



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido para  
avaliação no Edital 04/2022 (PIC/PIBIC/PIBIT)

**Título do projeto:** Estudo da incorporação de leite bovino em matriz de gelatina para indução do processo regenerativo em ulcerações da pele

**Palavras-chave do projeto:** biomateriais; colágeno; leite bovino; gelatina, engenharia de tecidos

**Área do conhecimento do projeto:** Biomateriais

São Bernardo do Campo

Julho de 2022

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	1
2. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	2
3. OBJETIVOS E METAS.....	6
4. METODOLOGIA.....	7
5. CRONOGRAMA DE TRABALHO E INFRAESTRUTURA.....	10
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11

## 1. RESUMO

Em alguns cenários adversos, a capacidade regenerativa intrínseca da pele é interrompida, acometendo a regeneração deste tecido. A interrupção eventual do processo de cicatrização da pele pode tornar o tecido lesionado uma ferida crônica, gerando cicatrizes anormais e dismorfia na aparência da pele, além de manter o paciente vulnerável à infecções por um período prolongado. As patologias que influenciam a origem de uma ferida crônica impactam, diretamente, a fase inflamatória do processo cicatrizante da pele, especialmente no amadurecimento do coágulo de fibrina, responsável pela secreção dos fatores de crescimento importantes para a estimulação da produção de colágeno natural. Alguns dos fatores mais importantes são: fator de crescimento transformador beta, TGF- $\beta$ , fator de crescimento epidérmico, EGF, fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF, e o fator de crescimento fibroblástico, FGF. Esses fatores podem ser encontrados em concentrações significativas em alguns alimentos, como o leite bovino. Devido ao comprometimento da produção natural do polímero, há uma busca contínua por biomateriais que auxiliem no processo regenerativo e na qualidade de vida dos pacientes acometidos. Sendo assim, este projeto visa estudar a proliferação celular da combinação do biopolímero de gelatina, Hemospon®, à base de colágeno hidrolisado, comumente utilizado na medicina, e leite bovino pasteurizado, a partir do preparo e da caracterização do biomaterial, além de realizar ensaio de degradação, caracterização por FTIR, análise de morfologia e migração celular, a fim de avaliar o potencial cicatrizante dessa membrana.

**Palavras-chave:** *Biomateriais; Colágeno; leite bovino; gelatina, Engenharia de tecidos; Úlceras do pé diabético.*

## 2. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

### 2.1 INTRODUÇÃO

Apesar da cicatrização da pele ser um processo inato do corpo humano, algumas ocasiões podem interromper o decurso cicatrizante e regenerativo, como traumas externos e patologias que acometem o paciente, em que estes induzem a origem de ferimentos crônicos. Podemos exemplificar através das lesões que ocorrem na região dos pés de pacientes diabéticos, conhecidas como úlceras, que se formam a partir de complicações no processo cicatrizante e se tornam crônicas quando atingem a camada subcutânea da pele. A qualidade de vida dos indivíduos acometidos por essa situação é substancialmente afetada, devido a tratamentos custosos, contínuos e que, muitas vezes, exigem a hospitalização, trazendo, por conseguinte, mais dificuldades associadas à saúde do paciente (HARDING et al., 2002; LEAL e CARVALHO, 2014; DEHKORDI et al., 2019).

Como alternativas clínicas aos tratamentos médicos, podemos utilizar técnicas baseadas na engenharia de tecidos, a qual é uma ótima alternativa para engenharia biomédica, que visa, a partir da biocompatibilidade e biofuncionalidade, regenerar os tecidos lesionados do paciente. Este ramo é uma ciência multidisciplinar que envolve conhecimentos de biologia, ciências da saúde e de engenharia e ciências de materiais, entre outras. No geral, a engenharia de tecidos é baseada em três grandes pilares: células recrutadas *in vivo* e cultivadas *in vitro*; *scaffold*, sendo este biomaterial utilizado para conduzir a formação tecidual; e fatores de crescimento, que fornecem as condições adequadas para a regeneração do tecido e a retomada de sua funcionalidade (IKADA, 2006).

