CARLA MARIA FIGUEIREDO DE CARVALHO MIRANDA

**AVALIAÇÃO DE MATRIZES DESCELULARIZADAS PARA
REGENERAÇÃO MUSCULAR**

São Paulo

2018

CARLA MARIA FIGUEIREDO DE CARVALHO MIRANDA

**AVALIAÇÃO DE MATRIZES DESCELULARIZADAS PARA
REGENERAÇÃO MUSCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof. Dr^a. Sonja Ellen Lobo

Co-orientadora:

Prof. Dr^a. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3611
FMVZ

Miranda, Carla Maria Figueiredo de Carvalho
Avaliação de matrizes descelularizadas para regeneração muscular / Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda. – 2018.
132 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Sonja Ellen Lobo.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Descelularização. 2. Biomaterial. 3. Músculo esquelético. 4. Placenta. 5. Biocompatibilidade. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de matriz decelularizada de placenta canina para regeneração muscular", protocolada sob o CEUA nº 9553300114, sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda; Sonja Ellen Lobo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/09/2016.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 128 Heterogenics rats (128 males), protocol number CEUA 9553300114, under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda; Sonja Ellen Lobo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/01/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2014](#) a [03/2018](#) Área: [Cirurgia](#)

Origem:

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [a](#)

N: [128](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [a](#)

Resumo: A medicina regenerativa é indicada para remodelar tecidos e órgãos (128 ratos). O tecido muscular esquelético possui capacidade limitada de autoregeneração após sofrer lesões em que compromete mais de 20%

do tamanho do músculo. Entretanto, uma estratégia de reparação do organismo é substituir esta área lesionada com tecido cicatricial, porém sem a reconstrução estrutural e funcional do músculo normal.

Local do experimento:

São Paulo, 06 de setembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 15 de março de 2017

CEUA N 9553300114

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Sonja Ellen Lobo

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Sonja Ellen Lobo (orientador)

Título da proposta: "Avaliação de matrizes descelularizadas para regeneração muscular".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 20/fevereiro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto intitulado "Avaliação de matriz descelularizada de placenta canina para regeneração muscular", já aprovado pelo referido CEUA, propõe avaliar o efeito do uso de matrizes descelularizadas oriundas de placenta canina e músculo murino em modelos de injúria muscular. No entanto, como são utilizados dois diferentes tipos de tecido para comparar o efeito regenerativo após lesão muscular, o título mais correto seria " Avaliação de matrizes descelularizadas para regeneração muscular".".

Comentário da CEUA: "Foi solicitada alteração do título do projeto para melhorar expressar o que está sendo estudado.".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

butantan

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DE MATRIZES DESCELULARIZADAS PARA REGENERAÇÃO MUSCULAR", protocolado sob o CEUA nº 2989051015, sob a responsabilidade de **Durvanei Augusto Maria** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) em reunião de 27/04/2016.

We certify that the proposal "EVALUATION OF DECELLULARIZED MATRIX FOR MUSCLE REGENERATION", utilizing 130 Heterogenic rats (130 males), protocol number CEUA 2989051015, under the responsibility of **Durvanei Augusto Maria** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 04/27/2016.

Vigência da Proposta: de 11/2015 a 11/2017

Área: Bioquímica E Biofísica

Procedência: Biotério Central

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 7 a 9 semanas

N: 130

Linhagem: Wistar

Peso: 350 a 500 g

Resumo: A medicina regenerativa é indicada para restabelecer a remodelação de tecidos e órgãos que sofreram injúrias com consequente fibrose e perda funcional, a exemplo de lesões no sistema musculoesquelético. Assim, a utilização de biomateriais (scaffolds/scaffolds) tem permitido mimetizar a matriz extracelular (ECM), promovendo remodelação tecidual. A placenta representa uma rica fonte de ECM, além de fácil obtenção por ser material de descarte. Objetivou-se estabelecer um protocolo de decelularização da placenta canina e investigar o potencial da ECM como um scaffold bioativo para a regeneração muscular. A análise da composição da placenta será realizada mediante caracterização histológica e imunohistoquímica. Após a decelularização, será avaliada a estrutura tridimensional da matriz (microscopia eletrônica de varredura) e a eficiência do processo em remover as células do scaffold (teste de Pico-Green), mantendo-se a bioatividade (mediante avaliação da diferenciação miogênica de células-tronco cultivadas nas matrizes decelularizadas).

São Paulo, 29 de abril de 2016

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MIRANDA, CARLA MARIA FIGUEIREDO DE CARVALHO

Título: **Avaliação de Matrizes Descelularizadas para Regeneração Muscular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, sempre! Pelo cuidado e pela incondicional dedicação, amor e esforço que fizeram para que eu recebesse uma educação digna. Nada disso seria possível sem o apoio desta família maravilhosa. Vocês são o meu verdadeiro porto seguro. Amo todos vocês, de coração!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai Todo-poderoso por sempre ter estado ao meu lado e pela oportunidade que Ele me deu de estar aqui, hoje, concluindo mais uma etapa de minha vida. Etapa árdua, mas que com muita perseverança eu consegui chegar até o final. Agradeço eternamente a **Virgem Maria** pela Sua proteção e intercessão perante a Deus. *“Eu sei que é difícil esperar, mas Deus tem um tempo para agir e para curar. Só é preciso confiar!!”*.

Aos meus tios Nonato, Pedrinho, Ismael, Manoel e Zeca e, especialmente; **às minhas maravilhosas tias** Marta, Teca, Marcelina, Mônica e Cristina; **aos meus primos**, David, Denzel, Mateus, Renata e Anderson; **aos meus queridos avós** Maria Leontina, Erothildes (*in memoriam*), Carvalho (*in memoriam*), e Raimundo Pedro (*in memoriam*): agradeço imensamente a família FIGUEIREDO pelo apoio, força, confiança e esperança no meu sucesso profissional. Essa caminhada não teria sido possível sem vocês, pois vocês são o meu alicerce!

À minha mãe, Joana D’arc, **à minha irmã**, Socorro, e **ao meu pai**, Luis Carlos, pelo apoio, amor, carinho e dedicação durante toda a minha trajetória na universidade. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e longe de casa. Sou eternamente grata! Agora sabemos que todo o esforço valeu, e sempre, valerá à pena!

Ao Moysés Miranda, não poderia deixar de agradecer pela paciente compreensão com esta jornada de doutorado. Agradeço sinceramente por todo o convívio nestes 13 anos e por tudo o que vida nos propôs a ensinar durante essa trajetória. Gratidão eterna também aos seus pais Zuíla (*in memoriam*) e Brás (*in memoriam*), e irmãos, Rosa e Marcelo, por terem me recebido na família com muito carinho e estendido a mão quando precisei.

À professora Maria Angélica Miglino, pela sua dedicação como professora e por acreditar e confiar no meu trabalho. Agradeço pelas oportunidades que me foram concedidas em aprimorar meus conhecimentos e à minha formação, os quais foram muito valiosos para a minha carreira profissional.

À Dra Sonja Ellen Lobo, pela sua dedicação na orientação deste trabalho e por todo o ensinamento repassado durante estes 4 anos. Obrigada pela confiança em meu trabalho.

Aos técnicos Rose Eli (Laboratório de Microscopia) e Ronaldo Agostinho (Laboratório de Histologia), agradeço por toda a ajuda no laboratório durante a execução deste trabalho.

A Paula Fratini pela sua sempre solicitude e ao **Rodrigo Barreto**, agradeço a colaboração nas análises deste trabalho e, principalmente, pela sua sempre boa disponibilidade em ajudar e ensinar.

Aos colegas de pós-graduação, Lara Mario, Jéssica Borghesi, Adriana Anunciação, Natal (Fransceliusa Delys), Marcão (Marcos Vinícius), Raony Paiva, Ana Carolina Martins, Dailiany Orechio, Miguel Lobo, M.A. (Maria Angélica Arroyo), obrigada pela amizade e os bons momentos vividos durante estes 4 anos! E aos novos colegas: Luciana Simões, Luciana (Peru), Ana Clara, Fábio Abdala, Daniel, Marisol, obrigada pelo bom convívio neste final de doutorado! E, especialmente, ao Márcio Pereira, obrigada pela amizade e, também, pela sua solicitude em me ajudar com os animais.

Aos amigos, em especial, Daiana Lima, Bruna Andrade, Maryanne Ogasawara, Karoline Rochelle e Anaelise Turquetti, agradeço pelo carinho e amizade durante esta última etapa do doutorado. A amizade sempre minimiza a saudade da distância da família e de casa!

Ao Luciano César Pereira Campos Leonel, dizer um simples obrigado seria muito pouco frente a todo o companheirismo profissional e pessoal pelo qual passamos ao longo destes 4 anos, sempre me dando a mão nos momentos em que precisei! Este trabalho também não teria sido possível sem a sua colaboração e sua franca amizade! Muito obrigada por tudo, meu amigo!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro ao projeto.

“Mas a gente vai à luta e inventa um novo sonho, uma esperança, mesmo recauchutada: vale tudo, MENOS CHORAR TEMPO DEMAIS. Pois sempre há coisas boas para pensar. Algumas se realizam.”

Lya Luft

RESUMO

MIRANDA, C.M.F.C. **Titulo em português:** Avaliação de Matrizes Descelularizadas para Regeneração Muscular. [Título em inglês: Evaluation of Decellularized Matrices for Muscle Regeneration]. 2018. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Matrizes extracelulares descelularizadas (dMEC) têm sido utilizadas com sucesso como biomateriais biológicos para regeneração tecidual, já que apresentam vantagens como semelhança estrutural com os tecidos naturais, biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de sinalização e homeostase tecidual. O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de quatro protocolos para descelularização de músculo esquelético murino, objetivando a produção de matrizes extracelulares (MEC) acelulares para potenciais aplicações na engenharia de tecidos. Músculos tibiais foram coletados e congelados a -20°C ou armazenados a temperatura ambiente, seguido por descelularização em soluções contendo reagentes químicos EDTA + Tris, SDS e Triton X-100, os quais foram aplicados em diferentes sequências e analisados de acordo com modificações macroscópicas causadas nos tecidos, remoção de conteúdo celular e genético das matrizes e na capacidade de preservar a composição protéica e estrutura tridimensional da MEC. Observou-se a otimização da remoção de conteúdo celular, além da preservação da ultraestrutura e composição da MEC nos protocolos com congelação prévia a -20°C e descelularização inicial com a solução SDS, quando comparado àqueles que iniciaram com EDTA + Tris. O segundo objetivo deste trabalho foi comparar a biocompatibilidade da dMEC de músculo murino e placenta canina em modelo murino de injúria muscular. As dMEC foram produzidas a partir da placenta canina (1% SDS, 5 mM EDTA + 0,05% Tripsina, 1% Triton X-100) e do músculo esquelético tibial de ratos *Wistar* (Congelação a -20°C, 1% SDS, 5 mM EDTA + 50mM Tris, 1% Triton X-100). A lesão muscular foi realizada a partir de uma incisão de 1cm e divulsão na região média do músculo tibial; então, as dMEC foram implantadas. Um grupo cirúrgico, sem o implante, foi usado como um controle. Os animais foram eutanasiados depois de 3, 15 e 45 dias. Análise histológica e imunohistoquímica foram realizadas para avaliar a morfologia tecidual e a presença de infiltrado

inflamatório e células em proliferação (CD163 e PCNA). No 3º dia após a implantação, uma intensa reação inflamatória (CD163⁺) e proliferação celular (PCNA⁺) foram observadas, adjacentes ao biomaterial, em ambas as matrizes. No 15º dia, o biomaterial de MEC placentária ainda preservou o infiltrado celular (CD163⁺ e PCNA⁺) e iniciou o processo de absorção do biomaterial, enquanto que a dMEC do músculo já estava completamente absorvida. Finalmente, depois dos 45 dias, ambos os biomateriais foram absorvidos e o músculo estava completamente cicatrizado, sem fibrose. Conclui-se que congelar as amostras a -20°C anteriormente ao processamento e submeter à incubação inicial em solução de 1% SDS (Protocolo 2B) favoreceu a descelularização de músculo esquelético murino. Além disso, dMEC xenogênicas e alogênicas foram reabsorvidas e apresentaram processos de integração distintos em modelo não-crítico de lesão muscular esquelética, sugerindo que eventuais alterações sistêmicas, observadas a longo prazo, sejam avaliadas, bem como, a validação da utilização destas matrizes em modelos de perda muscular volumétrica.

Palavras-chave: Descelularização, biomaterial, músculo esquelético, placenta, biocompatibilidade.

ABSTRACT

MIRANDA, C.M.F.C. **Título em inglês:** Evaluation of Decellularized Matrices for Muscle Regeneration. [título em português: Avaliação de Matrizes Descelularizadas para Regeneração Muscular]. 2018. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Decellularized extracellular matrices (dECM) have been successfully used as biological biomaterials for tissue engineering, since they present advantages such as structural similarity with natural tissues, biocompatibility, biodegradability, signaling capacity and tissue homeostasis. The first aim of this study was to evaluate the efficacy of four protocols for the decellularization of murine skeletal muscle for the production of acellular extracellular matrices (ECM) for potential applications in tissue engineering. Tibial muscle was frozen at -20°C or stored at room temperature, followed by decellularization in solutions containing EDTA + Tris, SDS and Triton X-100 chemical reagents, which were applied in different sequences and analyzed according to macroscopic modifications, removal of cellular and genetic content and the ability to preserve the ECM composition and three-dimensional structure. Thus, the optimization of cellular removal was observed, as well as the preservation of the ECM ultrastructure and composition in the protocols with freezing at -20°C and initial decellularization with the SDS solution, when compared to those starting with EDTA + Tris. The second aim of this study was to compare the biocompatibility of the dECM of murine muscle and canine placenta in murine model of muscle injury. Decellularized ECM were produced from the canine placenta (1% SDS, 5 mM EDTA + 0.05% Trypsin, 1% Triton X-100) and the tibial muscle of Wistar rats (freezing at -20°C, 1% SDS, 5 mM EDTA + 50 mM Tris, 1% Triton X-100). The muscle injury was performed followed a 1 cm incision and divulsion in the middle region of the tibial muscle, where the dECM were implanted. A surgical group, without the implant, was used as a control. The animals were euthanized after 3, 15 and 45 days. Histological and immunohistochemistry analyses were performed to evaluate the tissue morphology and the presence of inflammatory infiltrate and cells in proliferation (CD163 and PCNA). On the 3rd day after implantation, an intense inflammatory reaction (CD163+) and cell proliferation (PCNA+) were observed, adjacent to the

biomaterial, in both matrices. On 15th day, the placenta biomaterial still preserved the cellular infiltrate (CD163+ and PCNA+) and started the biomaterial absorption process, while the muscle biomaterial was already fully absorbed. Finally, after 45th day, both biomaterials were absorbed and the muscle was completely healed, without fibrosis. It was concluded that freezing samples at -20°C prior to processing and subjecting to the initial incubation in 1% SDS solution (Protocol 2B) favored the decellularization of murine skeletal muscle. In addition, xenogeneic and allogeneic dECM were resorbed and presented a distinct integration process in a non-critical model of skeletal muscle, suggesting that potential systemic changes, observed in the long term evaluation, as well as the validation of the use of these matrices in volumetric muscle loss models must be tested.

Keywords: Decellularization, biomaterial, skeletal muscle, placenta, biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição da matriz extracelular (MEC).....	31
Figura 2: Matriz extracelular de placentas humana, bovina e canine descelularizadas.....	34
Figura 3: Técnicas utilizadas para descелularização de órgãos e tecidos	38
Figura 4: Interação do biomaterial com o hospedeiro.....	40
Figura 5: Músculo esquelético tibial cranial de ratos <i>Wistar</i>	54
Figura 6: Fotomicroscopia de músculo esquelético tibial cranial de ratos <i>Wistar</i> antes e após a descелularização.....	55
Figura 7: Quantificação de DNA remanescente em amostras descелularizadas de músculo esquelético de ratos <i>Wistar</i>	57
Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura do músculo esquelético de ratos <i>Wistar</i>	59
Figura 9: Imunofluorescência de proteínas de matriz extracelular de músculo esquelético de ratos <i>Wistar</i>	60
Figura 10: Plano de estudo esquemático.....	72
Figura 11: Indução de lesão muscular em músculo tibial cranial de ratos <i>Wistar</i>	80

Figura 12: Descelularização de tecido músculo esquelético e placentário.....	85
Figura 13: Indução de lesão muscular em modelo murino.....	88
Figura 14: Biocompatibilidade <i>in vivo</i> em modelo murino de lesão muscular: implantação de biomaterial acelular de músculo esquelético murino (transplante alogênico).....	90
Figura 15: Biocompatibilidade <i>in vivo</i> em modelo murino de lesão muscular: implantação de biomaterial acelular de placenta canina (transplante xenogênico).....	92
Figura 16: Imunohistoquímica para CD163 em músculo esquelético de modelo murino de lesão muscular.....	94
Figura 17: Gráfico da quantificação da imunohistoquímica para o anticorpo CD163 em amostras de músculo que receberam ou não a implantação de matrizes extracelulares descelularizadas.....	97
Figura 18: Imunohistoquímica para PCNA em músculo esquelético de modelo murino de lesão muscular.....	99
Figura 19: Gráfico da quantificação da imunohistoquímica para o anticorpo PCNA em amostras de músculo que receberam ou não a implantação de matrizes extracelulares descelularizadas.....	101
Figura 20: Cultivo <i>in vitro</i> de células de músculo de aorta de ratos em biomateriais descelularizados.....	131
Figura 21: Cultivo <i>in vitro</i> de células de músculo esquelético de ratos em biomateriais descelularizados.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos quatro protocolos testados para descelularização de músculo esquelético de rato *Wistar*.....48

Tabela 2: Grupos experimentais do teste in vivo (implantação de matrizes descelularizadas de músculo esquelético murino e placenta canina em modelo murino).....79

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	22
HIPÓTESES	26
OBJETIVOS	27
<i>Objetivo Geral</i>	27
<i>Objetivos Específicos</i>	27
CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA	28
RESUMO	29
1. PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	30
1.1. COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	30
1.1.1 Matriz Extracelular do Músculo Esquelético	32
1.1.2 Matriz Extracelular da Placenta	33
1.2 DESCELULARIZAÇÃO DE TECIDOS	35
2. INTERAÇÃO BIOMATERIAL/HOSPEDEIRO: REMODELAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR	38
2.1 MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE	39
2.2 DEGRADAÇÃO DO BIOMATERIAL	41
2.3 RECRUTAMENTO CELULAR	42
CAPÍTULO 3: DESCELULARIZAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO	43
RESUMO	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. ANIMAIS E AMOSTRAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO	47
2.2. DESCELULARIZAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO MURINO	47
2.2.1. Análise Histológica	49
2.2.2. Quantificação de DNA	50
2.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
2.2.4. Imunofluorescência	51
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
3. RESULTADOS	53

3.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	53
3.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	54
3.3. QUANTIFICAÇÃO DE DNA	56
3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	57
3.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA	58
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE MATRIZES ACELULARES IMPLANTADAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS MURINOS.....	68
RESUMO.....	69
1.INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1. ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS TECIDOS.....	73
2.2. DESCELULARIZAÇÃO DOS TECIDOS	74
2.2.1. Descelularização do Músculo Esquelético Murino.....	74
2.2.2. Descelularização da Placenta Canina.....	75
2.2.3. Análise Macroscópica.....	76
2.2.4. Análise Histológica	76
2.2.5. Marcação Nuclear com 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).....	77
2.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77
2.3. IMPLANTAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS MATRIZES DESCELULARIZADAS	78
2.3.1. Grupos Experimentais e Procedimento Cirúrgico	78
2.3.2. Análise Histológica	81
2.3.3. Análise Imunohistoquímica.....	81
2.3.4. Análise Estatística.....	83
3. RESULTADOS.....	83
3.1. DESCELULARIZAÇÃO DOS TECIDOS	83
3.1.1. Descelularização do Músculo Esquelético Murino.....	83
3.1.2. Descelularização da Placenta Canina.....	84
3.2. IMPLANTAÇÃO <i>IN VIVO</i> DAS MATRIZES DESCELULARIZADAS	86
3.2.1. Grupo Controle e Grupo Sham	86
3.2.2. Grupo Músculo	89

3.2.3. Grupo Placenta.....	91
3.2.4. Análise Imunohistoquímica.....	93
4. DISCUSSÃO	102
5. CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS.....	107
 CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVA.....	 111
 REFERÊNCIAS.....	 113
APÊNDICE.....	120

Capítulo 1: Introdução

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma área científica promissora e multidisciplinar, indicada em condições onde o tecido ou órgão sofre alguma injúria com consequente perda da função, da regeneração espontânea e dos mecanismos compensatórios; assim, a partir dos conhecimentos referentes à histologia, biologia e bioquímica celular, a medicina regenerativa utiliza biomateriais, associados ou não a células, além de moléculas bioativas (fatores de crescimento, por exemplo), mimetizando as características (rigidez, elasticidade e adesão) da matriz extracelular (MEC) (RIZZI et al., 2012).

