas as espécies e pode servir como uma alternativa viável à amputação.

Todos os 21 casos clínicos testados apresentaram sucesso no fechamento das úlceras em um tempo reduzido, de acordo com o tamanho e a profundidade da lesão. Segundo (SOARES *et al.* 2024), cães com úlceras levaram cerca de 47 dias para fechar a ferida com a aplicação de plasma rico em fibrina. Gatos também foram tratados com plasma rico em fibrina, levando 54 dias para o fechamento da úlcera (SOARES *et al.*, 2021).

Ao comparar o tempo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos após diferentes tratamentos, observamos que a redução da área da ferida foi mais rápida nos grupos com collagenase e pele artificial não impressa, com menor tamanho da lesão no 10º dia de tratamento no grupo com pele artificial. A histologia mostrou uma forte resposta inflamatória no início dos tratamentos. O grupo de pele artificial não impressa desenvolveu uma derme papilar mais espessa em comparação aos grupos controle e collagenase. Ao final dos tratamentos, os grupos controle e collagenase apresentaram derme fibrótica, enquanto o grupo

de pele artificial apresentou derme papilar e reticular bem definidas, indicando regeneração bem-sucedida da camada cutânea. A microscopia eletrônica de transmissão das feridas cutâneas entre os diferentes tratamentos revelou diferenças notáveis, confirmando os achados histológicos. O tratamento com collagenase comprometeu tanto a integridade do colágeno quanto a estrutura dos fibroblastos. Em contraste, o tratamento com pele artificial estimulou a produção de colágeno espesso em 5 dias.

Recentemente, estudos de perfil transcriptômico da pele, incluindo análises em nível unicelular, mapearam o panorama da expressão gênica de células associadas à pele e revelaram a presença de genes específicos (EDQVIST, H. 2015). Isso sugere que a pele e seus tipos celulares componentes provavelmente empregam proteomas únicos para facilitar as funções estruturais, homeostáticas e imunológicas. Estudos anteriores identificaram uma pequena fração do proteoma expresso, provavelmente devido a dificuldades na separação e homogeneização do tecido e à predominância de proteínas estruturais como a queratina (MIKESH, M. 2013).

A proteômica baseada em espectrometria de massas (EM) tornou-se um método sensível e preciso para análises proteômicas em larga escala, que permitem a caracterização de proteomas quase completos, elucidando as complexidades da pele e permitindo uma análise detalhada das distribuições e interações moleculares dentro dos tecidos cutâneos (OZORUN *et al.*, 2024). No nosso estudo, após 10 dias de tratamento, encontramos 24 proteínas diferencialmente acumuladas, sendo que 7 dessas estão *upreguladas* na pele artificial e 6 proteínas encontradas *unicamente* na pele, mostrando o potencial da proteômica para revelar a diversidade celular e molecular da pele em distintos estados regenerativos

VI CONCLUSÃO

Desenvolvemos a “pele artificial” através da tecnologia de biomateriais associada a impressão 3D contendo uma estrutura porosa que permitiu a instalação de células capazes de estimular a regeneração do tecido lesionado.

Todos os 21 casos clínicos tratados nesse estudo obtiveram sucesso no tratamento das úlceras, resultando em fechamento significativo da ferida em poucos dias, remissão de processos infecciosos, menor número de trocas de curativos, aceleração da regeneração e restauração de características tegumentares secundárias. A pele artificial proposta, impressa e não impressa, promoveu a cicatrização eficaz de feridas em diferentes espécies de cães e tipos de feridas. O tratamento de um gato com ferida infecciosa e exposição óssea reforça ainda mais a aplicabilidade da pele artificial, sugerindo que ela pode servir como alternativa à amputação em casos graves.

Ao compararmos o tempo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos após os diferentes tratamentos, vimos que a redução da área da ferida foi mais rápida no grupo tratado com a pele artificial. A análise histológica e ultra estrutural dos explantes da pele dos ratos confirmou que a pele artificial aprimorou a regeneração dérmica, levando à formação de uma derme papilar e reticular bem-organizada. Comparada ao tratamento com collagenase, a pele artificial preservou a integridade do colágeno e a estrutura dos fibroblastos, promovendo uma resposta inflamatória equilibrada e um reparo tecidual eficiente.