### 2.2 CONTEXTUALIZAÇÃO

A nova abordagem contemporânea para o desenvolvimento racional de biomateriais tem reforçado uma tendência atual de produção, explorando materiais “inteligentes” tornado-os mais adequados para uso clínico. Neste contexto, pode-se

destacar os biomateriais aditivados destinados à regeneração tecidual, como proposto neste trabalho. Sabe-se que na natureza, existem diversos biomateriais que auxiliam no processo regenerativo da pele. O colágeno é uma das proteínas mais abundantes produzidas no organismo animal, por isso é mais comumente utilizado nos processos regenerativos, uma vez que apresenta alta biodisponibilidade, além de suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis. Especialmente em humanos, este representa um terço do total de proteínas e três quartos do peso absoluto da pele, sendo composto, predominantemente, pelos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, mas os aminoácidos lisina, hidroxilisina e alanina também podem estar presentes na configuração da molécula (SHOULDERS e RAINES, 2009; SILVA e PENNA, 2012; LEÓN-LÓPEZ et al., 2019).

Essa proteína pode ser considerada como um polímero natural, que, por definição, é o conjunto de múltiplas cadeias peptídicas. Essa afirmação é condizente, uma vez que o colágeno é definido pela característica estrutural de três fitas paralelas, das quais são polipeptídicas. Estas se organizam em uma conformação helicoidal, uma estrutura secundária conhecida como alfa-hélice, do tipo poliprolina II (PPII) (SHOULDERS e RAINES, 2009; SILVA E PENNA, 2012; LEÓN-LÓPEZ et al., 2019). A principal função deste polímero é contribuir para a integridade estrutural da MEC, mas também pode participar no processo de fixação das células na matriz. Ademais, esta proteína proporciona resistência e elasticidade ao órgão em questão (SHOULDERS e RAINES, 2009; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

Existem cerca de 28 colágenos no organismo humano, sendo o colágeno tipo I e o colágeno tipo III mais significativos para o órgão pele. De maneira geral, o colágeno tipo III é um dos principais componentes da MEC, possuindo uma importante função durante a cicatrização de ferimentos e regeneração do tecido da pele (LEÓN-LÓPEZ et al., 2019).

No organismo humano, quando há manifestação de lesões, a cicatrização é dividida em três grandes etapas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação. Assim que o ferimento é aberto, inicia-se a homeostase, processo que precede a fase inflamatória. Nele, ocorre a formação do coágulo de fibrina, que atua como um estabilizador do meio interno enquanto a matriz não é reconstruída, além de

agir como uma barreira protetora provisória contra a entrada de patógenos que podem causar infecções no organismo. Esse coágulo libera, juntamente com o tecido circundante a ferida, fatores de crescimento importantes para a regeneração do mesmo, como o fator de crescimento transformador beta, TGF- $\beta$ , fator de crescimento epidérmico, EGF, fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF, e o fator de crescimento fibroblástico, FGF (SZWED e SANTOS, 2015).

Os fatores de crescimento mais significativos para a regeneração da pele são o PDGF e o TGF- $\beta$ . O PDGF é sintetizado pelas plaquetas e pelos macrófagos que se encontram nos limites da ferida, sendo muito importante para a ativação e proliferação dos fibroblastos. Já o TGF- $\beta$  é secretado pelas plaquetas, macrófagos e células epidérmicas, que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a diferenciarem-se em miofibroblastos, que irão atuar na contração da ferida. Por mais, temos os fatores EGF e FGF, responsáveis, respectivamente, pela regeneração de células epidérmicas e migração e diferenciação de diversos tipos celulares (SZWED e SANTOS, 2015).

Como dito anteriormente, existem algumas situações adversas que interrompem o andamento natural da cicatrização da pele. No caso das úlceras, a formação do coágulo de fibrina é prejudicada, portanto, há uma deficiência nos fatores de crescimento, atingindo a produção natural de colágeno. Logo, encontra-se a necessidade de buscar colágeno e fatores de crescimento de maneiras alternativas.

As fontes naturais de colágeno (especialmente colágeno tipo I) se concentram em tecidos bovinos e suínos, como ósseo, conjuntivo e na composição de tendões e do pulmão. Essas duas fontes animais são as mais utilizadas no mercado devido à grande biocompatibilidade com o organismo humano, além da disponibilidade. Todavia, existem outras fontes para obtenção de colágeno, como tecidos de peixes e tecidos de ovíparos (LEÓN-LÓPEZ et al., 2019). Para o colágeno ser extraído de suas fontes naturais, é necessário que o polímero seja submetido a um pré-tratamento químico, ácido ou básico, sob aquecimento de 45°C, para desorganizar as sequências aminoácidos e romper as ligações não-covalentes da molécula, desnaturando a mesma. Assim, a estrutura de hélice tripla se separa em três filamentos de cadeias  $\alpha$ . Dessa maneira, quando essas cadeias estão desprendidas, ocorre a ação enzimática

(alcalase, papaína, pepsina e outras) sobre essa hidrólise em alterações de temperatura, resultando no colágeno hidrolisado (CH), também conhecido comercialmente como gelatina (PRESTES, 2012; LEÓN-LÓPEZ et al., 2019).