Na regeneração muscular, os biomateriais representam um microambiente tridimensional (3D) favorável ao suporte, propagação e expansão inicial de células progenitoras musculares *in vitro* e, também, em implantes *in vivo*, facilitando as interações célula-célula e célula-matriz do tecido hospedeiro, regulando a sinalização física e biológica para a adesão, migração, proliferação, diferenciação, comportamento celular e regeneração tecidual (LI; CUI, 2014; SICARI; DEARTH; BADYLAK, 2014).

Existem diversos tipos de biomateriais utilizados na medicina regenerativa, como os biomateriais naturais (biológicos), os quais podem ser derivados de fonte autóloga, alogênica ou xenogênica, e biomateriais sintéticos ou uma mistura dos dois tipos, chamados de biomateriais híbridos (NAAHIDI et al., 2017). Os biomateriais devem apresentar, como característica, histocompatibilidade, bioatividade, mínima citotoxicidade e ser reabsorvível por processo de biodegradação, restabelecendo o nicho, permitindo a adesão, sobrevivência e diferenciação celular e exercendo influências mecânicas e biológicas no tecido (JONG et al., 2014; PERNICONI et al., 2014).

Alguns exemplos de biomateriais naturais são aqueles derivados de matriz extracelular (MEC) produzidos por meio da técnica de descelularização, a qual promove a remoção de todo conteúdo celular e nuclear do tecido, preservando a composição e ultraestrutura da MEC (BADYLAK, 2007). A MEC é uma estrutura organizada de forma tridimensional (3D), secretada pelas células residentes de cada tecido e órgão, sendo composta por proteínas (colágeno I, III, IV, V, VI, dentre

outros), glicoproteínas (fibronectina e laminina), proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs), as quais são responsáveis pelo equilíbrio dinâmico do microambiente intersticial específico do tecido, sinalização intracelular, migração, proliferação, diferenciação, bioatividade (função e estrutura) da matriz e interações entre células adjacentes e entre células-matriz (WOLF et al., 2014).

MECs acelulares em geral podem ser consideradas biomateriais ideais devido à semelhança estrutural e mecânica com os tecidos naturais, tornando-as uma estratégia promissora para a produção de materiais biocompatíveis e com propriedades físicas, biológicas e regenerativas (JONG et al., 2014) e, diferentemente dos biomateriais sintéticos, apresentam a capacidade de formar complexos com carboidratos, gerando moléculas como proteoglicanos, ligando-se a fatores tróficos que induzem a migração, proliferação e diferenciação celular (GRASMAN et al., 2015).

Assim, diversas MEC descelularizadas têm sido desenvolvidas para reestruturar tecidos e órgãos, tais como cartilagem, pele, osso, bexiga, vasos sanguíneos, rim, coração, fígado, pulmão, músculo esquelético e placenta (SONG; OTT, 2011), em variadas adversidades clínicas, como em reparação de hérnia (HOPE et al., 2012), úlceras diabéticas (LULLOVE, 2012), reconstrução mamária (MOFID; MEININGER; LACEY, 2012), dentre outras.

Biomateriais biológicos acelulares favorecem a remodelação tecidual, que consiste na degradação dos componentes da matriz e produção de novas moléculas bioativas (peptídeos) pelas células constituintes dos tecidos, sendo este processo mediado por enzimas proteolíticas (metaloproteinases - MMPs) (ROSSI; POZZOBON; COPPI, 2010). Estes peptídeos apresentam atividade quimiotática para células tronco/ progenitoras *in vitro* e induzem o recrutamento *in vivo* de células progenitoras do hospedeiro (BADYLAK, 2004; TURNER et al., 2010).

Na reparação muscular, o uso de matrizes descelularizadas apresenta muitas vantagens devido ao microambiente formado em resposta a uma injúria tecidual, promovendo ativação, recrutamento e diferenciação de células tronco e/ou progenitoras musculares, minimizando a resposta inflamatória, influenciada por fatores intrínsecos do microambiente da MEC natural (SICARI; DEARTH; BADYLAK, 2014).

Desta forma, biomateriais naturais oriundos de MEC descelularizada representam uma abordagem terapêutica promissora para a bioengenharia de

tecidos, especialmente, no tratamento do músculo em casos de perda muscular volumétrica (*volumetric muscle loss- VML*), devido ser constituído de MEC nativa, possuindo as mesmas características mecânicas do tecido. Além disso, pode ser um veículo para a implantação de células tronco ou até mesmo permitir a migração, proliferação e diferenciação de células progenitoras endógenas responsáveis pela miogênese, o que pode ser influenciado pela conservação dos fatores de crescimento e da estrutura vascular após a descelularização, favorecendo a neoangiogênese após implantação *in vivo* (MERTENS et al., 2014).

A matriz acelular da placenta tem sido muito estudada para a produção de biomateriais bioativos, devido à rica composição da matriz e pela capacidade de suprimir a imunidade celular, representando uma nova fonte de obtenção de biomateriais para a bioengenharia de tecidos (CHOI et al., 2013); além disso, a placenta é de fácil obtenção, haja visto que é um órgão normalmente descartado após o parto. Assim, sua estrutura 3D fornece força mecânica suficiente para suportar o crescimento e desenvolvimento de novos tecidos, permitindo, assim, o remodelamento e regeneração de tecidos lesados e sua possível degradação no próprio corpo do hospedeiro (FLYNN, SEMPLE, WOODHOUSE; 2006).

No entanto, não há relatos clínicos quanto ao uso de matriz acelular placentária com o intuito de regenerar músculo esquelético, tornando-se interessante, então, a implantação de MEC acelular de placenta em lesão muscular, comparando, assim, com biomateriais acelulares do próprio músculo.

HIPÓTESES

1. A primeira hipótese sugere que diferentes protocolos de descelularização atuam distintamente sobre o músculo esquelético, levando à obtenção de matrizes extracelulares descelularizadas (dMEC) com diferentes características físico-químicas e propriedades biológicas.

2. A segunda hipótese sugere que as dMECs de músculo murino e placenta canina podem ser utilizadas como biomaterial bioativo em modelos de injúria muscular, sendo a matriz placentária tão eficiente quanto a de músculo.

HIPÓTESES NULAS

1. Diferentes protocolos de descelularização não afetam as características físico-químico-biológicas da MEC do músculo esquelético.

2. Matriz placentária acelular não apresenta biocompatibilidade para ser implantada em músculo esquelético.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de descelularização de músculo esquelético murino e comparar a biocompatibilidade de matrizes placentárias xenogênicas e musculares alogênicas em modelo murino de injúria muscular.

Objetivo Específicos

1. Estabelecer um protocolo eficaz de descelularização de músculo murino,
2. Analisar a composição e estrutura da MEC de placenta canina e músculo murino,
3. Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* dos implantes de matrizes decelularizadas da placenta canina e músculo murino para regeneração muscular *in vivo*,
4. Avaliar a resposta inflamatória e integração do implante no tecido hospedeiro.

Capítulo 2: Revisão de Literatura

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA- PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) E INTERAÇÃO BIOMATERIAL/HOSPEDEIRO

RESUMO

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura tridimensional, composta por diversas moléculas, como colágeno, laminina, fibronectina, responsáveis pelo equilíbrio dinâmico do microambiente intersticial específico do tecido, sinalização intracelular, migração, proliferação, diferenciação, bioatividade (função e estrutura) da matriz e interações entre células adjacentes e entre células-matriz. Matrizes extracelulares descelularizadas (dMEC) têm sido obtidas a partir da técnica de descelularização, o qual remove o conteúdo celular e genético do tecido, preservando a composição e ultraestrutura da matriz; assim, as dMEC têm sido muito utilizadas na engenharia do tecido muscular esquelético. Após a implantação do biomaterial, ocorre indução da resposta imune pelo hospedeiro com intensa infiltração neutrofílica, culminando na liberação de mediadores inflamatórios, os quais recrutarão os macrófagos; estes, por sua vez, são indispensáveis para o processo de degradação dos produtos da MEC e do processo de remodelação tecidual. Durante a degradação da matriz, ocorre intensa infiltração celular (macrófagos) e ação de enzimas proteases, permitindo a liberação de fatores de crescimento e peptídeos matricrípticos, que irão desencadear diversas atividades celulares, tais como angiogênese, viabilidade, migração e diferenciação de diversos tipos celulares, como células-tronco/progenitoras musculares e células perivasculares.

Palavras-chave: matriz extracelular (MEC), biomaterial, implantação, descelularização, degradação, remodelação, macrófagos, resposta imune

1. PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

1.1. COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura tridimensional, secretada pelas células residentes de cada tecido e órgão, sendo composta por diversas moléculas, as quais são responsáveis pelo equilíbrio dinâmico do microambiente intersticial específico do tecido, sinalização intracelular, migração, proliferação, diferenciação, bioatividade (função e estrutura) da matriz e interações entre células adjacentes e entre células-matriz (BADYLAK, 2007).

Os principais constituintes da matriz são moléculas altamente conservadas entre as diversas espécies, possibilitando o uso de biomateriais derivados de MEC xenóloga em aplicações clínicas (LONDONO; BADYLAK, 2015). As principais moléculas são: *a) colágeno*, que representa o maior constituinte da MEC, em torno de 85% do peso seco da MEC, sendo o colágeno tipo I a principal proteína, fornecendo a capacidade de resistência, suporte para as células e carga da maioria dos tecidos; *b) laminina*, que compõe a membrana basal, permitindo o suporte para as células e na interação célula-matriz; *c) fibronectina*, que representa a segunda maior proteína constituinte da MEC, sendo importante para a adesão celular; *d) glicosaminoglicanos (GAGs)*, que ligam-se a fatores de crescimento, fornecendo carga mecânica dentro do tecido, i.e. ácido hialurônico; *e) fatores de crescimento*, ativam mecanismos celulares que modulam a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (COSTA et al., 2017) (Figura 1).

Recentemente, têm sido descritas as proteínas matricelulares, tais como periostina, tenascina-X e tenascina-C, que são fragmentos de proteínas dentro da MEC formadas a partir do processo de degradação da matriz, sendo, então, expostas, ativadas e liberadas para o ambiente somente em situações necessárias, i.e. em casos de injúria, modulando as funções celulares, tais como adesão celular, migração, proliferação, diferenciação e apoptose (MORRIS; KYRIAKIDES, 2014).

A composição e estrutura da MEC são fundamentais para a interação do biomaterial ao hospedeiro, bem como a distribuição e organização 3D das moléculas

constituintes, sendo uma característica tecido-específica e responsável pelas propriedades mecânicas, funcionais e estruturais (LONDONO; BADYLAK, 2015). A partir da preservação da arquitetura da MEC nativa, possibilita-se que as células endógenas do hospedeiro penetrem no biomaterial xenogênico, reconhecendo-o como parte do próprio hospedeiro, evitando, assim, a identificação como corpo estranho e formação de fibrose (WONG et al., 2016).

Figura 1: Composição da matriz extracelular (MEC)

Fonte: LONDONO; BADYLAK, 2015

Legenda: A MEC é composta por moléculas, como colágeno, laminina, fibronectina e glicosaminoglicanos, responsáveis pela homeostase tecido-específica, sinalização intracelular, migração, proliferação, diferenciação, bioatividade e interações entre células adjacentes e entre células-matriz.

1.1.1. Matriz Extracelular do Músculo Esquelético

Um dos principais constituintes protéicos do tecido conectivo do músculo esquelético (epimísio, perimísio e endomísio) é o colágeno, representando de 1-10% da massa seca do músculo. A imunolocalização dos diferentes tipos de colágeno neste tecido conectivo foi identificada, apresentando variação durante o estágio de desenvolvimento, sendo o colágeno tipo I, III, IV, V, VI, XI, XII, XIV, XV e XVIII expressos durante o início da formação da musculatura esquelética, enquanto que os colágenos I e III predominam no músculo adulto. Particularmente, estudos sugerem que o colágeno tipo I pode ser encontrado predominantemente no perimísio, enquanto que no epimísio e endomísio prevalecem o colágeno III (GILLIES; LIEBER, 2011).

Além do colágeno, também podem ser encontrados na MEC do tecido muscular proteoglicanos, como lumicana, fibromodulina, decorina e biglicana, sendo estes dois últimos os mais abundantes, estando ligados a cadeias de glicosaminoglicanos, como sulfato de condroitina e dermatan (BRANDAN; INESTROSA, 1987). Outras moléculas muito encontradas no músculo são as glicoproteínas, cuja função está associada à arquitetura da membrana basal e sarcolema a partir da ligação com o colágeno tipo IV, sendo representadas pela laminina e fibronectina, ambas apresentando ligação direta com integrinas. Existe outra classificação de proteínas encontradas na MEC de músculo, chamadas de proteínas matricelulares, incluindo a osteopontina, que não exerce uma função estrutural, mas pode ser encontrada durante a regeneração muscular, portanto está ausente em músculo esquelético normal (GILLIES; LIEBER, 2011).

O uso do próprio músculo esquelético descelularizado como biomaterial tem sido descrito por diversos pesquisadores como uma opção de terapia celular. Inicialmente em 2005, Conconi e colaboradores demonstraram o efeito benéfico do uso de tecido muscular abdominal descelularizado e, posteriormente, recelularizado com mioblastos, para regeneração do tecido muscular abdominal. Em outro estudo foi utilizado tecido muscular recelularizado com células-tronco derivadas da medula óssea para tratar o quadríceps de camundongos que sofreram perda tecidual traumática, observando regeneração muscular com vascularização após 42 dias (MERRITT et al., 2010).

Em 2011, Perniconi e colaboradores produziram biomaterial acelular de músculo esquelético murino, preservando as características químicas, estruturais e a rede vascular do tecido de origem, avaliando a biocompatibilidade, bioatividade e integração do biomaterial. Quatro semanas após implantação no músculo tibial de camundongos, observou-se a colonização de células inflamatórias e células tronco, observando-se a biodegradação e reabsorção do biomaterial após este período, demonstrando que ele forneceu um microambiente favorável à formação de fibras musculares, promovendo a migração de células endógenas com potencial miogênico.

1.1.2. Matriz Extracelular da Placenta

A composição da MEC da placenta varia conforme o desenvolver da gestação, de modo a atender as necessidades funcionais e metabólicas do feto. É ainda influenciada por variados processos e fatores intrínsecos que podem alterar a sua composição e conformação, o que faz com que sua estrutural se diferencie desde o período da sua formação no início da gestação até a expulsão do feto ou ainda, em situações patológicas (CHEN; APLIN, 2003).

A MEC placentária em termos gerais possui composição estrutural formada por macromoléculas e proteínas como os colágenos tipo I, III, IV, V, VI, laminina, fibronectina (CHEN; APLIN, 2003; FLYNN, SEMPLER, WOODHOUSE, 2006), a elastina, glicosaminoglicanas, enzimas, proteínas anticoagulantes, antioxidantes e fatores de crescimento, como HGF (fator de crescimento do hepatócito), EGF (fator de crescimento epidérmico) e TGF- β , os quais atuam de forma autócrina e/ou parácrina, estimulando a produção de outras substâncias que possuem potencial regenerativo (JUNG et al., 2011).

Assim, a matriz placentária já tendo sido estudada e avaliada quanto aos seus efeitos terapêuticos devido à capacidade de suprimir a imunidade celular, promover angiogênese e regeneração tecidual, como em casos de cicatrização de feridas, queimaduras, doenças hepáticas e no tratamento contra a psoríase, artrite reumatoide e osteoartrite (CHOI et al., 2013). Apesar do avanço no estudo da matriz placentária, novos conhecimentos necessitam ser elucidados, especialmente,

quanto aos efeitos terapêuticos do órgão para a sua utilização na medicina regenerativa (KANG et al., 2007) (Figura 2).

Os componentes da matriz placentária acelular podem variar de acordo com os métodos de preparação, os quais são referentes às etapas de perfusão dos agentes de descelularização e digestão enzimática, em que qualquer alteração no fluxo ou tempo de exposição a estas substâncias, pode ocasionar na desnaturação e consequente perda da bioatividade das moléculas da ECM placentária (JUNG et al., 2011).

Figura 2: Matriz extracelular de placentas humana, bovina e canina descelularizadas.

Fonte: Placenta humana e bovina (KAKABADZE; KAKABADZE, 2015); Placenta canina (LOBO et al., 2016).

Legenda: Comparação das placentas de diferentes espécies antes e depois da descelularização. Porção fetal da placenta controle (A, E, I) e descelularizada (B, F, J). Porção materna da placenta controle (C, G, K) e descelularizadas (D, H, L).

1.2. DESCELULARIZAÇÃO DE TECIDOS

A descelularização consiste em eliminar as células e o conteúdo genético (DNA) dos tecidos, mantendo-se as características estruturais, bioquímicas e biomecânicas da MEC (GILPIN; YANG, 2017). Os agentes e as técnicas empregadas para realizar a descelularização dependem da natureza de cada tecido, tais como estrutura, composição, celularidade, densidade e conteúdo lipídico, mas em geral é considerada eficiente quando a combinação das etapas referentes aos processos físicos, biológicos e químicos promovem a lise das células com subsequente eliminação dos componentes celulares e nucleares, que deverá conter no mínimo 50 ng/mg de DNA residual em relação ao peso da matriz, preservando a integridade dos vasos sanguíneos e nervos (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2015).

Apesar dos resultados promissores das aplicações pré-clínicas e clínicas de biomateriais de MEC acelular, ainda há variação quanto ao método de preparação e efetividade da descelularização destas matrizes, incluindo a remoção completa do material celular, alteração da estrutura e composição da matriz, as quais são críticas para a remodelação *in vivo* e a resposta no organismo após o implante (SICARI; DEARTH; BADYLAK, 2014). Sendo assim, para reduzir os riscos de respostas imunes contra o biomaterial, diversos tratamentos enzimáticos, físicos e químicos têm sido testados para remover os componentes celulares presentes no biomaterial, conforme a natureza do tecido (BADYLAK, 2004).

Os métodos físicos estão relacionados com mudanças de temperatura, a partir da congelação de tecidos, ocasionando a formação de cristais de gelo intracelulares que promovem lise das células, porém sem a perda de proteínas da MEC; além disso, a congelação produz rupturas menores na estrutura da matriz (CAPRO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Outro método utilizado é o tratamento com alta pressão, que pode ser mais efetivo do que detergentes ou enzimas, porém podem causar ruptura da ultraestrutura da MEC (FUNAMOTO et al., 2010). Finalmente, a eletroporação é utilizada para descelularizar tecidos, induzindo a formação de microporos na membrana, causando, assim, perda da homeostase e consequente morte celular (PHILLIPS; MAOR; RUBINSKY, 2010). Assim, os métodos físicos já foram relatados na descelularização de tecidos como o pericárdio

(AIMOLI et al., 2007), medula óssea (EL-SABBAN et al., 2007), córnea (HASHIMOTO et al., 2010) ou vasos sanguíneos (FUNAMOTO et al., 2010).

Os métodos enzimáticos utilizam enzimas proteolíticas, como nucleases, tripsina, collagenase, lipase, α -galactosidade, dentre outras (CAPRO; GILBERT; BADYLAK, 2011). A tripsina é muito utilizada para a descelularização de valvas cardíacas e derme, pois promove a ruptura da membrana celular devido causar alterações na estrutura morfológica da MEC, envolvendo o colágeno, elastina e glicosaminoglicanos (GAGs) (YANG et al., 2010). As as endonucleases, tais como DNase e RNase, clivam o ácido nucléico, favorecendo, assim, a remoção de nucleotídeos após a lise celular (CAPRO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Os métodos químicos são bastante variáveis, apresentando vantagens e desvantagens:

A) *Tratamento ácido e alcalino*: causa hidrólise dos componentes citoplasmáticos e degradação dos ácidos nucléicos, porém apresentam efeitos adversos nos GAGs, como por exemplo o ácido peracético, o qual é usado em tecidos gordurosos (GILBERT et al., 2009);

B) *Tratamento hiper e hipotônico*: as soluções hiper/hipotônicas causam lise celular por choque osmótico e ruptura das interações entre DNA-proteína, porém, como desvantagem, não eliminam completamente o conteúdo celular da matriz, sendo necessárias muitas lavagens por diversos ciclos para eliminar a presença de debris celulares (exemplo: Tris HCl, EDTA e solução de NaCl) (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

C) *Detergentes não iônicos*: são muito utilizados nos protocolos de descelularização por possuir efeitos adversos mínimos na estrutura da MEC e capacidade de eliminar o conteúdo celular, a partir da ruptura das ligações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína, mantendo íntegras as interações entre proteínas, porém causam diminuição da quantidade de GAGs (exemplo: Triton X-100, usados em amostras finas de tecido, como valvas cardíacas, vasos sanguíneos e ligamentos). O tempo de exposição do tecido ao Triton X-100 é determinado de acordo com o tecido, variando de 6 horas a 14 dias (GILBERT et al., 2006).