A microscopia eletrônica de transmissão desses explantes revelou diferenças notáveis, confirmando os achados histológicos. O tratamento com collagenase comprometeu tanto a integridade do colágeno quanto a estrutura dos fibroblastos. Em contraste, o tratamento com pele artificial estimulou a produção de colágeno espesso em cinco dias, que gradualmente transitou para colágeno mais fino ao final do tratamento.

O perfil proteômico da pele revelou a presença de proteínas específicas, o que sugere que a pele e seus tipos celulares componentes provavelmente empregam proteomas únicos para facilitar as funções estruturais, homeostáticas e imunológicas. Esta é uma conquista notável e uma solução promissora para melhorar a recuperação de vários tipos de feridas.

Essas descobertas estabelecem a pele artificial como uma opção viável e econômica para o tratamento de feridas, com implicações promissoras tanto para a medicina veterinária quanto para a humana.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, N.M., Abass, S.A. Matrix metalloproteinase contribution in management of cancer proliferation, metastasis and drug targeting. *Mol Biol Rep* **48**, 6525–6538 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06635-z>

AHMED, H. *et al.* **Platelets Rich Plasma Injections for Chronic Plantar Fasciitis.** *Benha Journal of Applied Sciences*, 2024. doi.org/10.21608/bjas.2024.289920.1428

ANDRIOTIS, E. *et al.* **Development of bio-active patches based on pectin for the treatment of ulcers and wounds using 3D-bioprinting technology.** *Pharmaceutics*, v. 12, n. 1, p. 56, 2020. doi.org/10.3390/pharmaceutics12010056

ANITUA, E. *et al.* **Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture.** *Journal of Orthopaedic Research*, v. 23, n. 2, p. 281-286, 2005. doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.015

BALTAZAR, T. *et al.* **Three-dimensional bioprinting of a vascularized and perfusable skin graft using human keratinocytes, fibroblasts, pericytes, and endothelial cells.** *Tissue Engineering. Part A*, 2020 doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0201

BARRIENTOS, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). **Growth factors and cytokines in wound healing.** *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 16(5), 585–601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>

BANNON P, Wood S, Restivo T, Campbell L, HardmanMJ, Mace KA. 2013 Diabetes induces stable intrinsic changes to myeloid cells that contribute to chronic inflammation during wound healing in mice. *Dis. Models Mech.* 6, 1434–1447. (doi:10.1242/dmm.012237)

BERMUDEZ, D. M., Herdrich, B. J., Xu, J., Lind, R., Beason, D. P., Mitchell, M. E., Soslowsky, L. J., & Liechty, K. W. (2011). Impaired biomechanical properties of diabetic skin implications in pathogenesis of diabetic wound complications. *The American journal of pathology*, 178(5), 2215–2223. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.015>

BIDEAU L, Kerner P, Hui J, Vervoort M, Gazave E. **Animal regeneration in the era of transcriptomics.** *Cell Mol Life Sci.* 2021 Apr;78(8):3941-3956. doi: 10.1007/s00018-021-03760-7. Epub 2021 Jan 30. Erratum in: *Cell Mol Life Sci.* 2024 Dec 27;82(1):25. doi: 10.1007/s00018-024-05488-6. PMID: 33515282; PMCID: PMC11072743.

CAÑEDO-DORANTES, L., & Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International journal of inflammation*, 2019, 3706315. <https://doi.org/10.1155/2019/3706315>

CHEN, K. *et al.* **Roles of the fibroblast growth factor signal transduction system in tissue injury repair.** *Burns & Trauma*, v. 10, 2022. doi.org/10.1093/burnst/tkac005

CUI, H. *et al.* **3D bioprinting for organ regeneration.** *Advanced Healthcare Materials*, 2017. doi.org/10.1002/adhm.201601118

CHILDS, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*, 21(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>

CHUNG, H. J., Steplewski, A., Chung, K. Y., Uitto, J., & Fertala, A. (2008). Collagen fibril formation. A new target to limit fibrosis. *The Journal of biological chemistry*, 283(38), 25879–25886. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804272200>

DASH, M. *et al.* **Chitosan—a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications.** *Progress in Polymer Science*, v. 36, 2011. doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001

DAI, C., Shih, S., & Khachemoune, A. (2020). **Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review.** *Journal of Dermatological Treatment*, 31(6), 639–648. <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>