O CH possui maior capacidade antioxidante e maior atividade antimicrobiana, além de apresentar maior biodisponibilidade e ser um agente de gelificação interessante. Em diferença ao colágeno nativo, o CH é solúvel em água, sendo capaz de reter água em sua estrutura, e teor protéico elevado. Essas propriedades são intensificadas de acordo com o grau da desnaturação que a molécula foi submetida e ao tipo de tratamento escolhido para a extração desta de sua fonte natural. Sua utilização no mercado biomédico se dá devido às propriedades físico-químicas, que variam de acordo com o grau de desnaturação (PRESTES, 2012; LEÓN-LÓPEZ et al., 2019).

A gelatina é uma proteína obtida pela hidrólise de temperatura controlada, no intervalo 65-68°C, do colágeno. Por ser um CH, a gelatina é solúvel em água, apresentando maior hidrofilicidade que o colágeno natural, sendo mais proveitoso para o mercado biomédico. Essa proteína é um agente de gelificação importante para o mercado industrial, por formar géis reversíveis, que são conduzidos pelo frio e estabilizados por pontes de hidrogênio (PRESTES, 2012).

No mercado da medicina, encontramos diferentes e diversos bioprodutos derivados de gelatina, como o Hemospon®, da empresa Technew, que é uma esponja hemostática, muito utilizada para o controle do sangramento e estabilização do coágulo de fibrina em ferimentos abertos. A esponja de colágeno hidrolisado de origem porcina é comumente utilizada como *scaffold* na engenharia de tecidos, por ser altamente porosa e apresentar elevada permeabilidade e habilidade de absorção, além de ser reabsorvida pelo organismo em, no máximo, 15 dias (FARHAN, 2016; SOARES et al., 2019).

O leite bovino, por sua vez, é um alimento secretado pelas glândulas mamárias, sendo complexo por conter diferentes grupos alimentares, como carboidratos, proteínas, vitaminas, gorduras e minerais. Devido ao seu alto poder nutritivo, o leite é o único alimento que sana todas as necessidades nutricionais de recém-nascidos, além de estimular o metabolismo (SILVA, 2015). Além desses diversos grupos alimentares, o

leite é composto por substâncias muito pequenas, conhecidas como fatores de crescimento, sendo o transformador beta, TGF- $\beta$ , o mais abundante. Entretanto, os fatores de crescimento EGF, PDGF e FGF também estão presentes, mas em concentrações mais baixas, como podemos observar na tabela abaixo (GAUTHIER et al., 2006, SILVA, 2015):

**Tabela 1-** Concentração dos fatores de crescimento encontrados no leite bovino submetido à pasteurização.

Fatores de crescimento	Concentração ( $ng \cdot mL^{-1}$ )
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	2-155
Fator de crescimento beta (TGF- $\beta$ )	13-71
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	NA
Fator de crescimento do fibroblasto (FGF)	<1

\*NA: presente, mas não há dados suficientes para determinar a concentração.

Fonte: GAUTHIER et al., 2006; SILVA, 2015.

Em função de todas as informações apresentadas, é interessante realizar uma análise aproveitando a propriedade absorvente da esponja Hemospon® com os fatores de crescimento presentes no leite bovino, a fim de verificar a capacidade proliferativa e as propriedades regenerativas dessa combinação.

### 3. OBJETIVOS E METAS

Este projeto visa realizar uma revisão de literatura a respeito da cicatrização de úlceras do pé diabético, colágeno hidrolisado e fatores de crescimento presentes no leite bovino, a fim de entender como esses componentes podem auxiliar no processo regenerativo de feridas crônicas. Além disso, pretende-se desenvolver a metodologia mais adequada para obtenção do biopolímero aditivado e, realizar experimentos de proliferação celular e citotoxicidade a partir da combinação da esponja Hemospon® e



leite bovino pasteurizado, sendo parte de um projeto mais amplo realizado pelo grupo de pesquisa envolvido nessa proposição.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 *Revisão de Literatura***

A revisão de bibliografia será realizada abordando o tema deste projeto, sobre aplicações do colágeno hidrolisado e dos fatores de crescimento que podem auxiliar no processo regenerativo da pele. Serão consultadas as bases de dados: Scielo, Pubmed e Google Acadêmico, com a pesquisa a partir de palavras-chave pertinentes ao tema (em português e inglês com as devidas traduções), sendo: colágeno hidrolisado, fatores de crescimento, regeneração de úlceras e engenharia de tecidos da pele. Os artigos científicos serão selecionados com cautela, e analisados criticamente.