D) *Detergentes iônicos*: estes agentes solubilizam a membrana celular, mas, ao mesmo tempo, promovem a desnaturação das proteínas, ocasionando efeitos deletérios sobre os glicosaminoglicanos. A ação de descelularização dos tecidos é mais efetiva do que o Triton X-100 e em menor tempo de exposição (24 horas),

agindo sobre tecidos densos, como rins, fígado ou articulação temporo-mandibular (exemplo: SDS- *sodium dodecyl sulfate*) (NAKAYAMA et al., 2010).

E) Detergentes zwitteriônicos: possuem propriedades referentes aos detergentes iônicos e não iônicos, mantendo a integridade das proteínas da MEC (colágeno e elastina), no entanto causa diminuição das propriedades mecânicas dos biomateriais (exemplo: CHAPS ou 3-cholamidopropyl dimethylammonio-1-propanesulfonate, usado na descelularização de tecidos finos, como nervos periféricos, vasos sanguíneos, pulmões) (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2015).

F) Álcoois: removem os lipídeos, especialmente os fosfolipídeos, e promovem desidratação dos tecidos até a lise celular, entretanto causam precipitação protéica (exemplo: metanol e etanol) (CLARK et al., 2005).

As técnicas empregadas para realizar a descelularização de um tecido dependem da estrutura, composição e espessura do mesmo. Assim, as mais utilizadas são: *a) Técnica de agitação e imersão:* envolve duas etapas, sendo a primeira caracterizada pela imersão do tecido na solução de descelularização e a segunda, por agitação, permitindo a penetração da solução através do tecido e, posteriormente, ajuda a remover os resíduos dos detergentes, por meio de sucessivas lavagens com PBS. Esta técnica é utilizada geralmente em valvas cardíacas, músculo, nervos periféricos, traquéia e derme; *b) Técnica de perfusão:* esta técnica é mais eficiente quanto à distribuição dos agentes de descelularização dentro do tecido e remoção dos debris celulares, sendo muito utilizada para coração, fígado, pulmões e bexiga (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY, 2015) (Figura 3).

Figura 3: Técnicas utilizadas para descelularização de órgãos e tecidos

Fonte: (A) MIRANDA, 2017; (B) FLYNN, SEMPLE, WOODHOUSE, 2006

Legenda: Técnica de descelularização por agitação e imersão (A). Técnica de descelularização por perfusão (B).

2. INTERAÇÃO BIOMATERIAL/HOSPEDEIRO: REMODELAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

O sucesso da remodelação depende do tamanho do biomaterial, formato, propriedades físicas e mecânicas, composição química, fatores que influenciarão na resposta do hospedeiro após a implantação. A MEC implantada exerce influência no comportamento e fenótipo das células e, por sua vez, as células continuamente produzem, degradam e remodelam a MEC, sendo este processo observado durante o desenvolvimento, homeostase e cicatrização após injúria (COSTA et al., 2017).

A biocompatibilidade representa um dos principais focos relacionados à implantação de biomateriais e seus efeitos benéficos ou prejudiciais no hospedeiro; assim, há muita preocupação em produzir biomateriais bioativos, os quais controlam a resposta inflamatória e imune com o intuito de reduzir a rejeição pelo hospedeiro (NAAHIDI et al., 2017).

2.1. MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

Os biomateriais naturais estimulam uma resposta imune após a implantação, devido à sua ultraestrutura e rica composição da matriz, modulando o fenótipo das células durante a remodelação e ativando constituintes celulares do sistema imune inato, como células dendríticas, neutrófilos, linfócitos e macrófagos (SWINEHART; BADYLAK, 2017).

Resumidamente, a resposta do hospedeiro ocorre com a ativação de células do sistema imune alguns segundos após o procedimento cirúrgico causado durante a implantação do biomaterial; assim, sangue e proteínas plasmáticas são absorvidos para o local, em um processo conhecido como efeito Vroman, resultando na formação temporária de uma matriz rica em fibrina, a qual facilita o acesso das células ao biomaterial; em seguida, ocorre a migração de neutrófilos alguns minutos após a implantação, responsáveis pela fagocitose de debris celulares e defesa contra possíveis patógenos presentes devido ao procedimento cirúrgico, além disso, secretam mediadores inflamatórios e enzimas digestivas (colagenase, elastase e serina proteases), as quais iniciam a degradação do biomaterial e remodelação tecidual, promovendo angiogênese, infiltração celular para o interior do biomaterial e liberação de peptídeos matricrípticos; a liberação de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-1 β promovem o recrutamento de outros tipos celulares, particularmente os macrófagos, determinantes para o processo de remodelação construtiva (LONDONO; BADYLAK, 2015) (Figura 4).

Os macrófagos representam uma população heterogênea, sendo compostos por macrófagos com fenótipo M1 (pró-inflamatórios ou citotóxicos), os quais são ativados pelo mediador interferon (INF)- γ e secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α e espécies reativas de oxigênio; enquanto que os macrófagos com fenótipo M2 (antiinflamatórios) são ativados por IL-4, IL-13, IL-10, e peptídeos matricrípticos liberados do biomaterial, promovendo, assim, um ambiente anti-inflamatório, homeostático, regenerativo e com propriedades regulatórias; esta polarização macrofágica para os diferentes fenótipos é regulada, em parte, pela característica do microambiente, influenciado pelo biomaterial de MEC, porém os mecanismos envolvidos nesta modulação são pouco conhecidos (COSTA et al., 2017) (Figura 4).

Alguns autores relatam que a transição de macrófagos M1 para o M2 é importante no processo de cicatrização normal de feridas, pois esta transição suprime e limita o ambiente pró-inflamatório, facilitando os eventos regenerativos, como a deposição de nova MEC, enquanto que a ausência desta transição resulta em um ambiente de inflamação crônica; assim, os macrófagos representam os principais constituintes do sistema imune inato, sendo indispensáveis para a degradação dos produtos da MEC e do processo de remodelação tecidual (TIDBALL; DORSHKIND; WEHLING-HENRICKS, 2014).

Figura 4: Interação do biomaterial com o hospedeiro

Fonte: COSTA et al., 2017

Legenda: Após a implantação ocorre infiltração de células sanguíneas e neutrófilos; estes liberam enzimas digestivas, peptídeos matricrípticos e citocinas inflamatórias, que estimulam a liberação de outros tipos celulares do sistema imune (macrófagos). Os macrófagos são responsáveis pela degradação *in vivo* e remodelação do biomaterial de matriz extracelular. Células-tronco são recrutadas para o sítio de implantação do biomaterial e participam do processo de diferenciação celular.

2.2. DEGRADAÇÃO DO BIOMATERIAL

A degradação e remodelação da MEC são necessárias para a homeostase tecidual, processos de desenvolvimento e resposta à injúria; assim, a degradação de biomateriais provenientes de MEC é indispensável para a remodelação construtiva, imumodulação e recrutamento de células endógenas (COSTA et al., 2017). Este processo de degradação pode variar de acordo com o tipo de tecido e agentes químicos utilizados para a produção do biomaterial e exigência metabólica/fisiológica do local implantado (LONDONO; BADYLAK, 2015).

O processo de degradação ocorre a partir da infiltração de células do hospedeiro (degradação celular), tais como os macrófagos, que produzem oxidantes e enzimas proteolíticas que degradam a matriz (LONDONO; BADYLAK, 2015). Durante esta degradação celular, fragmentos de peptídeos (peptídeos matricrípticos) são liberados e são expostos novos sítios, com potencial bioativo, dentro da MEC, induzindo respostas biológicas, como atividade antimicrobiana, angiogênese, migração, adesão e diferenciação celular (SWINEHART; BADYLAK, 2017).

Além disso, a degradação da MEC libera diversos fatores de crescimento como fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento do hepatócito, os quais, juntamente com os peptídeos matricrípticos, ativam receptores da superfície das células e promovem motilidade, viabilidade, diferenciação celular e angiogênese; estes fatores são hipotetizados polarizar o fenótipo de macrófagos para o tipo M2, ao invés do M1, propiciando, assim, um microambiente regenerativo (TEODORI et al., 2014).

A rápida degradação da MEC também pode ocorrer por enzimas proteases (degradação enzimática), representando, também, um dos métodos pelos quais são liberados *in vivo* os peptídeos matricrípticos (LONDONO; BADYLAK, 2015). A produção de enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) é regulada por interações das células com a MEC; assim, as MMPs são responsáveis pelo influxo de leucócitos, angiogênese, reepitelização e remodelação tecidual; desempenham função importante na liberação dos fatores de crescimento e clivagem de proteínas da MEC para expor regiões que serão ativadas pelos fatores de crescimento e, desta forma, influenciam o comportamento celular (SCHULTZ; WYSOCKI, 2009).

2.3. RECRUTAMENTO CELULAR

O biomaterial de MEC, além de induzir uma resposta imune pelo hospedeiro, também possui o potencial de recrutar células-tronco/progenitoras endógenas a partir da liberação de fatores de crescimento e peptídeos matricrípticos durante a degradação da MEC implantada (SWINEHART; BADYLAK, 2017). Assim, foi comprovado que durante 7 a 14 dias após a implantação do biomaterial, houve a migração de uma população de células mononucleares, incluindo macrófagos e células-tronco/progenitoras, e, também, formação de novos vasos sanguíneos, sendo este biomaterial completamente degradado e novo tecido formado durante 28 a 90 dias após a implantação (COSTA et al., 2017).

Estudos *in vivo* têm demonstrado o recrutamento de diversos tipos celulares para o sítio de implantação do biomaterial, incluindo células progenitoras musculares MyoD⁺ (CHEN; WALTERS, 2013), progenitoras CD133⁺ (TURNER et al., 2010), células tronco perivasculares CD146⁺/Ng2⁺ (SICARI et al., 2012) e progenitoras multipotentes Sox2⁺/Sca1⁺ (AGRAWAL et al., 2012), além de células provenientes da medula óssea, todas participando do processo de remodelação e formação de novo tecido (NIEPONICE et al., 2013). Por sua vez, estudos *in vitro* têm demonstrado que diferentes componentes da MEC, como ácido hialurônico, tenascina e laminina, influenciam o comportamento migratório de células progenitoras musculares (CALVE; ODELBURG; SIMON, 2010).

Os peptídeos matricrípticos têm apresentado atividade quimiotática, mitogênica e propriedades de diferenciação para diversas células-tronco/progenitoras com potencial miogênico tanto *in vitro* como em hospedeiros *in vivo*; por exemplo, células progenitoras CD133⁺ e perivasculares, bem como células-tronco mesenquimais (MSCs) têm sido recrutadas para o sítio de implantação da MEC em modelos *in vivo* de perda muscular volumétrica (SICARI; DEARTH. BADYLAK, 2014).

Capítulo 3: Descelularização de Músculo Esquelético

CAPÍTULO 3: DESCELULARIZAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO: CONSIDERAÇÕES GERAIS E COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de quatro protocolos para descелularização de músculo esquelético, objetivando a produção de matrizes extracelulares acelulares para potenciais aplicações na engenharia de tecidos. Assim, músculos tibiais murino foram congelados a -20°C ou armazenados a temperatura ambiente, seguidos por descелularização em soluções contendo reagentes químicos EDTA + Tris, SDS e Triton X-100, os quais foram aplicados em diferentes sequências. As amostras foram comparadas de acordo com modificações nos aspectos macroscópicos das matrizes descелularizadas, na habilidade do processo de descелularização em remover núcleos celulares e fita dupla de DNA (*dsDNA*) dos músculos e na capacidade de preservar o conteúdo protéico da matriz extracelular e estrutura tridimensional. Protocolos onde a descелularização iniciou com a solução SDS, observou-se a otimização da remoção de células e *dsDNA*, além da preservação da ultraestrutura e composição da matriz extracelular, quando comparado àqueles que iniciaram com EDTA + Tris. Baixas temperaturas favoreceram a descелularização, independentemente da sequência dos reagentes químicos. Os resultados demonstraram que congelar as amostras a -20°C anteriormente ao processamento e submeter à incubação inicial em solução de 1% SDS (Protocolo 2B) favoreceu a descелularização de músculo esquelético murino.

Palavras-chave: matriz extracelular, músculo esquelético, matriz acelular, descелularização, engenharia de tecidos, biomaterial

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético corresponde a 50% da massa corporal (QAZI et al., 2015) e apresenta alta capacidade regenerativa (JUHAS; BURSAC, 2013). Entretanto, a habilidade de auto-renovação é diminuída depois de danos ortopédicos e em nervos periféricos, atrofia muscular irreversível e perda muscular volumétrica (volumetric muscle loss- VML) (WU et al., 2012). VML é a perda imediata de fibras musculares causada por traumas e pode levar a performances mecânicas e funcionais inadequadas da musculatura remanescente depois da injúria (CORONA; GREISING, 2016).

A reconstrução da VML comumente requer procedimentos cirúrgicos para transplante de enxertos musculares autólogos. Entretanto, a insuficiência de tecido doador autólogo, particularmente em casos de injúrias severas, perda da função e alta morbidade do sítio doador, são importantes desvantagens (JANA; LEVENGOOD, ZHANG et al., 2016). Alternativas para a reconstrução da VML compreendem o implante de biomateriais biológicos e/ou sintéticos, os quais idealmente devem simular a composição química e estrutural dos músculos (WRONA et al., 2016).

Biomateriais biológicos devem ser produzidos por descclularização de tecidos (LEE et al., 2017), a qual objetiva a remoção celular e preservação da estrutura e função da matriz extracelular (MEC). A MEC remanescente, após esterilização adequada, tem sido testada sozinha ou em combinação com células tronco e/ou progenitoras para regeneração tecidual (PARMAKSIZ et al., 2016). Por exemplo, MEC descclularizada derivada de pele (CHEN et al., 2004), ligamentos (ENDRESS et al., 2012), tendão (YIN et al., 2013) e músculo esquelético (PORZIONATO et al., 2015) tem sido utilizados *in vitro*, *in vivo* e clinicamente, não somente como aloenxertos, mas também como xenoenxertos (SICARI et al., 2014).

A descclularização pode ser alcançada usando métodos químicos, físicos e/ou enzimáticos. Os reagentes químicos incluem surfactants iônicos (sodium dodecyl sulfate; SDS), não iônicos (Triton X-100) ou zwitteriônicos (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]- 1- propanesulfonate; CHAPS), bem como soluções ácidas (ácido peracético) e básicas (hidróxido de ammonia; NH₄OH) (GILPIN; YANG, 2017). Ciclos de congelação-descongelação têm sido usados como método

físico, aplicados previamente à descelularização química e tem sido demonstrada a redução de conteúdo de células vitais (BURK et al., 2014). A tripsina é uma enzima proteolítica usada em processo de descelularização, enquanto que as nucleases (DNase e RNase) são enzimas que clivam ácidos nucleicos e facilitam a eliminação de nucleotídeos após a lise celular (BOCCAFOSECHI et al., 2015).

Todos os reagentes químicos apresentam prós e contras; assim, soluções distintas têm sido combinadas para garantir a remoção celular e minimizar os efeitos deletérios sobre a estrutura e composição da MEC. Por exemplo, o SDS pode levar à completa remoção celular e elimina, assim, até 90% do DNA, mas pode diminuir o conteúdo de glicosaminoglicanos e fatores de crescimento da MEC; o Triton X-100 é menos agressivo do que o SDS, mas não elimina apropriadamente os elementos celulares remanescentes dentro da matriz (GILPIN; YANG, 2017).

O processo e eficácia da descelularização é tecido-específica e pode ser espécie-específica. Portanto, este trabalho objetiva comparar a eficácia e os efeitos dos métodos fisicoquímicos, por exemplo, temperatura de congelamento e aplicações de diferentes sequências de soluções químicas, para descelularização de músculo esquelético murino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS E AMOSTRAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Este trabalho foi aprovado e está de acordo com os padrões técnicos da bioética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA nº 9553300114) e do Instituto Butantan (CEUA nº 2989051015). Foram usados ratos machos *Wistar* (n=50), pesando 350 gramas, 3 meses de idade, provenientes do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil); o músculo tibial cranial foi bilateralmente dissecado e coletado (n=100). Em seguida, após a remoção da fáscia e tendão do músculo tibial, as amostras foram lavadas em água corrente, seguidas por incubação em solução salina fosfatada (*phosphate buffered saline*- PBS) 1x + 0,5% de penicilina e estreptomicina (LGC Biotecnologia, Brasil), 3x por 5 minutos sob agitação em shaker TS-2000A VDRL (Biomixer, EUA).

2.2. DESCELULARIZAÇÃO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO MURINO

A descelularização foi realizada por meio da imersão das amostras em frascos contendo 25 ml de solução de descelularização e mantidos sob agitação em shaker por 10 horas durante o dia, permanecendo em repouso *overnight*. As soluções foram trocadas 2x ao dia. Quatro protocolos (Protocolos 1A, 1B, 2A e 2B) foram testados, os quais variaram de acordo com a temperatura de armazenamento (congelados a -20°C, após a coleta e lavagem inicial, anteriormente à descelularização, ou mantidos a temperatura ambiente) e a sequência dos reagentes químicos nos quais as amostras foram expostas (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição dos quatro protocolos testados para descelularização de músculo esquelético de rato *Wistar*

Protocolo	Número de Amostras	Temperatura	Solução de Descelularização	Tempo
1	25	TA (1A)	5mM EDTA+ 50mM Tris	2 dias
			1% SDS	4 dias
	25	-20°C (1B)	1% Triton X-100	2 dias
2	25	TA (2A)	1% SDS	4 dias
			5mM EDTA+ 50mM Tris	4 dias
	25	-20°C (2B)	1% Triton X-100	2 dias

TA: Temperatura Ambiente

Fonte: MIRANDA, 2017

Nos protocolos 1A e 1B, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente (Protocolo 1A) durante o processamento (n= 25) ou foram previamente congeladas a -20°C (Protocolo 1B) por 4 dias (n= 25), sendo descongeladas e incubadas em PBS 1x por 20 minutos a temperatura ambiente. Ambos os grupos foram processados usando a seguinte sequência de soluções: 5mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; LGC Biotecnologia, Brasil) associado com 50 mM Tris (LGC Biotecnologia, Brasil) por 2 dias; lavagem em PBS 1x + 0,5% antibiótico (ATB; 3x, 5 minutos cada) e incubação em 1% sodium dodecyl sulfate (SDS; LGC Biotecnologia, Brasil) por 4 dias. Novas lavagens foram realizadas usando PBS 1x + 0,5% ATB (3x, 5 minutos), as quais foram seguidas por incubação em 1% Triton X-100 (LGC Biotecnologia, Brasil) por 2 dias.

Nos Protocolos 2A e 2B, as amostras também foram mantidas tanto a temperatura ambiente (Protocolo 2A) durante o processamento (n= 25) ou foram congeladas a -20°C (Protocolo 2B) por 4 dias (n= 25), previamente à incubação com as diferentes soluções. Aqui, os reagentes químicos foram aplicados na seguinte sequência: 1% SDS por 4 dias; lavagem em PBS 1x + 0,5% ATB (3x, 5 minutos

cada); incubação em 5 mM EDTA + 50 mM Tris por 2 dias; lavagem novamente em PBS 1x + 0,5% ATB (3x, 5 minutos cada) e incubação em 1% Triton X-100 por 2 dias.

Durante os protocolos, as amostras permaneceram sob imersão e agitação a temperatura ambiente por 10 horas durante o dia e, então, incubados sem agitação *overnight*.

Ao final das incubações, todas as amostras foram lavadas em PBS 1x + 0,5% ATB (3x de 20 minutos), esterilizadas em álcool 70% (Synth, Brasil) (3x de 30 minutos) e lavados novamente em PBS 1x + 0,5% ATB (3x de 20 minutos).

Macroscopicamente, as amostras foram analisadas de acordo com translucidez, morfologia, consistência à manipulação e tamanho final após o processamento, sendo comparadas com amostras de músculo nativo.