DE SZALAY, S.; Wertz, P.W. **Protective Barriers Provided by the Epidermis.** *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 3145. <https://doi.org/10.3390/ijms24043145>

Diridollou, S., Vabre, V., Berson, M., Vaillant, L., Black, D., Lagarde, J. M., Grégoire, J. M., Gall, Y., & Patat, F. (2001). Skin ageing: changes of physical properties of human skin in vivo. *International journal of cosmetic science*, 23(6), 353–362. <https://doi.org/10.1046/j.0412-5463.2001.00105.x>

FARAMARZI, N. *et al.* **Patient-specific biinks for 3D bioprinting of tissue engineering scaffolds.** *Advanced Healthcare Materials*, v. 7, n. 11, 2018. doi.org/10.1002/adhm.201701347

FÉRNANDEZ-GUARINO, M. *et al.* **Disturbances in the skin homeostasis: wound healing, an undefined process.** *Cosmetics*, 2024. doi.org/10.3390/cosmetics11030090

GUEST, J. F., Ayoub, N., McIlwraith, T., Uchegbu, I., Gerrish, A., Weidlich, D., Vowden, K., & Vowden, P. (2015). Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ open*, 5(12), e009283. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009283>

GUILLAMAT-PRATS R. (2021). The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. *Cells*, 10(7), 1729. <https://doi.org/10.3390/cells10071729>

HOSSEINPOUR, M. *et al.* **Application of natural polymers in skin tissue engineering using 3D scaffold.** *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, v. 74, n. 4, p. 285-296, 2024.: doi.org/10.1080/00914037.2024.2335160

HAMZEH Alipour, Abbasali Raz, Sedigheh Zakeri, Navid Dinparast Djadid. **Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review**, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Volume 6, Issue 11, 2016, Pages 975-981, ISSN 2221-1691, <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.017>.

HE, C., Jia, C., Zhang, Y., & Xu, P. (2018). Enrichment-Based Proteogenomics Identifies Microproteins, Missing Proteins, and Novel smORFs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of proteome research*, 17(7), 2335–2344. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00032>

HU, Y., YU, L., DAI, Q., HU, X., & SHEN, Y. (2024). Multifunctional antibacterial hydrogels for chronic wound management. *Biomaterials science*, 12(10), 2460–2479. <https://doi.org/10.1039/d4bm00155a>

HUNT, N. C.; GROVER, L. M. **Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine.** *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 6, 2010. doi.org/10.1007/s10529-010-0221-0

LARONHA, H., & Caldeira, J. (2020). Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*, 9(5), 1076. <https://doi.org/10.3390/cells9051076>

LUKOMSKYJ, A.O., Rao, N., Yan, L. *et al.* Stem Cell-Based Tissue Engineering for the Treatment of Burn Wounds: A Systematic Review of Preclinical Studies. *Stem Cell Rev and Rep* **18**, 1926–1955 (2022). <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10341-z>

LEFÈVRE-UTILE, A.; Braun, C.; Haftek, M.; Aubin, F. **Five Functional Aspects of the Epidermal Barrier**. *Int.J.Mol.Sci.* **2021**, 22,11676. <https://doi.org/10.3390/ijms222111676>

MUKASHEVA, F. et al. **Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 12, 2024. doi.org/10.3389/fbioe.2024.1444986

NAYAK, B. Set al, **Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of Morinda citrifolia L. leaf. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 3, p. 351-356, 2009. doi.org/10.1093/ecam/nem127

NOCERA, A. D. et al. **Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering**. *Biomedical Microdevices*, v. 20, n. 2, 2018. doi.org/10.1007/s10544-018-0270-z.

NICOLAOU A, Kendall AC. **Bioactive lipids in the skin barrier mediate its functionality in health and disease**. *Pharmacol Ther.* 2024 Aug; 260:108681. doi: 10.1016/j.pharmthera.2024.108681. Epub 2024 Jun 17. PMID: 38897295.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. **Tissue and organ regeneration: an introduction**. *Academic Press*, p. 3-9. doi.org/10.1016/B978-0-12-821085-7.00001-4
POSS KD, Tanaka EM. **Hallmarks of regeneration**. *Cell Stem Cell.* 2024 Sep 5;31(9):1244-1261. doi: 10.1016/j.stem.2024.07.007. Epub 2024 Aug 19. PMID: 39163854; PMCID: PMC11410156.