### **4.2 *Preparo e Caracterização do Biomaterial Aditivado***

Os materiais empregados neste estudo, são: leite bovino pasteurizado (disponibilizado comercialmente) e biomaterial à base de gelatina, comercializado sob a forma de esponja (Hemospon® - Technew).

Para definição da melhor concentração de fatores de crescimento provindos do leite para incorporação na matriz de gelatina serão testadas concentrações de leite bovino pasteurizado no intervalo de 0,01 a 0,6 mg/ml, em tampão PBS.

O processo de infiltração/absorção do leite em esponjas de gelatina será realizado a partir do método *dip infill* (infiltração por imersão). As amostras de gelatina serão mantidas por um período de 18 horas, imersas em leite pasteurizado, mantido a 37°C. Durante esta etapa será investigada a necessidade de emprego de pressão negativa para acelerar o processo de infiltração, sem comprometer a integridade da esponja de gelatina. Também serão monitorados durante este processo, o intumescimento da matriz, variações em sua microestrutura e o pH da solução.

Na sequência, os biomateriais agora aditivados, serão removidos cuidadosamente da solução e secos a temperatura ambiente. Em seguida serão realizadas as caracterizações descritas nos itens 3.2.1 a 3.2.3 (NOGUEIRA, 1999; GAUTHIER et al., 2006).

#### **4.3 Ensaio de Degradação**

Para análise da degradação *in vitro* amostras do biomaterial de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> serão secas em estufa a 37°C e pesadas utilizando balança analítica. O ensaio de degradação será realizado em solução tampão fosfato (pH 7.4) com temperatura controlada de a 37°C, durante 21 dias.

Nos períodos de 1,7, 14 e 21 dias amostras do biomaterial serão lavadas com água deionizada, para remoção dos sais da solução tampão, e secas em estufa a 37°C. Será realizada nova pesagem para quantificação da perda de massa através da Equação 1. Os testes serão realizados em triplicata.

$$(1) \quad \text{Perda de massa (\%)} = 100 ((M_i - M_f)) / M_i$$

A massa inicial ( $M_i$ ) corresponde à primeira pesagem e a massa final ( $M_f$ ) equivale a pesagem após o período de incubação (GONG et al., 2007).

#### **4.4 Análise estrutural por espectroscopia de infravermelho - FTIR**

Para avaliação das amostras de biomateriais será efetuada a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (NGUYEN et al., 2010). A medição será efetuada no espectrofotômetro Spectrum Two (PerkinElmer), com uma amostra de biomaterial de 0,5 cm<sup>2</sup>. A faixa de operação será de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com uma acumulação de 32 varreduras. Será realizada análise comparativa do biomaterial antes e após a infiltração com leite bovino.

#### **4.5 Análise Morfológica**

A análise da morfologia dos biomateriais será realizada com microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o ensaio, os substratos serão fixados com glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M, por um período de duas horas, seguido de lavagem em tampão fosfato 0,1M por uma hora. Posteriormente será realizada desidratação em série alcoólica, secagem em equipamento de ponto crítico e metalização com ouro (20 nm) para a observação ao microscópio eletrônico de varredura (JSM-6010LA, JEOL).

#### **4.6 Análise de Proliferação Celular**

Para as análises de proliferação celular serão utilizadas culturas de células tipo fibroblastos, células Vero. As células serão mantidas com meio HAM F10, 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. As culturas serão mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As células serão tripsinizadas com 70-80% da monocamada. Será feito o controle da viabilidade celular ao longo das culturas com o corante vital azul de tripan. O controle morfológico das células será realizado com microscópio invertido (Axiovert A1, Zeiss).

Para análise de proliferação celular sobre as amostras de colágeno hidrolisado será inoculada uma suspensão celular de 10.000 células/mL sobre amostras de colágeno, em placas de cultura de 12 poços. Após 2, 4 e 7 dias, será observada a morfologia das células cultivadas na presença do colágeno por microscopia de contraste de fase, utilizando microscópio invertido (Axiovert A1, Zeiss).