2.2.1. Análise Histológica

Amostras de músculo esquelético nativo e descelularizado (n= 4, para cada protocolo) foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 48 horas, incubadas em álcool 70% *overnight*, desidratadas gradualmente em etanol (80%, 90%, 95%, 100% e 100%, 30 minutos), incubadas em xilol (2x de 30 min) (Dinâmica, Brasil) e, finalmente, incluídas em parafina (ERV-PLAST, EasyPath, Brasil) por 3 horas. Cortes de 5 µm foram obtidos usando micrótomo (Leica RM 2125RT, Alemanha), corados e montados em lâminas histológicas (Global Glass, EUA) com Permount (Fisher Scientific, EUA).

Antes da coloração, a parafina foi removida das lâminas com xilol (2x de 15 minutos) e a rehidratação foi realizada em uma série decrescente de álcool (100%, 100%, 95%, 70%, 3 minutos) e água corrente (10 minutos).

A coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) foi realizada para avaliar a presença de fibras musculares intactas e núcleos após a descelularização. As lâminas foram incubadas em hematoxilina por 5 minutos (EasyPath, Brasil), lavadas em água corrente (10 minutos), incubadas em eosina por 30 segundos (Dinâmica, Brasil), seguidas por banho em água (2x).

A coloração de Tricrômio de Masson foi realizada para avaliar a presença e organização de fibras colágenas. Os cortes foram incubados em hematoxilina (4 minutos), lavados em água corrente (5 minutos), incubados em Solução A (1g fucsina ácida, 1 ml ácido acético e 100 ml de água destilada) por 10 minutos (Dinâmica, Brasil), lavados em água (2x), incubados em Solução B (1g ácido fosfomolibdico e 100 ml de água destilada) por 15 minutos (Dinâmica, Brasil), lavados novamente em água (2x), incubados em Solução C [2,5g azul de anilina (Vetec, Brazil), 2,5 ml ácido acético (Dinâmica, Brasil) e 100 ml de água destilada] por 15 minutos; lavados em água (2x), incubados em ácido acético (5 minutos) e, finalmente banhados em água (2x).

Após ambos os processos de coloração (H&E e Tricrômio de Masson), as amostras foram desidratadas em álcool 90%, 100%, 100% (2x cada), incubadas em xilol-álcool (1:1, 1 min), incubadas em xilol (2x de 5 minutos) e montadas. As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz Nikon 80i (Japão) em objetiva de 50x.

A coloração de Picrossírius foi realizada para avaliar a preservação de fibras colágenas no músculo esquelético. As lâminas foram incubadas em Picrossírius Red, que contém Direct Red 80 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 2% solução saturada de ácido pícrico (Dinâmica, Brasil), por 20 minutos; banhadas em água (2x); desidratadas em álcool (85%, 100%, 100%); banhadas em água novamente (2x); incubadas em xilol-álcool (1:1, 1 min) e xilol (2x de 5 min) e, finalmente, montadas. As lâminas foram analisadas em microscópio Carl Zeiss (Alemanha) com objetiva de 16x com luz polarizada.

2.2.2. Quantificação de DNA

Após a descelularização, as amostras foram congeladas a -80°C e a concentração de fita dupla de DNA (double-stranded DNA- dsDNA) residual dentro da matriz descelularizada foi avaliada usando Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Life Technologies, Massachusetts, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, as amostras descelularizadas foram fragmentadas (0,2 cm de comprimento x 0,2 cm de largura), colocadas em placas de 96 poços (protegidas

da luz) e incubadas a 37°C com solução de PicoGreen®. Após 18 horas, a solução de PicoGreen® foi transferida para placas negras (Black Plate 96 wells, Falcon®-Cary, Carolina do Norte, EUA) e a fluorescência foi mensurada usando espectrofotômetro (SpectraMax®Paradigm®, Sunnyvale, Califórnia, EUA), com comprimento de onda de 480 nm de excitação e 520 nm de emissão. Uma curva padrão linear foi estabelecida usando dados de fluorescência de concentrações conhecidas de DNA (1, 10, 100 e 1000 ng/ml); a equação de regressão derivada desta curva foi usada para calcular a concentração de dsDNA dentro das amostras analisadas. O experimento foi realizado em quadruplicata.

2.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise da MEV foi realizada para avaliar a estrutura tridimensional (3D) da MEC nativa e descelularizada (n=3, para cada protocolo). Os tecidos foram fixados em solução de Karnovsky, contendo 2.5% glutaraldeído and 4% PFA (1:1) por 24 horas, lavados em água destilada (5x de 5 minutos) usando um ultrassom (Unique, Brasil), incubados em álcool 70% *overnight*, desidratados em etanol (80%, 90% e 100% 2x, 5 minutos cada) e secados em aparelho de ponto crítico com CO₂ (Leica EM CDP300, Alemanha). As amostras foram metalizadas em outro (coater Emitech K550, Inglaterra) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Leo 435 VP, Inglaterra).

2.2.4. Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada para avaliar a presença de laminina, fibronectina e colágenos tipos I e III nas amostras de músculo nativo e descelularizado (n= 2, para cada protocolo). As amostras foram inicialmente embebidas em composto O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*) (Sakura Finetek 4583; EUA) e congelados a -150°C. Cortes histológicos de 12 µm de espessura foram realizados usando criostato (Leica CM1850, Alemanha). As lâminas foram

fixadas em acetona fria (Vetec, Brasil) por 10 minutos, secadas a temperatura ambiente por 20 minutos e incubadas em solução salina-Tris 1x (TBS) + 2% albumina sérica bovina (BSA; *bovine serum albumin*) por 1 hora e incubadas com anticorpo primário anti-laminina (1:200) (Abcam-ab11575, *rabbit polyclonal*, EUA), anti-fibronectina (1:200) (Abcam-ab2413, *rabbit polyclonal*, EUA), anti-colágeno I (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, sc-25974, *goat polyclonal*, CA, EUA) e anti-colágeno III (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, sc-8779, *goat polyclonal*, CA, USA) *overnight* a 4°C em câmara úmida.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas (3x, 5 minutos cada) com TBS + 0,2% BSA a temperatura ambiente, incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora, protegido da luz. Foram usados os anticorpos secundários Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit (1:300) (Life Technologies, A-11008, EUA) e Alexa-Fluor 488 donkey anti-goat (1:200) (Life Technologies, A-11055, EUA). As lâminas foram lavadas em solução de TBS + 0,2% BSA (3x, 5 minutos), incubadas com DAPI (1:10.000) por 10 minutos a temperatura ambiente, montadas em glicerol:PBS (1:1) e analisadas em microscópio confocal (FV1000 Olympus IX81, Japão) com objetivas de 200x e 400x, em 5 campos microscópios diferentes.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da concentração de dsDNA (teste do PicoGreen®) foram analisados pela ANOVA duas vias (efeito dos protocolos de descelularização em diferentes temperaturas) com pós-teste de Tukey, usando o programa estatístico Graphpad (Versão 6.0). O nível de significância de 5% foi adotado ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

A comparação dos quatro protocolos testados foi baseada em: aspectos macroscópicos das amostras após o processamento, habilidade em remover as células da matriz (analisada pela histologia), concentração de *dsDNA* remanescente dentro da MEC (analisada pela quantificação de DNA), manutenção da estrutura 3D e preservação do conteúdo proteico da MEC (analisada pela MEV e imunofluorescência, respectivamente).

3.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA

Macroscopicamente, todas as amostras descelularizadas, independentemente do grupo experimental, tornaram-se translúcidas, adquiriram uma consistência gelatinosa e apresentaram uma diminuição média de 0,5 cm em relação ao comprimento inicial (1,5 cm) após a descelularização. As amostras processadas de acordo com os Protocolos 2A e 2B (onde a descelularização se iniciou com a solução de 1% SDS), independentemente da temperatura inicial, mostraram as alterações macroscópicas, previamente descritas, após o 2º dia, enquanto que as amostras inicialmente submetidas à solução de 5mM EDTA + 50mM Tris solution (Protocolos 1A e 1B), mostraram as mesmas alterações macroscópicas após o 5º dia de descelularização (Figura 5). Não houve diferença na consistência das amostras entre os diferentes protocolos.

Figura 5: Músculo esquelético tibial cranial de ratos *Wistar*

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Imagens macroscópicas do músculo tibial cranial de rato *Wistar* antes (A) e após (B-E) a descelularização de acordo com diferentes protocolos (1A, 1B, 2A e 2B), destacando-se o aspecto translúcido e mudanças no tamanho das amostras após o processamento.

3.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Apesar do aspecto translúcido da MEC descelularizada (Figura 5), as amostras dos Protocolos 1A e 1B ainda apresentavam núcleos remanescentes e fibras musculares após 8 dias de descelularização. Apesar da remoção celular ineficiente, foi observada a desorganização dos feixes musculares. Por outro lado, os Protocolos 2A e 2B, nos quais foi utilizado primeiramente 1% SDS, otimizaram a remoção das células e fibras musculares, independentemente da temperatura inicial (Figura 6).

Os Protocolos 2 (2A e 2B) também preservaram a integridade estrutural e organizacional do tecido conectivo do músculo esquelético, incluindo o endomísio e perimísio, como observado na coloração de Tricrômio de Masson. As fibras colágenas foram notadas em todos os grupos experimentais através da coloração de Picrossírius, na qual a birrefringência amarelo-laranja-vermelho indicou presença de fibras colágenas espessas, enquanto a birrefringência verde, fibras finas (Figura 6).

Figura 6: Fotomicroscopia de músculo esquelético tibial cranial de ratos *Wistar* antes e após a descelularização.

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Imagens histológicas de músculo nativo (Controle) e descelularizado (Protocolos 1 e 2). Nas amostras submetidas ao Protocolo 1A e 1B, a presença de núcleos remanescentes (N) e fibras musculares (seta preta) foram claramente observadas. Por outro lado, nas amostras dos Protocolos 2A e 2B, ausência de células e manutenção das estruturas do tecido conjuntivo foram notadas. Na microscopia com a luz polarizada (Picrossírius) do músculo nativo e descelularizado, fibras colágenas espessas (birrefringência amarelo-laranja-vermelho) e finas (birrefringência verde) foram observadas. **N:** núcleos; **E:** endomísio; **P:** perimísio. Barra de escarla HE e Tricrômio de Masson: 50 µm; Picrossírius: 20 µm.

3.3. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

O teste do Pico Green® foi usado para quantificar dsDNA remanescente dentro das matrizes descelularizadas.

No Protocolo 1, apesar de uma tendência de menos moléculas de DNA nas amostras que foram congeladas a -20°C (Protocolo 1B), quando comparado àquelas mantidas a temperatura ambiente (Protocolo 1A), a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,06$) (Protocolo 1A: $53 \pm 20,1$ ng/ml; Protocolo 1B: $10,75 \pm 0,85$ ng/ml) (Figura 7).

Da mesma forma, não houve diferença ($p=0,9$) entre as amostras processadas de acordo com os Protocolos 2A e 2B (Protocolo 2A: $10,73 \pm 6,55$ ng/ml; Protocolo 2B: $3,25 \pm 0,75$ ng/ml).

A comparação entre os Protocolos 1A e 2A (onde as amostras foram armazenadas a temperatura ambiente), bem como entre os Protocolos 1B e 2B (onde as amostras foram congeladas a -20°C), mostraram ausência de diferenças estatisticamente significantes ($p= 0,06$ para amostras em temperatura ambiente e $p=0,9$ para amostras congeladas).

Similarmente, não houve diferença estatística ($p= 0,9$) quando comparados os Protocolos 1B e 2A. Por outro lado, amostras descelularizadas de acordo com o Protocolo 1A apresentaram maior quantidade de dsDNA remanescente, o qual foi estatisticamente diferente, quando comparado com o Protocolo 2 ($p= 0.02$).

Apesar da ausência de diferenças estatisticamente significantes, as amostras que foram congeladas antes do início do processo de descelularização, bem como as amostras onde a descelularização se iniciou com a solução de SDS (Protocolos 2A e 2B), apresentaram uma tendência de menos concentração de DNA dentro da MEC.

Figura 7: Quantificação de DNA remanescente em amostras descclularizadas de músculo esquelético de ratos *Wistar*.

Legenda: Análise da eficácia de diferentes protocolos de descclularização na eliminação de *dsDNA* de músculo esquelético descclularizado. Apesar de existir uma tendência de menor quantidade de DNA nas amostras incubadas com SDS no início do processamento (Protocolos 2A e 2B), para ambas as temperaturas, ou seja, temperatura ambiente (2A) ou congelação a -20°C (2B), as diferenças não foram estatisticamente significantes. Diferenças estatísticas foram detectadas somente quando as amostras do Protocolo 1A foram comparadas àquelas do Protocolo 2B ($p=0,02$) (* $p<0,05$).

3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou a organização das fibras musculares, envoltas pelo tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) no músculo nativo (Controle) (Figura 8A). As amostras preparadas de acordo com os Protocolos 1A e 1B apresentaram descclularização parcial e poucas áreas com miofibrilas intactas foram notadas (Figuras 8B e 8C).

Por outro lado, nas amostras dos Protocolos 2A e 2B a eliminação das fibras musculares foi otimizada e a organização do endomísio e perimísio foi preservada. A

estrutura microfibrilar do endomísio foi detectada depois da descelularização (Figuras 8D e 8E).

3.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA

As proteínas relacionadas à adesão celular (laminina e fibronectina) e ao suporte estrutural (colágenos tipo I e III) foram preservadas nas matrizes descelularizadas processadas de acordo com os quatro protocolos, como observado pelas análises de imunofluorescência. O núcleo não foi detectado com o protocolo descrito para marcação com DAPI, apesar de células remanescentes terem sido evidenciadas na análise histológica (Figura 9).

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura do músculo esquelético de ratos *Wistar*.

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Microscopia eletrônica de varredura do músculo nativo (A) e descelularizado (B-E). No Protocolo 1A (B) e 1B (C) foram observadas fibras musculares, enquanto que no Protocolo 2A (D) e 2B (E), a remoção celular foi otimizada e as microfibras do tecido conjuntivo, incluindo endomísio e perimísio, foram preservadas. Seta amarela: perimísio; Seta vermelha: endomísio; Asterisco (*): fibras musculares remanescentes. Barra de escala: 30 μm.

Figura 9: Imunofluorescência de proteínas de matriz extracelular de músculo esquelético de ratos Wistar.

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Imunofluorescência para laminina, fibronectina e colágeno tipos I e III presentes na matriz extracelular de músculo esquelético de ratos nativo (Controle) e descelularizado (Protocolos 1 e 2). Barra de escala= 40 e 100 µm.

4. DISCUSSÃO

Este estudo objetivou definir um protocolo eficiente para descelularizar músculo esquelético murino, para obtenção de matrizes acelulares para aplicações potenciais na engenharia tecidual. Estas matrizes têm sido produzidas a partir de uma variedade de tecidos e órgãos e têm sido satisfatoriamente aplicadas como biomateriais alogênicos ou xenogênicos, permitindo e/ou induzindo a proliferação e diferenciação celular (LOBO et al., 2015).

Diferentes métodos físicos e/ou químicos têm sido descritos para promover satisfatoriamente a descelularização e a indicação destes métodos difere entre os autores, mesmo para um determinado tecido. A efetividade dos reagentes químicos pode variar de acordo com a celularidade, densidade, conteúdo lipídico e espessura dos tecidos e/ou órgãos a serem descelularizadas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK et al., 2011). Além disso, o método aplicado pode levar à desnaturação das proteínas da MEC, o que pode comprometer a morfologia e composição do tecido. Isto pode, por fim, afetar a bioatividade da matriz acelular após a implantação *in vivo*.

Neste estudo foram testados quatro diferentes protocolos. Nos Protocolos 1A e 1B, o músculo esquelético murino foi inicialmente tratado com 5mM EDTA associado com 50mM Tris por 2 dias, seguido pela incubação em 1% SDS por 4 dias e 1% Triton X-100 por 2 dias. Nos Protocolos 2A e 2B, os mesmos reagentes foram utilizados, durante o mesmo tempo, mas em uma sequência diferente, ou seja, com incubação inicial em 1% SDS (ao invés de EDTA e Tris), seguido por 5mM EDTA + 50mM Tris e 1% Triton X-100. Além disso, as amostras foram mantidas tanto em temperatura ambiente durante o processamento (Protocolos 1A e 2A) ou congeladas a -20°C anteriormente à descelularização (Protocolos 1B e 2B).

Os reagentes químicos utilizados neste estudo estão presentes em diversos protocolos. O ácido etilenodiamonitetracético (EDTA) é um quelante de Ca^{2+} e Mg^{2+} , os quais são íons essenciais que promovem a interação célula-matriz. Portanto, o EDTA tem sido usado devido facilitar a remoção celular da MEC e tem sido aplicado em associação ao Tris para melhorar a lise celular por meio do choque osmótico, a dissociação do DNA de outras proteínas e a eliminação de debris celulares após a lise (BOCCAFOSCHI et al., 2015).

O Tris é uma solução hipo/hipertônica, que pode causar lise celular por choque osmótico, levando à ruptura da ligação DNA-proteína. Estas soluções têm sido amplamente utilizadas para remover debris celulares. Entretanto, como eles não são suficientes para eliminar as células da matriz, eles têm sido associados com outros reagentes, como o SDS (HREBIKOVA; DIAZ; MOKRY et al., 2015).

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente iônico responsável pela desnaturação proteica e causa solubilização da membrana celular (YE et al., 2016). O SDS tem sido descrito como um reagente essencial para a descelularização de inúmeros tecidos e órgãos, tais como aorta (OTT et al., 2008), rim (BURGKART et al., 2014) e pulmão (O'NEILL et al., 2013). A exposição ao SDS pode variar dependendo do órgão, tipo de tecido, idade do doador, método de incubação, dentre outros fatores (CRAPO; GILBERT; BADYLAK et al., 2011).

O Triton X-100 é um detergente não iônico que leva à ruptura do tecido e é menos agressivo que o SDS, preservando as ligações proteína-proteína (CRAPO; GILBERT; BADYLAK et al., 2011). Com o intuito de diminuir o dano potencial do SDS à MEC, o Triton X-100 tem sido acrescentado ao processo de descelularização, assim, o tempo de exposição ao SDS pode ser diminuído.

Diferentes protocolos têm sido descritos na literatura para a descelularização de músculo esquelético. Por exemplo, músculo canino tem sido descelularizado com uma combinação de métodos físicos (congelamento a -80°C), químicos (associação de clorofórmio/methanol; 2% desoxicolato; 1% Triton X-100; 0.1% ácido peracético/ 4% etanol) e enzimáticos (0.2% Tripsina/ 0.2% EDTA)²⁵. Músculo suíno tem sido processado usando reagentes químicos (0.1% SDS; 1% Triton X-100; 0.1% ácido peracético/ 4% etanol) e enzimáticos (0.02% Tripsina/ 0.05% EGTA; DNase), mas com ausência de métodos físicos (ZHANG et al., 2016).

Neste estudo, a aplicação de 1% SDS no início do processo (Protocolos 2A e 2B) favoreceu a descelularização e levou às mudanças morfológicas da matriz mais precocemente (aspecto translúcido, diminuição no tamanho e consistência gelatinosa à manipulação), quando comparado com a utilização posterior da mesma solução (Protocolos 1A e 1B). Isto não somente mostrou a eficácia e importância da inclusão do SDS no protocolo, mas, também, forneceu evidências que a sequência pela qual os reagentes químicos foram usados, alteram as características finais da MEC.

Por outro lado, os resultados obtidos com amostras congeladas sugeriram que baixas temperaturas podem causar danos às células e podem permitir maior penetração dos reagentes químicos dentro do tecido, favorecendo a remoção celular, independente de qual solução foi usada primeiramente. Isto está de acordo com a literatura, a qual relata que os efeitos favoráveis do tecido congelado em promover a ruptura da membrana celular é devido à formação de cristais de gelo intracelulares (GILBERT; SELLARO; BADYLAK et al., 2006) e, também, que o processo de congelação-descongelação poderia contribuir para menor ruptura da ultraestrutura da MEC (CRAPO; GILBERT; BADYLAK et al., 2011).

Agentes químicos podem não remover completamente o conteúdo celular; assim, *dsDNA*, mitocôndria, DNA mitocondrial e fosfolípidos de membrana celular podem permanecer aderidos à matriz. Após a implantação, a rejeição imune das matrizes acelulares, contendo tais elementos residuais, pode variar dependendo da fonte da MEC, o tipo de tecido no qual será implantado e a função imunológica do hospedeiro (CRAPO; GILBERT; BADYLAK et al., 2011). A resposta inflamatória pelo hospedeiro pode comprometer o processo de remodelação, portanto, o biomaterial deve conter níveis abaixo de 50 ng de DNA/mg de peso seco de MEC (KEANE et al., 2012).