PRIESTER, C., MACDONALD, A., DHAR, M. S., & BOW, A. (2020). Examining the Characteristics and Applications of Mesenchymal, Induced Pluripotent, and Embryonic Stem Cells for Tissue Engineering Approaches across the Germ Layers. *Pharmaceuticals, Policy and Law*, 13(11), 344. <https://doi.org/10.3390/PH13110344>

RABILLER, L. et al. **Driving regeneration, instead of healing, in adult mammals: the decisive role of resident macrophages through efferocytosis**. *NPJ Regenerative Medicine*, v. 6, n. 1, p. 41, 2021. DOI: doi.org/10.1038/s41536-021-00151-1

Raskovic B, Bozovic O, Prodanovic R, Niketic V, Polovic N. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. *J Biosci Bioeng.* 2014;**118**(6):622–627.

Reis, R. S., Vale, E.deM., Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2016). Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *Journal of proteomics*, 130, 170–179.

RWIK, SEN. (2021). Stem Cells Enhance Tissue Engineering in Head and Neck Surgery. *Journal of Head and Neck Surgery*. 3. DOI:10.36959/605/555

RICARD-BLUM S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>

ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. **Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories**. *Current Problems in Surgery*, v. 38, n. 2, p. 72-140, 2001. DOI: doi.org/10.1067/msg.2001.111167

SABERIAN, E., Jenča, A., Zafari, Y., Jenča, A., Petrášová, A., Zare-Zardini, H., & Jenčová, J. (2024). Scaffold Application for Bone Regeneration with Stem Cells in Dentistry: Literature Review. *Cells*, 13(12), 1065. <https://doi.org/10.3390/cells13121065>

SAFFARZADEH, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., Lohmeyer, J., & Preissner, K. T. (2012). Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PloS one*, 7(2), e32366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>

SHARMA, Shubham, Vineet Kumar Rai, Raj K. Narang, Tanmay S. Markandeywar, **Collagen-based formulations for wound healing: A literature review**, *Life Sciences*, Volume 290, 2022,120096, ISSN 0024-3205, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120096>

SEOL, Y. et al. **Bioprinting technology and its applications**. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2014. doi.org/10.1093/ejcts/ezu148

SORG H, Sorg CGG. Skin Wound Healing: Of Players, Patterns, and Processes. *Eur Surg Res*. 2023;64(2):141-157. doi: 10.1159/000528271. Epub 2022 Nov 23. PMID: 36417847.

SHAW, T. J.; MARTIN, P. **Wound repair at a glance**. *Journal of Cell Science*, v. 122, n. 18, p. 3209-3213, 2009. doi.org/10.1242/jcs.031187

STELLOS, K. et al. **Platelets in regeneration**. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 36, n. 2, p. 175-184, 2010. doi.org/10.1055/s-0030-1251502.

ULLAH, A. S. et al. **Utilizing fractals for modeling and 3D printing of porous structures**. *Fractal and Fractional*, v. 5, n. 2, p. 40, 2021. doi.org/10.3390/fractalfract5020040

XIN SHI, JING MAO, YAN LIU, **Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications**, *Stem Cells*

Translational Medicine, Volume 9, Issue 4, April 2020, Pages 445–464, <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0398>

XU et al. **Engineered artificial skins: Current construction strategies and applications.** *Engineered Regeneration*, 2023. doi.org/10.1016/j.engreg.2023.09.001

WANG, P.; LI, J.; WEI, Q. **Understanding the interplay between cell force and cell adhesion processes.** *Engineered Regeneration*, v. 4, n. 3, p. 277-288, 2023. doi.org/10.1016/j.engreg.2023.04.002

WETZLER, C., Kämpfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *The Journal of investigative dermatology*, 115(2), 245–253. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00029.x>

YANG, A. Z. et al. **Regeneration of the skin and peripheral nerves in the adult.** *Springer International Publishing*, p. 135-151, 2024. doi.org/10.1007/978-3-031-55715-6_8

YE, H. et al. **Advancements in engineered exosomes for wound repair: current research and future perspectives.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 11, 2023. doi.org/10.3389/fbioe.2023.1301362