A monocamada celular será então fixada em glutaraldeído 0,25%, em tampão fosfato, e corada com azul de toluidina 0,05%, e observadas ao microscópio invertido (Axiovert A1, Zeiss).

As análises das imagens serão realizadas com o software Image J, permitindo analisar a distribuição celular.

#### 4.7 Migração Celular

Para observar a ação do biomaterial na migração celular será utilizada uma adaptação do protocolo proposto por Berti (2013). Será realizado o inóculo de 100.000 células/poço, em placas de cultura de 6 poços. As células serão cultivadas até a confluência da monocamada, sendo então realizada a remoção mecânica das células em metade do poço, com auxílio de raspador celular, para o posicionamento de amostra dos biomateriais na extremidade do poço mais distante da monocamada celular mantida íntegra. A migração celular em direção ao biomaterial será realizada no período de 3 dias, com microscopia de contraste de fase.

### 5. CRONOGRAMA DE TRABALHO E INFRAESTRUTURA

Para o desenvolvimento desse projeto está previsto o levantamento bibliográfico e leitura de artigos relevantes para o tema que auxiliem durante a prática laboratorial proposta (1ª. fase do projeto). Está planejado, também, a participação futura no Congresso de Iniciação Científica da UFABC de 2023, assim como a entrega dos relatórios parcial e final (última fase do projeto).

Segue tabela 2 com a descrição do cronograma de atividades para o período de 2022-2023.

**Tabela 2**– Cronograma de atividades proposto para desenvolvimento do projeto.

Atividade	Set - Dez 2022	Jan - Abr 2023	Mai - Ago 2023
Revisão bibliográfica	X	X	X
Obtenção do Biomaterial aditivado	X		
Ensaio de Degradação	X	X	
Análises por FTIR	X	X	

Relatório Parcial		X	
Análise Morfológica		X	
Proliferação Celular		X	X
Migração Celular		X	X
Relatório Final			X

Para execução do presente trabalho será utilizada a infraestrutura disponível dos laboratórios de pesquisa do grupo, alocados no bloco Ômega/SBC, além do suporte para a devida caracterização, fornecido pela Central Experimental Multiusuário do campus de SBC.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTI, G. O. Comparação da dinâmica da resposta celular utilizando dois diferentes biomateriais: Nanopartículas de hidroxiapatita e agregado trióxido mineral (MTA). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 73p. 2013.

DEHKORDI, N. A., *et al.* Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. **Stem Cell Res Ther**, v. 29, n. 10, p. 111, 2019.

FARHAN, L. S. Tissue engineering using collagen I matrix for treatment of oral mucosal defects: Experimental study in rabbit. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 6, n. 8, p. 77-81, 2016.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y.; MAUBOIS, J. L. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. **Le Lait**, v. 86, v. 2, p. 99-125, 2006.

GONG, Y.; ZHOU, Q.; GAO, C., *et al.* In vitro and in vivo degradability and cytocompatibility of poly(l-lactic acid) scaffold fabricated by a gelatin particle leaching method. **Acta Biomater**, v. 3, n. 4, p. 531-540, 2007.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Clinical review healing chronic wounds. **Br Med J**, v. 324, p. 160-163, 2002.

IKADA, Y. Challenges in Tissue Engineering. **J. R. Soc. Interface**, v. 3, p. 589-601, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - Texto e Atlas. São Paulo: Grupo GEN, 2017.

LEAL, E. C.; CARVALHO, E. Cicatrização de feridas: o fisiológico e o patológico. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 9, n. 3, p. 133-143, 2014.

LEÓN-LOPEZ, A; *et al.* Hydrolyzed Collagen-Sources and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4031, 2019.

NGUYEN, T. H.; LEE B. T. Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers **J. Biomedical Science and Engineering**, v. 3, p. 1117-1124; 2010.

NOGUEIRA, D. A. R. Adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. 1999.

PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **UNOPAR Cient Ciências Biológicas da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 65-74, 2012.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 929-958, 2009.

SILVA, F. L. Efeito do processamento na concentração do fator de crescimento TGF beta em lácteos. Dissertação do programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa. 2015.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SOARES, I.; FERNANDES, G.; CAVALCANTE, L. C.; LEITE, Y., *et al.* The influence of Aloe vera with mesenchymal stem cells from dental pulp on bone regeneration: characterization and treatment of non-critical defects of the tibia in rats. **Journal of applied oral science**, v. 27, 2018.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização da pele. **Caderno da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, p. 7-17, 2015.