Quanto maior o processamento do tecido, menor a resistência mecânica e a manutenção da estrutura física (disposição 3D das proteínas da matriz). A composição estrutural e funcional da MEC também afeta diversas atividades celulares e pode promover um microambiente favorável para as células residentes (ZHANG et al., 2016). Independentemente do agente ou método usado para a descelularização do tecido, alterações na composição e ultraestrutura da MEC são comumente observadas; portanto, é essencial minimizar estes efeitos deletérios (CRAPO; GILBERT; BADYLAK et al., 2011).

O colágeno é uma das principais proteínas da MEC do tecido muscular e diversos tipos têm sido identificados: I, III, IV, V, VI, XI, XII, XIV, XV e XVIII. Entre estes, os colágenos tipo I e III predominam no músculo adulto, particularmente, dentro do epimísio, perimísio e endomísio (GILLIES; LIEBER, 2011). Outras moléculas podem ser encontradas na MEC do músculo esquelético, tais como proteoglicanos (decorina e biglican), glicosaminoglicanos (dermatan) e glicoproteínas (laminina e fibronectina), as quais, em conjunto com os fatores de crescimento, poderiam sustentar e/ou induzir a remodelação tecidual (GILLIES;

LIEBER, 2011; FU et al., 2016). Colágenos tipo I e III, laminina e fibronectina, analisados neste estudo, foram preservados após o processo de descelularização.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que ambos os parâmetros, temperatura no qual o músculo esquelético foi armazenado e a sequência de aplicação dos reagentes químicos, impactaram nas características finais das matrizes acelulares. A congelamento do músculo esquelético murino a -20°C, seguido pela incubação em 1% SDS, 5 mM EDTA + 50 mM Tris e 1% Triton X-100 (Protocolo 2B), favoreceu o processo de descelularização do tecido muscular. As matrizes descelularizadas produzidas de acordo com este protocolo podem ser aplicadas como biomateriais para a engenharia de tecidos na medicina veterinária.

REFERÊNCIAS

BOCCAFOSCHI, F.; BOTTA, M.; FUSARO, L.; COPES, F.; RAMELLA, M.; CANNAS, M. Decellularized biological matrices: an interesting approach for cardiovascular tissue repair and regeneration. **J Tissue Eng Regen Med.**, Italy, v. 11, n. 5, p. 1648-57, Sept. 2015.

BURBKART, R.; TRON, A.; PRODINGER, P.; CULMES, M.; TUEBEL, J.; VAN GRIENSVEN, M.; SALDAMLI, B.; SCHMITT, A. Decellularized kidney matrix for perfused bone engineering. **Tissue Eng Part C Methods.**, Munich, v. 20, n. 7, p. 553-61, Apr. 2014.

BURK, J.; ERBE, I.; BERNER, D.; KACZA, J.; KASPER, C.; PFEIFFER, B.; WINTER, K.; BREHM, W. Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons. **Tissue Eng Part C Methods.**, Germany, v. 20, n. 4, p. 276-84, 2014.

CHEN, R.N.; HO, H.O.; TSAI, Y.T.; SHEU, M.T. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. **Biomaterials.**, Taiwan, v. 25, n. 13, p. 2679-86, Sept. 2004.

CORONA, B.T.; GREISING, S.M. Challenges to acellular biological scaffold mediated skeletal muscle tissue regeneration. **Biomaterials.**, Houston, v. 104, p. 238-46, Oct. 2016.

CRAPO, P.M.; GILBERT, T.W.; BADYLAK, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials.**, Pittsburgh, v. 32, n. 12, p. 3233-43, Apr. 2011.

ENDRESS, R.; WOON, C.Y.; FARNEBO, S.J.; BEHN, A.; BRONSTEIN, J.; PHAM, H.; YAN, X.; GAMBHIR, S.S.; CHANG, J. Tissue-engineered collateral ligament composite allografts for scapholunate ligament reconstruction: an experimental study. **J Hand Surg Am.**, California, v. 37, n. 8, p. 1529-37, May. 2012.

FU, Y.; FAN, X.; TIAN, C.; LUO, J.; ZHANG, Y.; DENG, L.; QIN, T.; LV, Q. Decellularization of porcine skeletal muscle extracellular matrix for the formulation of a matrix hydrogel: a preliminary study. **J Cell Mol Med.**, China, v. 20, n. 4, p. 740-9, Dec. 2016.

GILBERT, T.W.; SELLARO, T.L.; BADYLAK, S.F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials.**, Pittsburgh, v. 27, n. 19, p. 3675-83, Jul. 2006.
GILLIES, A.R.; LIEBER, R.L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle Nerve.**, California, v. 44, n. 3, p. 318-31, Sept. 2011.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. **BioMed Res Int.**, Morgantown, v. 2017, ID 9831534, Apr. 2017.

HREBIKOVA, H.; DIAZ, D.; MOKRY, J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, Prague, v. 159, n. 1, p. 12-7, Oct. 2015.

JANA, S.; LEVENGOOD, S.K.; ZHANG, M. Anisotropic materials for skeletal-muscle-tissue engineering. **Adv Mater.**, Washington, v. 28, n. 48, p. 10588-612, Dec. 2016.

JUHAS, M.; BURSAC, N. Engineering skeletal muscle repair. **Curr Opin Biotechnol.**, Durham, v. 24, n. 5, p. 880-6, Oct. 2013.

KEANE, T.J.; LONDONO, R.; TURNER, N.J.; BADYLAK, S.F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials.**, Pittsburgh, v. 33, n. 6, p. 1771-81., Dec. 2012.

LEE, P.F.; CHAU, E.; CABELLO, R.; YEH, A.T.; SAMPAIO, L.C.; GOBIN, A.S.; TAYLOR, D.A. Inverted orientation improves decellularization of whole porcine hearts. **Acta Biomater.**, Houston, v. 49, p.181-91, Nov. 2017.

LOBO, S.E.; GLICKMAN, R.; DA SILVA, W.N.; ARINZEH, T.L.; KERKIS, I. Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics. **Cell Tissue Res.**, São Paulo, v. 361, n. 2, p. 477-95, Feb. 2015.

O'NEILL, J.D.; ANFANG, R.; ANANDAPPA, A.; COSTA, J.; JAVIDFAR, J.; WOBMA, H.M.; SINGH, G.; FREYTES, D.O.; BACCHETTA, M.D.; SONETT, J.R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. **Ann Thorac Surg.**, New York, v. 96, n. 3, p. 1046-56, Apr. 2013.

OTT, H.C.; MATTHIESEN, T.S.; GOH, S.K.; BLACK, L.D.; KREN, S.M.; NETOFF, T.I.; TAYLOR, D.A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nat Med.**, Massachusetts, v. 14, n. 2, p. 213-21, Jan. 2008.

PARMAKSIZ, M.; DOGAN, A.; ODABAS, S.; ELÇIN, A.E.; ELÇIN, Y.M. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomed Mater.**, Turkey, v. 11, n. 2, p. 022003, Mar. 2016.
PORZIONATO, A.; SFRISO, M.M.; PONTINI, A.; MACCHI, V.; PETRELLI, L.; PAVAN, P.G.; NATALI, A.N.; BASSETTO, F.; VINDIGNI, V.; DE CARO, R.

Decellularized human skeletal muscle as biologic scaffold for reconstructive surgery. **Int J Mol Sci.**, Padova, v. 16, n. 7, p. 14808-31, July. 2015.

QAZI, T.H.; MOONEY, D.J.; PUMBERGER, M.; GEISLER, S.; DUDA, G.N. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. **Biomaterials.**, Berlin, v. 53, p. 502-21, Mar. 2015.

SICARI, B.M.; RUBIN, J.P.; DEARTH, C.L.; WOLF, M.T.; AMBROSIO, F.; BONINGER, M.; TURNER, N.J.; WEBER, D.J.; SIMPSON, T.W.; WYSE, A.; BROWN, E.H.P.; DZIKI, J.L.; FISHER, L.E.; BROWN, S.; BADYLAK, S.F. An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. **Sci Transl Med.**, Pittsburgh, v. 6, n. 234, p. 234-58, Apr. 2014.

WOLF, M.T.; DALY, K.A.; REING, J.E.; BADYLAK, S.F. Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. **Biomaterials.**, Pittsburgh, v. 33, n. 10, p. 2916-25, Jan. 2012.

WRONA, E.A.; PENG, R.; BORN, H.; AMIN, M.R.; BRANSKI, R.C.; FREYTES, D.O. Derivation and characterization of porcine vocal fold extracellular matrix scaffold. **Laryngoscope.**, Massachusetts, v. 126, n. 4, p. 928-35, Aug. 2016.

WU, X.; CORONA, B.T.; CHEN, X.; WALTERS, T.J. A standardized rat model of volumetric muscle loss injury for the development of tissue engineering therapies. **BioRes Open Access.**, Texas, v. 1, n. 6, p. 280-90, Dec. 2012.

YE, X.; WANG, H.; GONG, W.; LI, S.; LI, H.; WANG, Z.; ZHAO, Q. Impact of decellularization on porcine myocardium as scaffold for tissue engineered heart tissue. **J Mater Sci Mater Med.**, China, v. 27, n. 4, p. 70, Feb. 2016.

YIN, Z.; CHEN, X.; ZHU, T.; HU, J.J.; SONG, H.X.; SHEN, W.L.; JIANG, L.Y.; HENG, B.C.; JI, J.F.; OUYANG, W.H. The effect of decellularized matrices on human tendon stem/progenitor cell differentiation and tendon repair. **Acta Biomater.**, China, v. 9, n. 12, p. 9317-29, Jul. 2013.

ZHANG, J.; HU, Z.Q.; TURNER, N.J.; TENG, S.F.; CHENG, W.Y.; ZHOU, H.Y.; ZHANG, L.; HU, W.H.; WANG, Q.; BADYLAK, S.F. Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template. **Biomaterials.**, China, v. 89, p. 114-26, Feb. 2016.

*Capítulo 4: Biocompatibilidad de Matrices
Extracelulares Descelularizadas*

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE MATRIZES ACELULARES IMPLANTADAS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS MURINOS

RESUMO

Biomateriais produzidos a partir da matriz extracelular descelularizada (dMEC) têm sido considerados como opção terapêutica para diversas injúrias musculares e a placenta representa uma fonte alternativa de biomaterial natural, devido a abundante estrutura microvascular, propriedades imunorregulatórias e produção de fatores de crescimento. Este estudo objetivou avaliar a biocompatibilidade da dMEC de músculo murino e placenta canina quando implantados em músculo esquelético murinos. As dMEC foram produzidas a partir da placenta canina (1% SDS, 5 mM EDTA + 0,05% Tripsina, 1% Triton X-100) e do músculo esquelético tibial de ratos *Wistar* (Congelação a -20°C, 1% SDS, 5 mM EDTA + 50mM Tris, 1% Triton X-100) e implantadas na região média do músculo tibial, após incisão e divulsão. Um grupo cirúrgico, sem o implante, foi usado como um controle. Os animais foram eutanasiados depois de 3, 15 e 45 dias. Análise histológica e imunohistoquímica foram realizadas para avaliar a morfologia tecidual e a presença de infiltrado celular (CD163 e PCNA). No 3º dia após a implantação, uma intensa reação inflamatória (CD163⁺) e proliferação celular (PCNA⁺) foram observadas, adjacentes ao biomaterial, em ambas as matrizes. No 15º dia, o biomaterial de MEC placentária ainda preservou o infiltrado celular (CD163⁺ e PCNA⁺) e iniciou o processo de absorção do biomaterial, enquanto que a dMEC do músculo já estava completamente absorvida. Finalmente, depois dos 45 dias, ambos os biomateriais foram absorvidos e o músculo estava completamente cicatrizado, sem fibrose. Conclui-se que dMEC xenogênicas e alogênicas foram reabsorvidas e apresentaram processo de integração distinta em modelo não-crítico de lesão muscular esquelética.

Palavras-chave: Descelularização, biomaterial, músculo esquelético, modelo animal, regeneração.

1. INTRODUÇÃO

A perda muscular volumétrica (*Volumetric muscle loss- VML*) é causada por trauma e excisão de tumor, resultando em perda da estrutura e função do tecido musculoesquelético devido à formação irreversível de fibrose em consequência de uma extensa perda de massa muscular; nestes casos, a população de células tronco musculares, células satélites (CS), e outros tipos celulares residentes no músculo que sustentam as CS, ou seja, progenitores fibro-adipogênicos (FAPs), macrófagos e células endoteliais, apesar da alta capacidade regenerativa, falham na regeneração estrutural e funcional do órgão (QUARTA et al., 2017).

Os tratamentos disponíveis para VML restringem-se ao debridamento do tecido fibrótico, transposição de músculo (*flap*) ou enxerto autólogo no local da lesão, porém apesar destas terapias tradicionais terem algum resultado benéfico, ainda apresentam limitações, devido à alta morbidade no local doador e indisponibilidade de tecido para ser enxertado em regiões extensas, além disso, apresentam resultados clínicos e estéticos deficientes (VANDUNSEN et al., 2014; GARG et al., 2015).

Neste contexto, a bioengenharia de tecidos visa estabelecer a substituição ou regeneração de tecidos e órgãos lesionados, com o intuito de restaurar a funcionalidade do órgão, utilizando-se, para isto, biomateriais, sintéticos ou naturais, os quais promovem microambiente estrutural, bioquímico e biomecânico favorável à sobrevivência celular e desenvolvimento tecidual (GILPIN; YANG, 2017). Recentemente, tem-se destacado o uso de biomateriais naturais na cirurgia reconstrutiva, como matrizes extracelulares (MEC), devido à natureza bioquímica semelhante ao tecido de origem, sendo composta por uma complexa rede estrutural de proteínas, tais como colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, e outras moléculas associadas, como os fatores de crescimento (ZHANG et al., 2016).

Estas matrizes são provenientes da descellularização de tecidos e órgãos, na qual objetiva-se eliminar as células e o conteúdo nuclear, preservando, ao mesmo tempo, as características estruturais, bioquímicas e biomecânicas da MEC (GILPIN; YANG, 2017). Assim, diversas MEC descellularizadas têm sido desenvolvidas para reestruturar tecidos e órgãos, tais como cartilagem, pele, osso, bexiga, vasos sanguíneos, rim, coração, fígado e pulmão (SONG; OTT, 2011), em

variadas adversidades clínicas, como em reparação de hérnia (HOPE et al., 2012), úlceras diabéticas (LULLOVE, 2012), reconstrução mamária (MOFID; MEININGER; LACEY, 2012), dentre outras.

Neste contexto, a placenta representa uma fonte alternativa de biomaterial biológico para transplantes de células e tecidos, devido à abundante estrutura microvascular do parênquima, rica composição estrutural e proteica da MEC, presença de antioxidantes e fatores de crescimento, propriedades imunorregulatórias e, além disso, apresenta fácil disponibilidade de obtenção, por ser tecido de descarte após o parto (CHOI et al., 2013). Assim, a MEC de placenta acelular humana já vem sendo estudada como biomaterial promissor para reparação tecidual (HOPPER et al., 2003; KAKABADZE; KAKABADZE, 2015), como já registrado na formação de tecido adiposo (FLYNN; SEMPLE; WOODHOUSE, 2006) e na cicatrização de feridas (CHOI et al., 2013). Porém, apesar do avanço no estudo da matriz placentária, novos conhecimentos necessitam ser elucidados, especialmente, quanto aos efeitos terapêuticos do órgão para a sua utilização na medicina regenerativa (KANG et al., 2007).

O mecanismo de regeneração da VML após implantação de MEC descelularizada alogênica ou xenogênica pode ser explicada pelo recrutamento de células tronco, células progenitoras endógenas e células neurogênicas para o interior do biomaterial, degradação da MEC implantada por células do hospedeiro, modulação da resposta imune inata, além de prover estrutura física e sinalização para moléculas bioativas; assim, a MEC proporciona ambiente favorável à proliferação e diferenciação das células do hospedeiro para as linhagens celulares tecido-específicas, estimulando, assim, a regeneração tecidual endógena (KO, et al., 2013; DZIKI et al., 2016).

No infiltrado celular, encontram-se, também, macrófagos, os quais desempenham importante função na resposta inflamatória após a implantação do biomaterial, modulando o processo de remodelação do tecido (BADYLAK et al., 2008). Assim, são descritos macrófagos pró-inflamatórios ou M1, os quais estão relacionados com a inflamação crônica e rejeição imune, ocorrendo em dias a semanas após a implantação, tornando o biomaterial inerte, o qual, então, é encapsulado por tecido fibrótico, inibindo a degradação da MEC implantada; e macrófagos anti-inflamatórios ou M2, responsáveis pela imunomodulação, degradação do biomaterial e remodelação tecidual, caracterizada pela

neovascularização e migração, organização e diferenciação de novas células do hospedeiro (BADYLAK, 2004; KEANE et al., 2012; KO, et al., 2013).

Xenotransplantes de MECs descelularizadas têm sido utilizadas na bioengenharia de tecidos, estimulando um microambiente de remodelação tecidual a partir da angiogênese, recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação de células tronco/ progenitoras do hospedeiro no biomaterial, resultando na degradação desta matriz (BADYLAK, 2004).

Sendo assim, hipotetizamos que MEC descelularizada xenóloga de placenta canina pode ser um biomaterial biocompatível, podendo, portanto, ser utilizado na bioengenharia de tecidos. Objetivou-se, assim, avaliar a biocompatibilidade da MEC descelularizada de placenta canina após a implantação em modelo murino de lesão muscular, comparando com a MEC descelularizada de músculo esquelético murino (Figura 10).

Figura 10: Plano de estudo esquemático

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Fragmentos de placenta canina e músculo tibial murino **(A)** foram descelularizados sob agitação e imersão **(B)** para a produção de biomateriais acelulares derivados de matriz extracelular (MEC) **(C)**. Finalmente, estes biomateriais foram implantados em modelo murino de lesão muscular para avaliação da biocompatibilidade *in vivo* destas MEC descelularizadas após 3, 15 e 45 dias **(D)**.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS TECIDOS

Foram utilizados músculos tibiais bilaterais de 13 ratos da linhagem *Wistar*, machos, pesando 350 gramas e 3 meses de idade, provenientes do Instituto Butantã (São Paulo/ SP). As placentas foram obtidas de cadela prenhe (n=1) procedente de campanha de ovariossalpingohisterectomia (OSH) realizada no município de Embu das Artes/ SP. A idade gestacional, em torno de 60 dias, foi definida a partir das características externas do feto e da mensuração do *crown-rump* (CR), definido pela medida da distância entre o ponto mais alto da cabeça do feto até a base da cauda (EVANS; SACK, 1973). Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantã (CEUA n° 2989051015) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA n° 9553300114).

No laboratório, amostras de tecido muscular foram dissecadas, removendo-se a fáscia e tendão do músculo tibial, mantendo-se comprimento e largura íntegros, ou seja, aproximadamente 2,0 cm x 1,5 cm, respectivamente, e espessura de 0,4 cm. O tecido foi lavado em água corrente e, posteriormente, em solução salina fosfatada (PBS) 1x + 0.5% antibiótico (ATB): penicillina e estreptomicina (LGC Biotecnologia; Brasil), 3x de 5 minutos sob agitação em shaker (Biomixer; TS-2000A VDRL Shaker). As amostras foram congeladas a -20°C previamente ao início da descelularização.

Placentas no final de gestação, aproximadamente 60 dias (*Crown Rump* fetal= 21 cm), foram canuladas com catéter 18G e perfundidas abundantemente com água corrente para a remoção de sangue. Posteriormente, a área de hematoma lateral e a porção materna da placenta foram removidas e, então, a porção fetal foi fragmentada no tamanho de 2,0 cm de comprimento x 2,0 cm de largura, sendo a espessura mantida intacta (0,5 cm). Em seguida, os fragmentos foram lavados 3x em PBS 1x por 10 minutos sob agitação à temperatura ambiente e, então, submetidas à descelularização, conforme previamente descrito (LEONEL et al., 2017).

2.2. DESCELULARIZAÇÃO DOS TECIDOS

2.2.1. Descelularização do Músculo Esquelético Murino

Para a descelularização de músculo esquelético murino, utilizaram-se métodos físicos e químicos, com base na congelação do tecido e associação de detergentes iônicos, não iônicos e sais, respectivamente.

Assim, amostras de músculo esquelético foram congeladas a -20°C durante 4 dias (método físico), sendo descongeladas em PBS 1x + 0,5% ATB durante 20 minutos em agitação e, então, incubadas em volume de 25 ml de solução de descelularização (método químico): 1% Dodecilsulfato de sódio (SDS; LGC Biotecnologia; Brasil) por 4 dias, lavagem em PBS 1x (3x de 5 min), seguido por 5mM Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; LGC Biotecnologia; Brasil) associado à 50 mM Tris (LGC Biotecnologia; Brasil) + 0,5% ATB, nova lavagem em PBS 1x (3x de 5 min) e, finalmente, 1% Triton X-100 (LGC Biotecnologia; Brasil) + 0,5% ATB. As soluções de descelularização foram trocadas 2x ao dia, permanecendo diariamente em imersão e agitação, à temperatura ambiente, durante 10 horas, sendo, então, mantidas *overnight* a 4°C, sem agitação.

Finalmente, as amostras foram lavadas em PBS 1X+ 1% ATB estéril (3x de 20 min), sob fluxo laminar, esterilizado com álcool 70% (Synth, Brasil; 3x de 30 min), novamente lavadas em PBS 1X + 1% ATB estéril (3x de 20 min) e exposta à luz ultravioleta por 1 hora. A seguir, algumas amostras descelularizadas de músculo foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% para análise histológica (n= 4), enquanto outras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% para microscopia eletrônica de varredura (MEV; n= 2). Outras amostras foram incubadas em solução *Optimal cutting temperature* (O.C.T.) e congeladas a -150°C para análise de núcleos remanescentes (DAPI, n=2) e, também, criopreservadas a -150°C até o momento da implantação *in vivo* (n= 18).

2.2.2. Descelularização da Placenta Canina

Para a descelularização da placenta canina, utilizaram-se métodos químicos e enzimáticos, de acordo com o protocolo descrito por Leonel et al. (2017).

Resumidamente, as amostras de placenta foram submetidas à descelularização pelo método de agitação e imersão em volume de 25 ml de solução de descelularização, sendo incubadas em 1% SDS durante 5 dias (meio químico), seguida por 3 lavagens de 5 minutos em PBS 1x + 0,5% ATB, incubação em 5mM EDTA + 0,05% de Tripsina (LGC Biotecnologia; Brasil) + 0,5% ATB (meio químico e enzimático) durante 2 dias, nova lavagem em PBS 1x + 0,5% ATB (3x de 5 min) e, finalmente, incubação em 1% Triton X-100 durante 2 dias (meio químico). Como descrito anteriormente para o músculo esquelético, as soluções de descelularização das amostras de placenta foram trocadas 2x ao dia, mantendo-se em agitação diária por 10 horas à temperatura ambiente e, posteriormente, mantidas a 4°C *overnight*, sem agitação.

Ao final do processo, realizou-se a lavagem final das amostras para a remoção de resquícios das soluções de descelularização e limpeza do biomaterial com 3 lavagens de 20 minutos em PBS 1x + 1% ATB estéril (3x de 20 min), seguido por esterilização em álcool 70% (3x de 30 min), nova lavagem em PBS 1x + 0,5% ATB (3x de 20 min) e, finalmente, exposição à luz ultravioleta durante 1 hora. Como também descrito para as amostras de músculo esquelético, algumas amostras de placenta descelularizadas foram fixadas em PFA 4% para análise histológica (n= 4) e em glutaraldeído 2,5% para MEV (n= 2). Outras foram congeladas incubadas em solução O.C.T. e congeladas a -150°C para análise de núcleos remanescentes (DAPI, n= 2) e, também, criopreservadas a -150°C até o momento da implantação *in vivo* (n= 18).

2.2.3. Análise Macroscópica

Após a descelularização, as amostras de músculo esquelético murino e placenta canina foram analisadas macroscopicamente quanto à morfologia, consistência e coloração dos tecidos, comparando com os respectivos tecidos nativos.

2.2.4. Análise Histológica

Amostras de tecido nativo e descelularizado de músculo murino (n= 4) e placenta canina (n= 4) foram fixados em PFA 4% por 2 dias. Posteriormente, realizou-se incubação em álcool 70% overnight, desidratação gradual em etanol 80%, 90%, 95%, 100% e 100% (30 min, cada; Synth, Brasil), incubação em Xilol (2x de 30 min; Dinâmica, Brasil) e inclusão em parafina (ERV-PLAST, EasyPath, Brasil) por 3h. Foram realizados cortes de 5 µm em micrótomo (Leica RM 2125RT; Alemanha); desparafinização das lâminas em estufa a 37°C, seguida por Xilol (2x de 15 min); hidratação crescente em etanol (100%, 100%, 95%, 70%; 3 min, cada) e água corrente (10 min). Em seguida, realizou-se coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), para avaliar a presença de remanescentes celulares, e Tricrômio de Masson, para avaliar a presença e organização de fibras colágenas na matriz extracelular (MEC). Os cortes foram analisados em microscópio de luz em objetiva de 50x (Nikon 80i; Japão).

Resumidamente, para a coloração de H&E, as lâminas foram incubadas 5 min em hematoxilina (EasyPath, Brasil), 10 min em água corrente, 30 seg em eosina (Dinâmica, 30 seconds; Brazil), seguida por desidratação em álcool 95%, 100% e 100%, incubação em Xilol (2x de 3 min) e montagem em Permount (Fisher Scientific; U.S.A.).

Para a coloração de Tricrômio de Masson, realizou-se incubação inicial durante 4 min em hematoxilina (EasyPath, Brasil), 5 min em água corrente, seguida por incubação durante 10 min em Solução A (1g fucsina ácida, Dinâmica, Brasil; 1 ml ácido acético dinâmica, Brasil; diluição em 100 ml de água destilada), banho em

água (3x), 15 min em Solução B (1g ácido fosfomolibdico, Dinâmica, Brasil; diluição em 100 ml de água destilada), banho em água (2x), 15 min em Solução C (2,5g azul de anilina, Vetec, Brazil; 2,5 ml de ácido acético; diluição em 100 ml de água destilada), banho em água (3x), 5 min em ácido acético e, finalmente, banho em água (2x), desidratação em álcool 95%, 100% e 100%, incubação em Xilol (2x de 3 min) e montagem em Permount (Fisher Scientific; U.S.A.).

2.2.5. Marcação Nuclear com 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

Para avaliação da presença de núcleos remanescentes após o processo de descélularização, as matrizes de músculo esquelético e placenta foram incubadas em solução *Optimal Cutting Temperature* (O.C.T.; Sakura) e congeladas a -150°C. Foram realizados cortes congelados de 10µm em criostato (Leica) e, em seguida, as lâminas foram fixadas em acetona fria durante 10 minutos a 4°C, lavadas em PBS 1x (3x), incubadas em DAPI durante 5 minutos, lavadas novamente em PBS 1x (3x) e montadas. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio confocal.

2.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi realizada para avaliar a estrutura tridimensional (3D) de amostras de músculo murino (n= 2) e placenta canina (n= 2) antes e após a descélularização. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% durante 2 dias, lavadas em água destilada (5x de 5 min) e incubadas em etanol 70% *overnight*. A seguir, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (80%, 90% e 100%; 2x de 5 min, cada), secadas em aparelho de ponto crítico com CO₂ (Leica EM CDP300, Alemanha), metalizadas em ouro (Emitech K550, Inglaterra) e leitura em microscópio de varredura (Leo 435 VP, Inglaterra).

2.3. IMPLANTAÇÃO *IN VIVO* DAS MATRIZES DESCELULARIZADAS

O teste *in vivo* teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade das matrizes acelulares de placenta canina (transplante xenogênico, ou seja, entre indivíduos de espécies diferentes) e músculo esquelético murino (transplante alogênico, ou seja, entre indivíduos geneticamente diferentes, porém da mesma espécie) implantadas em músculos tibiais de ratos da linhagem *Wistar* (n= 54).

2.3.1. Grupos Experimentais e Procedimento Cirúrgico

Os animais foram divididos em 4 grupos distintos: *Grupo Sham*: animais que foram submetidos à incisão cutânea e fáscia muscular; *Grupo Controle*: animais que foram submetidos ao procedimento de incisão e divulsão no músculo, no entanto, não receberam tratamento com biomaterial, sendo ambos os grupos analisados após 3 (n= 3), 15 (n= 3), e 45 (n= 3) dias após a lesão. *Grupo Músculo*: animais que receberam biomaterial de MEC decelularizada de músculo murino; *Grupo Placenta*: animais que receberam biomaterial de MEC decelularizada da placenta canina, sendo ambos os grupos analisados após 3 (n= 6), 15 (n= 6), e 45 (n= 6) dias após a implantação do biomaterial. (Tabela 2).

Tabela 2: Grupos experimentais do teste *in vivo* (implantação de matrizes descelularizadas de músculo esquelético murino e placenta canina em modelo murino).

GRUPOS	3 dias (n)	15 dias (n)	45 dias (n)	Total
SHAM	3	3	3	9
CONTROLE	3	3	3	9
PLACENTA	6	6	6	18
MÚSCULO	6	6	6	18
				54

Fonte: MIRANDA, 2017

Os animais foram conduzidos ao centro cirúrgico do biotério do Instituto Butantan, preparados assepticamente e anestesiados com Quetamina (80-100mg/kg/ Intraperitoneal) e Xilazina (5-10mg/kg/ Intraperitoneal), diluídos em solução salina a 1:1:3 (v/v/v). Para induzir a lesão muscular, realizou-se incisão na pele e fáscia muscular, seguida por incisão longitudinal de 1 cm na região média do músculo tibial e divulsão, sem atingir a região contralateral do músculo, criando-se uma “bolsa” (*pocket*) onde foram implantadas as matrizes extracelulares descelularizadas de músculo murino e placenta canina apresentando, ambos, 1cm de comprimento e 0,5 cm de largura. Ressalta-se que a orientação da implantação do biomaterial acelular de músculo foi no sentido longitudinal, obedecendo ao sentido das fibras musculares do músculo nativo (Figura 11).

Posteriormente, a fáscia muscular e a pele foram suturadas com pontos simples, utilizando-se nylon 5-0. No pós-operatório imediato, os animais foram mantidos isolados e a analgesia foi realizada com paracetamol (1-2 mg/ml) por via oral, a cada 12 horas, durante dois dias. Água e comida foram fornecidas normalmente, sem restrições.

Figura 11: Indução de lesão muscular em músculo tibial cranial de ratos *Wistar*.

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Indução de lesão muscular em modelo murino (linhagem *Wistar*). **(A)** incisão longitudinal de 1 cm e divulsão em músculo tibial cranial; **(B)** Grupo Controle: animais que não receberam a implantação do biomaterial após a indução da lesão muscular; **(C)** Grupo Sham: animais onde foi realizada incisão apenas na fáscia; **(D)** Grupo Músculo: animais que receberam implantação de biomaterial acelular de tecido muscular após lesão; **(E)** Grupo Placenta: animais que receberam implantação de biomaterial acelular de tecido placentário após lesão.

2.3.2. Análise Histológica

Os animais foram eutanasiados 3, 15 e 45 dias após a implantação das matrizes acelulares de músculo murino e placenta canina para avaliação do processo inflamatório e do *homing* celular. Os músculos tibiais, onde as matrizes foram implantadas, foram dissecados, coletados e fixados em PFA 4% por 2 dias. Seguiu-se com incubação em etanol 70% *overnight*, desidratação em etanol 80%, 90%, 95%, 100% e 100% (1h e 20 min, cada), incubação em Xilol (2x de 1h e 20 min) e inclusão em parafina *overnight*. Realizaram-se cortes de 5 µm e colorações de Hematoxilina e Eosina, para avaliação da morfologia tecidual e presença de infiltrado celular, e Tricrômio de Masson, para avaliação de deposição de colágeno.

2.3.3. Análise Imunohistoquímica

A análise de imunohistoquímica (IHC) foi realizada para caracterizar os macrófagos responsáveis pelo processo de remodelação tecidual (CD163) e avaliar a proliferação celular (PCNA), aos 3, 15 e 45 dias de pós-operatório, nos animais do Grupo Controle, Grupo Músculo e Grupo Placenta.

Os músculos tibiais foram fixados em PFA 4% durante 2 dias, desidratados em série crescente de etanol e embebidos em parafina, como descrito previamente para análise histológica. Após desparafinar os tecidos em estufa a 37°C, foi realizada a recuperação antigênica em solução Biogen 3:1 (citrato) em panela de pressão (Elite) a 120°C durante 4 minutos, seguida por bloqueio da atividade da peroxidase endógena durante 30 min a temperatura ambiente, com 3% de H₂O₂, diluída em água destilada; lavagem em tampão TBS 1x (2x) e incubação durante 30 min a temperatura ambiente em solução de bloqueio de proteínas, contendo 10% de soro de cabra, diluída em tampão TBS 1x a temperatura ambiente. Finalmente, os tecidos foram incubados em anticorpo primário anti-CD163 (1:200, Rabbit monoclonal, ab182422, Abcam, EUA) e anti-PCNA (1:200, Rabbit policlonal, ab18197, Abcam, EUA) a 4°C *overnight*, em câmara úmida.

Posteriormente, os cortes foram lavados (3x de 2min) em solução tampão de TBS 1X + 1% de soro de cabra, sendo incubados durante 30 minutos com o anticorpo secundário Reveal Complement (Biogen), lavados novamente (3x de 2min) em solução de TBS 1X + 1% de soro de cabra, incubação com Reveal HRP (Biogen), durante 30 min e, finalmente, lavagem (3x de 2min) em solução de TBS 1X + 1% de soro de cabra. A marcação positiva foi visualizada usando um substrato diaminobenzidine (DAB, Biogen); a ação do DAB foi interrompida em água destilada, seguida por contra-coloração com hematoxilina (25 seg), banho em água (2x), desidratação em série de etanol (95%, 100%) e montagem em Permount. Ambos os anticorpos foram comparados com o controle negativo, o qual foi utilizado TBS 1x + 1% de soro de cabra ao invés do anticorpo primário para determinar a presença de ligações inespecíficas.

A análise quantitativa da IHC realizada para detectar células CD163⁺ e PCNA⁺ nas amostras de músculo após a lesão e implantação do biomaterial, foi realizada de acordo com o sistema de escore validado por Varghese et al. (2014), nomeado *IHC Profiler*, o qual é compatível com o *software* ImageJ. Este método quantitativo da IHC é levado a cabo a partir da deconvolução de cores e o perfil de pixel computadorizado, atribuindo-se uma pontuação automática às imagens respectivas, considerando-se alto positivo, médio positivo, baixo positivo e negativo, e diferenciando-se o tipo de expressão do anticorpo como nuclear ou citoplasmático.

Resumidamente, realizou-se a IHC para os anticorpos CD163 e PCNA, como já descrito, após 3, 15 e 45 dias nos músculos dos animais do grupo Controle (n= 3/dia. Total= 9), Grupo Músculo (n=4/dia. Total= 12) e Grupo Placenta (n=4/dia. Total= 12). Em seguida, foram capturados, de cada animal, imagens microscópicas de 6 campos diferentes, ao longo de toda a região da lesão, que receberam ou não a implantação das matrizes em microscópio de luz (Nikon 80i; Japão), em objetiva de 20x. As imagens foram, então, analisadas no ImageJ com o *IHC Profiler*, conforme a expressão nuclear ou citoplasmática do anticorpo, totalizando 198 imagens para o anticorpo PCNA e 198 para o anticorpo CD163.

Os valores gerados pela classificação da pontuação dos pixels (alto, médio e baixo positivos e negativo) foram exportados para o Excel para a obtenção da média das 6 imagens capturadas de cada animal. Em seguida, os valores foram analisados no programa estatístico SAS.

2.3.4. Análise Estatística

Os resultados da presença de células CD163⁺ e PCNA⁺ nas amostras de músculo esquelético de animais com ou sem a implantação das matrizes descelularizadas foram analisados pela *GLM Procedure* (efeito anticorpo e grupo experimental), usando o programa estatístico SAS. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1. DESCELULARIZAÇÃO DOS TECIDOS

Para avaliação da eficiência do processo de descelularização dos tecidos, alguns principais parâmetros foram avaliados, tais como o aspecto gelatinoso e coloração translúcida do tecido muscular e placenta canina (análise macroscópica), presença de núcleos remanescentes e citoplasma (análise histológica) e preservação da ultraestrutura tridimensional da matriz (microscopia eletrônica de varredura- MEV).

3.1.1. Descelularização do Músculo Esquelético Murino

O músculo esquelético murino foi descelularizado de acordo com protocolo previamente testado em nosso laboratório, utilizando-se o método físico (congelamento do tecido a -20°C) e método químico (1% SDS, 5mM EDTA + 50 mM Tris, 1% Triton X-100).

Na análise macroscópica (Figura 12A), as amostras apresentaram coloração translúcida e consistência gelatinosa, sugerindo remoção celular, a qual foi confirmada posteriormente nas análises histológicas e na MEV. Assim, os resultados demonstraram completa remoção nuclear e eliminação dos feixes musculares (coloração de Hematoxilina & Eosina, Figura 12C), preservando a organização e estrutura das fibras colágenas do tecido conjuntivo do músculo esquelético, endomísio e perimísio, os quais são constituídos principalmente por colágeno I e III (coloração de Tricrômio de Masson- Figura 12E- e MEV- Figura 12I, respectivamente). A ausência de núcleos remanescentes também foi comprovada a partir da marcação com DAPI (Figura 12G).

3.1.2. Descelularização da Placenta Canina

A placenta canina foi descelularizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Leonel et al. (2017), com base em métodos químicos e enzimáticos (1% SDS, 5mM EDTA + 0,05% Tripsina, 1% Triton X-100). Após a descelularização, observou-se a matriz placentária com consistência gelatinosa e coloração mais translúcida, evidenciando-se a preservação da rede vascular (Figura 12B). A análise histológica demonstrou, também, a completa remoção do conteúdo celular (coloração de Hematoxilina & Eosina- Figura 12D) e preservação da organização e do arranjo estrutural das fibras colágenas da MEC (coloração de Tricrômio de Masson- Figura 12F- e MEV- Figura 12J, respectivamente). A ausência de núcleos remanescentes também foi comprovada a partir da marcação com DAPI (Figura 12H).

Figura 12: Descelularização de tecido músculo esquelético e placentário

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Aspecto macroscópico de músculo tibial cranial de rato *Wistar* (A) e placenta canina (B) descelularizado. As análises histológicas (C-F), marcação com DAPI (G-H) e a microscopia eletrônica de varredura- MEV (I-J) demonstraram remoção celular e preservação das fibras colágenas do tecido conjuntivo, tanto dos músculos quanto das placentas. Barra de escala: Macroscopia= 1 cm; Histologia = 50µm; DAPI= 20µm; MEV= 30µm.

3.2. IMPLANTAÇÃO *IN VIVO* DAS MATRIZES DESCELULARIZADAS

As matrizes extracelulares descellularizadas foram implantadas em lesão criada em músculo tibial de ratos *Wistar*, que consistiu em incisão retilínea e longitudinal de 1 cm na região média do músculo e divulsão, criando-se uma “bolsa”, onde as matrizes de músculo esquelético murino (transplante alogênico; n= 18) e placenta canina (transplante xenogênico; n= 18) foram implantadas para avaliação da biocompatibilidade *in vivo*.

Os animais foram analisados clinicamente, sendo monitorados quanto aos sinais de inflamação no membro que recebeu a implantação dos biomateriais, bem como quanto à deambulação. Durante o período de observação, os animais apresentaram comportamento e processos fisiológicos normais, não sendo observada presença de alterações inflamatórias externas no referido membro.

O músculo tibial foi analisado macroscópica, histológica e imunohistoquimicamente aos 3, 15 e 45 dias após a implantação, para a caracterização do infiltrado celular e avaliação do potencial proliferativo das células, bem como a angiogênese e degradação das matrizes acelulares.

3.2.1. Grupos Controle e Sham

Os animais do Grupo Controle (n=3), nos quais foram realizadas incisão de fáscia e divulsão do músculo, observou-se, no 3º dia após a indução da lesão muscular, intensa reação inflamatória na área incisada, como vermelhidão (Figura 13A). No entanto, nos 15 e 45 dias após a lesão, a incisão, inicialmente realizada, estava cicatrizada e com ausência de sinais inflamatórios (Figuras 13F e 13K, respectivamente). Histologicamente, foi comprovada a reação inflamatória no 3º dia pelo intenso infiltrado celular, de caráter basofílico, na área adjacente à incisão e presença de inúmeros vasos sanguíneos, os quais estavam envoltos por células inflamatórias (Figura 13B e 13C), algumas destas células puderam ser identificadas nas análises histológicas pela coloração de H&E, tais como neutrófilos e macrófagos.

Na análise histológica do 15° dia (n=3) após a lesão muscular no Grupo Controle, observou-se presença de infiltrado celular bem menos intenso, comparado com o 3° dia, e vasos sanguíneos adjacentes a este infiltrado, observando-se, também, uma área considerável de deposição de fibras colágenas, visualizada pela coloração de Tricrômio de Masson, sugerindo-se, assim, início de formação de fibrose (Figuras 13G e 13H). Por outro lado, no 45° dia (n= 3) não foi observado infiltrado celular, possivelmente por não se tratar mais da fase aguda da inflamação (Figuras 13L e 13M). Ressalta-se que nos dias 15 e 45 após a lesão muscular houve o aparecimento de infiltração de células adipogênicas, envoltas por vasos sanguíneos, na região média e, também, periférica do músculo, onde antes era observado tecido muscular. A infiltração de tecido adiposo normalmente está relacionada à atrofia no local envolvido; no entanto, a extensão desta atrofia não foi suficiente para comprometer a deambulação do animal até os dias analisados.

Na análise macroscópica no 3° dia (n= 3) do Grupo Sham, os quais receberam incisão na pele e fáscia muscular, observou-se discreta vermelhidão na área de incisão na fáscia muscular; por outro lado, a superfície do músculo estava íntegra e sem sinais de inflamação, como vermelhidão e inchaço (Figura 13D). Nos 15 (n= 3) e 45 (n= 3) dias após o procedimento cirúrgico, observou-se o tecido normal sem alterações adversas (Figuras 13I e 13N, respectivamente). A análise histológica confirmou a ausência de infiltrado inflamatório e fibrose; os tecidos estavam normais nos 3 períodos analisados (3, 15 e 45 dias; Figuras 13E, 13J e 13O, respectivamente).

Figura 13: Indução de lesão muscular em modelo murino

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: No Grupo Controle, observou-se presença de reação inflamatória (rubor) e infiltração celular e de vasos sanguíneos no 3º dia após a lesão (A-C), enquanto que no 15º (F-H) e 45º dia (K-M), observaram-se deposição de colágeno e tecido adiposo, sem alterações nas características macroscópicas. No Grupo Sham, observou-se vermelhidão no local da incisão na fáscia muscular, porém sem alterações inflamatórias na análise histológica do músculo no 3º dia (D,E). No 15º (I,J) e 45º (N,O) dias não foram observadas alterações macro e microscópicas. Asterico (*): infiltrado celular. Seta preta: vasos sanguíneos. Seta amarela: tecido adiposo. Barra de escala: Imagens macroscópicas (1 cm) e microscópicas 20 µm (E), 50 µm (C, G', J, L', M', O) e 100 µm (B, H, L, M).

3.2.2. Grupo Músculo

Nos animais que receberam implantação alogênica de biomaterial descelularizado de músculo esquelético murino (Grupo Músculo), observou-se macroscopicamente, a presença do biomaterial implantado inserido na “bolsa” criada dentro do músculo, estando circundado por intensa reação inflamatória, caracterizada por vermelhidão no local da lesão após 3 dias ($n=6$) da implantação (Figura 14A). Histologicamente, foi comprovada a reação inflamatória pela intensa neovascularização e infiltrado celular, sendo identificada a presença de neutrófilos e macrófagos na coloração de H&E, principalmente dentro do biomaterial implantado e na interface biomaterial-músculo, no entanto, também foi visualizado infiltrado celular nas regiões de tecido muscular adjacentes ao biomaterial (Figuras 14B- 14D).

No 15º dia ($n=6$) após a implantação da MEC descelularizada de músculo (Grupo Músculo), não foi observada reação inflamatória na análise macroscópica, assim, os animais apresentaram o músculo cicatrizado e ausência do biomaterial implantado, sugerindo, assim, a reabsorção da matriz acelular pelo hospedeiro (Figura 14E). Histologicamente, observou-se discreta infiltração de células, situadas de forma dispersa na região média do músculo, possivelmente sugestivo de células com potencial regenerativo, bem como miofibras com disposição e morfologia normais e ausência de deposição anormal de fibras colágenas (Figura 14F-14H). Ressalta-se que dos 6 animais analisados, apenas 1 animal apresentou resquício de biomaterial no interior do músculo ainda não totalmente degradado, sendo visualizado apenas microscopicamente, pois a superfície externa do músculo já estava cicatrizada; histologicamente, observou-se intensa infiltração celular dentro do biomaterial, na interface biomaterial-músculo e nas áreas de tecido muscular adjacentes ao sítio de implantação.

Finalmente, após 45 dias ($n=6$) após a implantação (Grupo Músculo), o músculo estava cicatrizado, apresentando miofibras normais, com núcleos periféricos, e ausência de deposição de colágeno; no entanto, uma pequena área de tecido adiposo foi visualizada em um dos animais (Figuras 14I-14L).

Figura 14: Biocompatibilidade *in vivo* em modelo murino de lesão muscular: implantação de biomaterial acelular de músculo esquelético murino (transplante alogênico).

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: A imagem macroscópica (A) do 3º dia de implantação revela intensa reação inflamatória, como vermelhidão, sendo observada intensa infiltração celular dentro do biomaterial e na interface biomaterial-músculo (B-D). Nos 15º e 45º dias (E-L), observou-se cicatrização da incisão, morfologia normal das miofibras, com discreta celularidade no 15º dia (G) e pequena área de tecido adiposo no 45º dia (L'). Coloração de Hematoxilina & Eosina e Tricrômio de Masson. Seta vermelha: biomaterial descelularizado de músculo murino. Seta preta: infiltrado celular. Círculo amarelo: tecido adiposo. Musc: músculo. End: endomísio. Per: perimísio. Barra de escala Imagens macroscópicas: 1 cm; Imagens histológicas: 50 µm (C, G, L') e 100 µm (B, D, F, H, J, K, L).

3.2.3. Grupo Placenta

Nos animais que receberam implantação xenogênica de biomaterial descelularizado de placenta canina (Grupo Placenta), também foi observada, macroscopicamente, reação inflamatória no local da incisão, como rubor, após 3 dias ($n= 6$) de implantação (Figura 15A), sendo comprovado histologicamente pelo intenso infiltrado celular, também com presença de neutrófilos e macrófagos, identificados pela coloração de H&E, estando localizado dentro do biomaterial, na interface biomaterial-músculo e nas regiões adjacentes ao biomaterial; diversos vasos sanguíneos também foram identificados nessa região (Figura 15B-15D).

No 15º dia ($n= 6$) após a implantação da matriz placentária descelularizada, ainda foi possível observar, macroscopicamente, a presença do biomaterial no local de implantação em 3 animais, sendo que em 2 destes não haviam mais sinais macroscópicos de inflamação (Figura 15E). Histologicamente, observou-se a presença de infiltrado celular dentro do biomaterial, na interface biomaterial-músculo e nas regiões adjacentes, com intensa neovascularização distribuída no sítio de remodelação do biomaterial e discreta área contendo deposição de tecido adiposo na região média do músculo, situada próximo à área de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Figura 15F-15H). Por outro lado, os outros 3 animais avaliados neste mesmo período apresentaram, macroscopicamente, cicatrização da lesão inicialmente criada e reabsorção do biomaterial implantado, sendo demonstrado presença de miofibras normais e discreta celularidade na análise histológica. Finalmente, após 45 dias ($n= 6$), os músculos apresentavam-se morfolologicamente normais, com presença de miofibras normais com núcleos periféricos e ausência de deposição de colágeno (Figura 15I-15L).

Estes resultados sugerem que, apesar de no 15º dia após a implantação da matriz placentária descelularizada, esta ainda ser observada no local implantado em 50% dos animais, não houve rejeição imune e/ou fibrose por parte do hospedeiro, comprovado pela ausência de infiltrado celular e, também, de deposição de colágeno e/ou substituição do tecido muscular por tecido adiposo, havendo, assim, ao final do 45º dia, completa biodegradação do biomaterial. Assim, conclui-se que a placenta canina descelularizada tem potencial para ser utilizada como um biomaterial xenólogo para a regeneração muscular.

Figura 15: Biocompatibilidade *in vivo* em modelo murino de lesão muscular: implantação de biomaterial acelular de placenta canina (transplante xenogênico)

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Imagem macroscópica no 3º dia após a implantação do biomaterial revela sinais de reação inflamatória, como vermelhidão (A); histologicamente, observou-se presença de infiltrado celular no biomaterial e adjacências (B-D). No 15º dia, alguns animais apresentaram presença do biomaterial (E) e infiltrado celular (F-H), sendo observada completa cicatrização, miofibras normais e absorção do biomaterial no 45º dia (I-L). Coloração de Hematoxilina & Eosina e Tricrômio de Masson. Seta vermelha: biomaterial. Seta preta: infiltrado celular. Seta amarela: tecido adiposo. Musc: músculo. End: endomísio. Per: perimísio. Barra de escala Imagens macroscópicas: 1 cm; Imagens histológicas: 50 µm (H') e 100 µm (B-D, F-H, J-L).

3.2.4. Análise imunohistoquímica

A resposta do hospedeiro à indução da lesão muscular (Grupo Controle) e à implantação do biomaterial acelular de músculo esquelético murino (Grupo Músculo) e placenta canina (Grupo Placenta) também foi avaliada por imunohistoquímica (IHC), com o intuito de caracterizar a presença de macrófagos do tipo 2 (M2) (imunomarcção para CD163), os quais são indispensáveis durante o processo de remodelação tecidual após injúria muscular, e células em processo de proliferação (imunomarcção para PCNA), identificadas durante a reorganização e reparação do tecido. Realizou-se, assim, a quantificação das células CD163⁺ e PCNA⁺ em amostras de músculos coletados 3, 15 e 45 dias após a lesão e implantação das matrizes acelulares, avaliando-se diferentes intensidades da reação de IHC (alto positivo, médio positivo, baixo positivo e negativo).

A presença de macrófagos M2 foi detectada pela visualização da reação anticorpo CD163-antígeno a partir da ligação ao anticorpo secundário conjugado a uma enzima (peroxidase), a qual catalisa a reação em uma coloração marrom imunolocalizada no citoplasma.

No 3º dia após a indução da lesão muscular e implantação das dMEC, observou-se presença de células CD163⁺, situadas, principalmente, na interface biomaterial-músculo e regiões adjacentes ao sítio de implantação (Figura 16A, 16E, 16I). No 15º dia após o procedimento, apesar da menor celularidade encontrada na região do músculo próximo à lesão muscular e ao biomaterial em relação ao 3º dia), observou-se células CD163⁺ no Grupo Músculo e em 75% do Grupo Placenta (Figura 16B, 16F, 16J). Finalmente, no 45º dia, os músculos apresentaram presença de miofibras morfolologicamente normais e redução da densidade de infiltrado celular (Figuras 16C, 16G e 16K).

Figura 16: Imunohistoquímica para CD163 em músculo esquelético de modelo murino de lesão muscular:

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Imunolocalização citoplasmática de células CD163+, características de macrófagos tipo 2, situadas próximo ao local de lesão muscular (Controle) e ao sítio de implantação das matrizes acelulares de músculo esquelético murino e placenta canina (Grupo Músculo e Placenta) (A-L). Barra de escala= 50 µm.

A imunohistoquímica foi quantificada a partir do grau de intensidade do pixel, gerando uma pontuação automática às imagens, sendo descritas como alto, médio e baixo positivo e negativo. Assim, a intensidade de células altamente positivas para a reação de IHC com o anticorpo CD163 demonstrou que o Grupo Músculo apresentou no 3º dia após a implantação do biomaterial maior percentual de células altamente positivas ao CD163⁺ em comparação ao Grupo Músculo no 45º dia ($p=0,01$). Analisando-se o 15º dia após a implantação, observou-se que o Grupo Músculo apresentou maior percentual de células CD163⁺ em relação ao Controle ($p=0,004$) e ao Grupo Placenta ($p=0,0007$). Enquanto que no 45º dia, observou-se menor percentual de células CD163⁺ quando comparado com o Grupo Músculo no 15º dia ($p=0,004$).

O Grupo Placenta, por sua vez, apresentou maior percentual de células CD163⁺ no 3º dia, em comparação ao Grupo Placenta no 15º ($p=0,01$) e 45º dias ($p=0,02$) após a implantação do biomaterial (Figura 17A).

Na análise das células com intensidade médio positiva para CD163, observou-se que o Grupo Controle no 3º dia apresentou percentual menor de células médio positivas em comparação ao Controle no 15º ($p=0,004$) e 45º dias ($p=0,03$) após a lesão.

O Grupo Músculo no 3º dia apresentou menor percentual de células médio positivas ao CD163 quando comparado com o Grupo Músculo no 45º dia ($p=0,0005$). No 15º dia após a implantação, o Grupo Músculo apresentou menor percentual de células médio positivas em relação ao Controle no 15º dia ($p=0,0008$) e com o Grupo Músculo no 45º dia ($p=0,0007$).

Quanto ao Grupo Placenta, observou-se que no 3º dia após a implantação houve menor percentual de células médio positivas ao CD163 em comparação ao Grupo Placenta no 45º dia ($p=0,002$). Aos 15 dias após a implantação, observou-se menor percentual de células médio positivas em relação ao Controle no 15º dia ($p=0,04$) e ao Grupo Placenta no 45º dia ($p=0,01$) (Figura 17B).

Na análise das células com intensidade baixo positivo ao CD163, observou-se que o Controle no 3º dia apresentou percentual menor de células baixo positivas em comparação ao Controle no 15º dia ($p=0,004$).

O Grupo Músculo no 3º dia após a implantação apresentou menor percentual de células baixo positivas ao CD163 em relação ao Grupo Músculo no 45º dia ($p=0,0005$). No 15º dia, observou-se que Grupo Músculo apresentou menor

percentual das células baixo positivas em comparação ao Controle no 15° dia ($p=0,004$) e ao Grupo Músculo no 45° dia ($p=0,0004$).

Quanto ao Grupo Placenta, observou-se no 3° dia após a implantação apresentou menor percentual de células baixo positivas ao CD163 em relação ao Grupo Placenta no 45° dia ($p=0,03$). Após 15 dias de implantação, observou-se maior percentual de células baixo positivas em comparação ao Grupo Músculo no mesmo período ($p=0,02$) (Figura 17C)

Finalmente, na análise de células com intensidade negativa na IHC para CD163, observou-se que o Grupo Músculo no 3° dia após a implantação apresentou menor percentual de células negativas ao CD163 em comparação ao Grupo Músculo no 45° dia ($p=0,01$). No 15° dia após a implantação, observou-se menor percentual de células negativas comparado ao Controle no 15° dia ($p=0,006$) e ao Grupo Músculo no 45° dia ($p=0,004$).

Por sua vez, o Grupo Placenta no 3° dia apresentou menor percentual de células negativas ao CD163, comparando-se ao Grupo Placenta no 15° ($p=0,009$) e 45° dias ($p=0,02$). No 15° dia após a implantação, o Grupo Placenta apresentou maior percentual de células negativas em relação ao Grupo Músculo no 15° dia ($p=0,0007$) (Figura 17D).

Figura 17: Gráfico da quantificação da imunohistoquímica para o anticorpo CD163 em amostras de músculo que receberam ou não a implantação de matrizes extracelulares descelularizadas,

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: (A) Na intensidade de células altamente positivas ao CD163, observou-se que os Grupos Músculo e Placenta apresentaram no 3º dia após a implantação maior percentual de células altamente positivas em comparação aos respectivos grupos no 45º dia; (B) Na intensidade de células médio positivas ao CD163, observou-se que os Grupos Músculo e Placenta apresentaram no 3º e 15º dias menor percentual de células médio positivas em comparação aos respectivos grupos no 45º dia; (C) Na intensidade de células baixo positivas ao CD163, observou-se que o Grupo Músculo e Placenta no 3º dia apresentou menor percentual de células baixo positivas em relação ao 45º dia dos respectivos grupos; (D) Na intensidade de células negativas ao CD163, observou-se que no 45º dia dos Grupos Músculo e Placenta apresentou maior percentual de células negativas, comparando-se com o 3º dia dos respectivos grupos.

O valor de significância estatística adotado foi de 5%. Letras maiúsculas nos gráficos significam diferença estatisticamente significativa, considerando-se os grupos experimentais (Controle/ Grupos Músculo e Placenta) em relação aos diferentes períodos (3, 15 e 45 dias). Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do mesmo período analisado.

A presença de células no estágio de proliferação foi detectada pela visualização da reação anticorpo PCNA-antígeno a partir da ligação ao anticorpo secundário conjugado a uma enzima (peroxidase), a qual catalisa a reação em uma coloração marrom imunolocalizada no núcleo.

No 3° dia após a indução da lesão muscular (Grupo Controle), observou-se presença de células PCNA⁺ situadas em regiões próximas à lesão. Nos grupos que receberam a dMEC de músculo murino (Grupo Músculo) e placenta canina (Grupo Placenta), observou-se células PCNA⁺ situadas, principalmente, na interface biomaterial-músculo e em áreas adjacentes; no entanto, algumas células PCNA⁺ também foram detectadas no interior das matrizes implantadas (Figura 18A, 18E e 18I). No 15° dia, apesar da menor celularidade em relação ao 3° dia, observou-se, também, a presença de células PCNA⁺ em 66,6% do Grupo Controle, no Grupo Músculo e em 25% do Grupo Placenta (Figura 17B, 17F e 17J). No 45° dia, não foram observadas células PCNA⁺ no Grupo Controle; no entanto, foram observadas pequenas áreas com células PCNA⁺ em 50% do Grupo Músculo e 25% do Grupo Placenta (Figura 18C, 18G e 18K).

Figura 18: Imunohistoquímica para PCNA em músculo esquelético de modelo murino de lesão muscular:

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: Imunolocalização nuclear de células PCNA⁺, características de células em estágio de proliferação, situadas próximo ao local de lesão muscular (Grupo Controle) e ao sítio de implantação e no interior dos biomateriais de matrix extracelular descelularizada de músculo esquelético murino e placenta canina (Grupo Músculo e Placenta) **(A-L)**.

A intensidade de células altamente positivas para a reação de IHC com o anticorpo PCNA demonstrou que o Grupo Placenta no 3º dia apresentou maior percentual de células altamente positivas ao PCNA em comparação ao Grupo Placenta no 15º ($p = 0,002$) e 45º dias ($p = 0,001$) após a implantação do biomaterial (Figura 19A).

Na análise das células com intensidade médio positivo para PCNA, observou-se que o Grupo Controle no 3º dia apresentou percentual maior de células médio positivas em comparação ao Controle no 15º ($p = 0,01$) e 45º dias ($p = 0,01$).

O Grupo Músculo apresentou menor percentual de células médio positivas ao PCNA em comparação ao Grupo Placenta no 3º dia após a implantação ($p = 0,03$). Por sua vez, o Grupo Placenta apresentou no 3º dia maior percentual de células médio positivas em relação ao Grupo Placenta no 15º ($p = 0,003$) e 45º dias ($p = 0,0005$) (Figura 19B).

Quanto à análise das células com intensidade baixo positivo ao PCNA, observou-se que o Controle no 3º dia apresentou percentual maior de células baixo positivas em comparação ao Controle no 45º dia após a lesão ($p = 0,01$).

O Grupo Músculo no 15º dia após a implantação apresentou maior percentual de células baixo positivo em relação ao Grupo Músculo no 45º dia ($p = 0,01$). Enquanto que no Grupo Placenta, observou-se maior percentual de células baixo positivas no 3º dia, comparando-se ao Grupo Placenta no 15º ($p = 0,02$) e 45º ($p = 0,005$) dias após a implantação (Figura 19C).

Finalmente, na análise de células com intensidade negativa na IHC para PCNA, observou-se que o Grupo Músculo no 45º dia apresentou maior percentual de células negativas ao PCNA em relação ao Grupo Músculo no 3º dia após a implantação ($p = 0,005$). Semelhantemente, observou-se que no Grupo Placenta no 45º dia também havia um percentual maior de células negativas em comparação ao Grupo Placenta no 3º dia ($p = 0,002$) (Figura 19D).

Figura 19: Gráfico da quantificação da imunohistoquímica para o anticorpo PCNA em amostras de músculo que receberam ou não a implantação de matrizes extracelulares descelularizadas

Fonte: MIRANDA, 2017.

Legenda: (A) Na intensidade de células altamente positivas ao PCNA, observou-se que o Grupo Placenta no 3º dia após a implantação apresentou maior percentual de células alto positivas em comparação ao Grupo Placenta no 15º e 45º dias. (B) Na intensidade de células médio positivas ao PCNA, observou-se que o Grupo Músculo apresentou menor percentual de células em relação ao Grupo Placenta no 3º dia. Por sua vez, o Grupo Placenta no 3º dia apresentou maior percentual em relação ao Grupo Placenta no 15º e 45º dias. (C) Na intensidade de células baixo positivo ao PCNA, observou-se que o Grupo Músculo no 15º dia apresentou maior percentual de células em relação ao 45º dia. O Grupo Placenta no 3º dia apresentou maior percentual de células em relação ao Grupo Placenta no 15º e 45º dias. (D) Na intensidade de células negativas ao PCNA, observou-se que os Grupos Músculo e Placenta no 45º dia apresentou maior percentual de células negativas em relação ao 3º dia dos respectivos grupos.

O valor de significância estatística adotado foi de 5%. Letras maiúsculas nos gráficos significam diferença estatisticamente significativa, considerando-se os grupos experimentais (Controle/ Grupos Músculo e Placenta) em relação aos diferentes períodos (3, 15 e 45 dias). Letras minúsculas significam diferença estatística dentro do mesmo período analisado.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou comparar a biocompatibilidade *in vivo* de matrizes extracelulares descelularizadas (dMEC) de placentas caninas e de músculos esqueléticos murinos, em implantação intramuscular. As dMECs têm sido utilizadas em bioengenharia de tecidos devido à rica composição de proteínas estruturais e funcionais da matriz, tais como colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs), glicoproteínas, fatores de crescimento e proteínas matricelulares (periostina, tenascina-X, tenascina-C), influenciando a migração, proliferação e diferenciação celular e modulando a resposta do hospedeiro (BADYLAK, 2004; (MORRIS; KYRIAKIDES, 2014).

Biomateriais biológicos alogênicos têm sido implantados satisfatoriamente em várias condições clínicas, porém, seu uso pode ser limitado pelo baixo número de doadores disponíveis. Por isso, têm-se cada vez mais utilizado biomateriais xenogênicos (COSTA et al., 2017). Estes, entretanto, podem causar reações imunes ainda mais severas que os de origem alogeneica.

A descelularização de tecidos representa uma técnica indispensável para a preparação de MECs para a implantação *in vivo*, pois eliminam o conteúdo celular e componentes imunogênicos do biomaterial, os quais possivelmente causam uma resposta inflamatória pelo hospedeiro, preservando, ao mesmo tempo, a composição e estrutura da MEC (KEANE et al., 2012).

Neste trabalho, as MECs de músculo esquelético murino foram descelularizadas de acordo com o protocolo testado previamente em nosso laboratório, utilizando métodos físicos e químicos (congelamento a -20°C e incubação em 1% SDS, 5 mM EDTA+ 50mM Tris e 1% Triton X-100). Enquanto que a MEC de placenta canina foi descelularizada conforme a metodologia descrita por Leonel et al. (2017), utilizando métodos enzimáticos e químicos (1% SDS, 5 mM EDTA+ 0,05% Tripsina e 1% Triton X-100). Ambas as matrizes obtidas apresentaram aspecto translúcido e gelatinoso, sendo comprovada a ausência de células e a preservação da estrutura tridimensional.

A placenta é um órgão que apresenta diversas propriedades biológicas e rica composição da MEC, destacando-se a produção de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento semelhante à insulina- 1 (IGF-1), fator de crescimento

epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento do fibroblasto- 2 (FGF-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), os quais muitos deles são também requeridos durante o processo de cicatrização e angiogênese (CHOI et al., 2013; MOORE; PANDOLFI; MCFETRIDGE, 2015).

O transplante xenólogo de placenta humana descelularizada foi descrita em feridas cutâneas, resultando na migração de queratinócitos, formação de novas células epiteliais no local da injúria e consequente regeneração da camada mais externa da pele. Neste mesmo estudo, os autores relataram que a matriz placentária sofreu alteração da sua estrutura e consequente degradação em aproximadamente 4 semanas após a implantação, sugerindo que a placenta desempenhou uma função importante na arquitetura da membrana basal e modulação da função celular (CHOI et al., 2013).

Devido às referidas características da placenta e à escassa investigação sobre os efeitos do xenoenxerto de tecido placentário na bioengenharia do tecido muscular, o presente trabalho testou se a dMEC da placenta canina teria um comportamento similar à dMEC de músculos murinos, cuja estrutura física e composição química mais se assemelham ao modelo estudado.

Assim, no 3º dia após a implantação das dMEC de músculo e placenta, observou-se macroscopicamente reação inflamatória natural após injúria tecidual, como rubor nas bordas da ferida cirúrgica, adjacente ao biomaterial implantado, e, histologicamente, presença de infiltrado celular, composto por macrófagos M2 (CD163⁺) e células endogênas em proliferação (PCNA⁺); além disso, foram observados diversos vasos sanguíneos próximos aos biomaterial.

No 15º dia, houve a integração da matriz acelular de músculo esquelético murino no tecido hospedeiro, o qual foi favorecido pelo infiltrado celular, possivelmente composto por células mioprogenitoras e macrófagos responsáveis pela remodelação tecidual (M2), presentes no biomaterial e adjacentes a ele. Enquanto que no mesmo período, a metade dos animais que receberam o biomaterial acelular de placenta canina não havia degradado a matriz implantada, no entanto, observou-se a presença de diversos vasos sanguíneos e intensa infiltração celular, por células CD163⁺ e PCNA⁺ no biomaterial e adjacente a ele, sugerindo um microambiente favorável à remodelação e ausência de rejeição imunológica local a curto prazo. Nos 45 dias após a indução da lesão muscular e implantação das

matrizes descelularizadas, observou-se ausência de células CD163⁺, ambos os biomateriais haviam sido degradados pelo hospedeiro, sugerindo, assim, que apesar da dMEC placentária ter induzido uma remodelação tecidual mais tardia, também foi aceita e reabsorvida, no modelo murino.

A presença de macrófagos no sítio de implantação de biomateriais biológicos tem sido identificada precocemente, em torno de 2 dias após a implantação, e podendo persistir por diversos meses, dependendo do tipo de biomaterial implantado e aplicações clínicas; por outro lado, apesar de ser indispensáveis à remodelação, a resposta intensa ou à longo prazo de macrófagos em áreas de implantação de biomateriais podem estar relacionados com o aparecimento de inflamação crônica, encapsulamento do biomaterial ou formação de cicatriz (SWINEHART; BADYLAK, 2016).

Os macrófagos M2 estão associados à regeneração tecidual, pois estimulam a migração e diferenciação de células progenitoras e participam do processo de degradação da MEC implantada e da resposta de remodelação construtiva; no entanto, o mecanismo pelo qual os biomateriais promovem a expressão de macrófagos M2 ainda não está completamente elucidado (KEANE et al., 2012).

O processo de degradação da MEC é um fenômeno normal para manter a homeostase do tecido, resposta à injúria e processos de desenvolvimento. A biodegração específica de dMECs implantadas é essencial para o processo de remodelação, imunomodulação e recrutamento de células progenitoras (SWINEHART; BADYLAK, 2016). Assim, após uma lesão, as dMECs modulam o microambiente, recrutando células do hospedeiro devido à complexa composição e ultraestrutura das moléculas da matriz, iniciando-se a degradação do biomaterial e, conseqüentemente, liberação de peptídeos a partir de proteínas matricelulares (MORRIS; KYRIAKIDES, 2014) e outras moléculas bioativas como fator de crescimento (*Growth factor- GF*), vesículas extracelulares ligadas à matriz (*matrix-bound vesicles- MBVs*), citocinas e quimiocinas (COSTA et al., 2017), os quais são responsáveis pela modulação das funções celulares e recrutamento de células tronco/ progenitoras endógenas e células endoteliais (CRAPO; SLIVKA; BADYLAK, 2014), além da modulação da resposta imune (BROWN; BADYLAK, 2014), propiciando um ambiente favorável à remodelação tecidual ao invés da formação de tecido fibrótico. Além disso, os biomateriais de MEC estimulam a mitogênese,

quimiotaxia e diferenciação celular tecido-específica durante o processo de regeneração (COSTA et al., 2017).

Desta forma, a técnica de descelularização de tecidos exerce uma importante influência na remoção de conteúdo celular, preservando, ao mesmo tempo, as propriedades biomecânicas, arquitetura e composição da MEC do tecido nativo, enquanto que a manutenção destas propriedades influencia diretamente no processo de remodelação tecidual (GILPIN; YANG, 2017). Após a implantação do biomaterial, o organismo pode responder positiva ou negativamente, incluindo interações sanguíneas (hemólise) e de células tronco, formação de nova MEC, inflamação temporária, cicatrização, formação de tecido de granulação, reação a corpo estranho e estresse oxidativo; assim, o teste de biocompatibilidade dos biomateriais se torna essencial para determinar qualquer efeito tóxico e avaliar as respostas biológicas que podem causar no organismo receptor, sendo as principais a inflamação, cicatrização da ferida e reação imunológica (NAAHIDI et al., 2017).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, matrizes extracelulares acelulares de músculo esquelético murino e placenta canina foram obtidos a partir da técnica de descelularização e sua resposta celular foi testada *in vivo* em implantação intramuscular em murinos. A matriz placentária canina foi integrada no leito receptor, promovendo a migração de células endógenas, neovascularização e formação de novas fibras musculares, permitindo, assim, uma remodelação tecidual. Estes resultados representam a possibilidade de se utilizar placentas como uma nova fonte de matriz extracelular altamente rica funcional e estruturalmente, podendo ser utilizada na regeneração de perdas volumétricas de músculos esqueléticos.

REFERÊNCIAS

BADYLAK, S. F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Transplant Immunology**, Pittsburgh, v. 12, p. 367–377, Apr. 2004.

BADYLAK, S.F; VALENTIN, J.E.; RAVINDRA, A.K.; MCCABE, G.P.; STEWART-AKERS, A.M. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. **Tissue Eng Part A**. Pittsburgh, v. 14, p. 1835–1842, Nov. 2008

BROWN, B.N.; BADYLAK, S.F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. **Transl Res**, Pittsburgh, v. 163, p. 268–285, Apr. 2014
COSTA, A.; NARANJO, J.D.; LONDONO, R.; BADYLAK, S.F. Biologic Scaffolds, **Cold Spring Harb Perspect in Med.**, Pittsburgh, v. 7, Oct. 2017

CHOI, J.S.; KIM, J.D.; YOON, H.S.; CHO, Y.W. Full-Thickness Skin Wound Healing Using Human Placenta-Derived Extracellular Matrix Containing Bioactive Molecules. **Tissue Engineering: Part A**, Ansan, v. 19, n. 3-4, Feb. 2013.

CRAPO, P.M.; TOTTEY, S.; SLIVKA, P.F.; BADYLAK, S.F. Effects of biologic scaffolds on human stem cells and implications for CNS tissue engineering. **Tissue Eng Part A**, Pittsburgh, v. 20, n. 1-2, p. 313– 323, Jan. 2014

DZIKI, J.; BADYLAK, S.; YABROUDI, M.; SICARI, B.; AMBROSIO, F.; STEARNS, K.; TURNER, N.; WYSE, A.; BONINGER, M.L.; BROWN, E.H.P.; RUBIN, J.P. An acellular biologic scaffold treatment for volumetric muscle loss: results of a 13-patient cohort study. **Regenerative Medicine**, Pittsburgh, v.1, 16008, Jul. 2016.

FLYNN, L.; SEMPLE, J. L.; WOODHOUSE, K. A. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. **J Biomed Mater Res**, Toronto, n. 79A, p. 359–369, Feb. 2006

GARG, K.; WARD, C.L.; HURTGEN, B.J.; WILKEN, J.M.; STINNER, D.J.; WENKE, J.C.; OWENS, J.G.; CORONA, B.T. Volumetric muscle loss: persistent functional deficits beyond frank loss of tissue. **J. Orthop. Res.**, Texas, v. 33, 40–46, Jan. 2015.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International.**, Morgantown, v. 2017, Apr. 2017

HOPE, W.W.; GRINER, D.; ADAMS, A.; HOOKS, W.B.; CLANCY, T.V. Use and Indications of Human Acellular Dermis in Ventral Hernia Repair at a Community Hospital. **Plastic Surgery International**, Wilmington, v. 2012, p. 1–5, Sept. 2012.

HOPPER, R.A.; WOODHOUSE, K.; SEMPLE, J.L. Annals of Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane. **Plastic Surgery**. Toronto, v. 51, n. 6, p. 598 – 602, Apr. 2003.

KAKABADZE, A.; KAKABADZE, Z. Prospect of Using Decellularized Human Placenta and Cow Placentome for Creation of New Organs: Targeting the Liver (Part I: Anatomic Study). **Transplantation Proceedings**. Georgia, v. 47 (4), p. 1222-1227, May. 2015.

KANG, S. S.; WOO, S. S.; IM, J.; YANG, J. S.; YUN, C. H.; JU, H. R.; SON, G. C.; MOON, E. Y.; HAN, S. H. Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF-kappaB and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells. **Int Immunopharmacol**, Seoul, n. 7, p. 1488–95, Jul. 2007.

KEANE, T.J.; LONDONO, R.; TURNER, N.J.; BADYLAK, S.F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**., Pittsburgh, v. 33, n. 6, p. 1771-81., Dec. 2012.

KO, I.K.; LEE, S.J.; ATALA, A.; YOO, J.J. In situ tissue regeneration through host stem cell recruitment. **Experimental & Molecular Medicine**, Winston-Salem, v. 45, p. 45-57, Nov. 2013.

LEONEL, L.C.P.C.; MIRANDA, C.M.F.C.; COELHO, T.M.; FERREIRA, G.A.S.; CAÑADA, R.R.; MIGLINO, M.A.; LOBO, S.E. Decellularization of placentas: establishing a protocol. **Braz J Med Biol Res.**, Brazil, v. 51, n. 1, Nov. 2017.

LULLOVE, E. Acellular fetal bovine dermal matrix in the treatment of nonhealing wounds in patients with complex comorbidities. **J Am Podiatr Med Assoc**. v. 102, n. 3, p. 233-9, May. 2012.

MOFID, M. M.; MEININGER, M. S.; LACEY, M. S. Veritas® bovine pericardium for immediate breast reconstruction: A xenograft alternative to acellular dermal matrix products. **European Journal of Plastic Surgery**, California, v. 35, p. 717–722, Jun. 2012.

MOORE, M.C.; PANDOLFI, V.; MCFETRIDGE, P.S. Novel human-derived extracellular matrix induces in vitro and in vivo vascularization and inhibits fibrosis. **Biomaterials**, Gainesville, v. 49, p. 37–46, May. 2015.

MORRIS, A.H.; KYRIAKIDES, T.R. Matricellular proteins and biomaterials. **Matrix Biol.**, New Haven, v. 0, p. 183–191, Jul. 2014.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; LOGAN, M.; WANG, Y.; YUAN, Y.; BAE, H.; DIXON, B.; CHEN, P. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances.**, Ontario, v. 35, p. 530-544, Sept. 2017.

QUARTA, M.; CROMIE, M.; CHACON, R.; BLONIGAN, J.; GARCIA, V.; AKIMENKO, I.; HAMER, M.; PAINE, P.; STOK, M.; SHRAGER, J.B.; RANDO, T.A. Bioengineered constructs combined with exercise enhance stem cell-mediated treatment of volumetric muscle loss. **Nature Communications**, California, v. 8, n.15613, Jun. 2017.

SONG, J. J.; OTT, H. C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. **Trends in molecular medicine**, Massachusetts, v. 17, n. 8, p. 424–32, Aug. 2011.

SWINEHART, I.T.; BADYLAK, S.F. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. **Dev Dyn.**, Pittsburgh, v. 245, n. 3, p. 351–360, Mar. 2016.

VANDUSEN, K.W.; SYVERUD, B.C.; WILLIAMS, M.L.; LEE, J.D.; LARKIN, L.M. Engineered Skeletal Muscle Units for Repair of Volumetric Muscle Loss in the Tibialis Anterior Muscle of a Rat. **Tissue Engineering: Part A.**, Michigan, v.20, n. 21-22, p. 2920-30, Nov. 2014

VARGHESE, F.; BUKHARI, A.B.; MALHOTRA, R.; DE, A. Molecular Functional IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **Plos One**. Navi Mumbai, v. 9, n. 5, p.96801, May. 2014.

ZHANG, J.; HU, Z.Q.; TURNER, N.J.; TENG, S.F.; CHENG, W.Y.; ZHOU, H.Y.; ZHANG, L.; HU, W.H.; WANG, Q.; BADYLAK, S.F. Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template. **Biomaterials.**, China, v. 89, p. 114-26, Feb. 2016.

Capítulo 5: Conclusão Geral e Perspectivas

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVA

O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes protocolos de descelularização de músculo esquelético murino para a produção de biomaterial acelular para ser utilizado na engenharia de tecidos.

Assim, as amostras de músculo previamente congeladas a -20°C e incubadas inicialmente com SDS (1% SDS, 5mM EDTA + 50mM Tris e 1% Triton X-100) apresentaram eficiente descelularização, caracterizada pela ausência de conteúdo nuclear e fibras musculares, eliminação de grande quantidade de fita dupla de DNA, bem como preservação da ultraestrutura tridimensional da matriz extracelular e de sua composição proteica. Portanto, conclui-se que esta matriz acelular, produzida a partir de músculo esquelético, pode ser utilizada como biomaterial para futuras investigações na bioengenharia de tecidos.

O segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade da MEC descelularizada de placenta canina (transplante xenogênico) em modelo murino de injúria muscular, comparando-se com a MEC descelularizada de músculo murino (transplante alogênico).

As matrizes descelularizadas foram produzidas a partir de protocolos previamente estabelecidos por nosso grupo. Os biomateriais de MEC foram implantados intramuscularmente em modelo murino, sendo avaliados 3, 15 e 45 dias após a aplicação.

Ambas as matrizes foram biocompatíveis, apresentando o recrutamento de células do sistema imune, principalmente neutrófilos e macrófagos (CD163⁺), angiogênese, mitogênese (PCNA⁺), degradação completa do biomaterial e cicatrização do tecido muscular. No Grupo Controle (sem implante de MEC) também foram observados infiltrados celulares (CD163⁺ e PCNA⁺), porém observou-se extensas áreas substituídas por tecido adiposo. Desta forma, conclui-se que a MEC descelularizada de placenta canina é biocompatível em modelo de lesão muscular, podendo ser utilizada como uma fonte promissa de biomaterial para a regeneração tecidual.

Como projetos futuros, ressalta-se a importância da recelularização *in vitro* com células-tronco e/ou progenitoras dos biomateriais de MECs descelularizadas, haja visto que os biomateriais podem servir como veículos carreadores das mesmas.

Referências

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, V.; SIU, B.F.; CHAO, H.; HIRSCHI, K.K.; RABORN, E.; JOHNSON, S.A.; TOTTEY, S.; HURLEY, K.B.; MEDBERRY, C.J.; BADYLAK, S.F. Partial characterization of the Sox2+ cell population in an adult murine model of digit amputation. **Tissue engineering. Part A.**, Pittsburgh, v. 18, n. 13-14, p. 1454–1463, Jul. 2012.

AIMOLI, C. G.; NOGUIERA, G. M.; NASCIMENTO, L. S.; BACETI, A.; LEIRNER, A. A.; MAIZATO, M. J.; HIGA, O. Z.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N.; BEPPU, M. M. Lyophilized bovine pericardium treated with a phenethylaminediepoxy as an alternative to preventing calcification of cardiovascular bioprosthesis: preliminary calcification results. **Artif Organs**, Brazil, n. 31(4), p. 278-3, Apr. 2007.

BADYLAK, S. F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Transplant Immunology**, Pittsburgh, v. 12, p. 367–377, Apr. 2004.

BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. **Biomaterials**, Pittsburgh, v. 28, p. 3587–3593, Apr. 2007

BRANDAN, E.; INESTROSA, N.C. Isolation of the heparan sulfate proteoglycans from the extracellular matrix of rat skeletal muscle. **J Neurobiol.** v. 18, p. 271–282, May. 1987.

CALVE, S.; ODELBURG, S.J., SIMON, H-G. A transitional extracellular matrix instructs cell behavior during muscle regeneration. **Dev Biol.**, Chicago, v. 344, n. 1, p.259–271, Aug. 2010.

CRAPO, P.M.; GILBERT, T.W.; BADYLAK, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**. Pittsburgh, v. 32, p. 3233–43, Apr. 2011.

CHEN, C. P.; APLIN, J. D. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition placental fibroblasts and the effect of oxygen. **Placenta**, Taiwan, v. 24, n. 4, Apr. 2003.

CHEN, X.K.; WALTERS, T.J. Muscle-derived decellularised extracellular matrix improves functional recovery in a rat latissimus dorsi muscle defect model. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery.**, San Antonio, v. 66, n. 12, p. 1750–1758, Dec. 2013.

CHOI, J.S.; KIM, J.D.; YOON, H.S.; CHO, Y.W. Full-Thickness Skin Wound Healing Using Human Placenta-Derived Extracellular Matrix Containing Bioactive Molecules. **Tissue Engineering: Part A**, Ansan, v. 19, n. 3 e 4, Feb. 2013.

CLARK, J. N.; OGLE, M. F.; ASHWORTH, P.; BIANCO, R. W.; LEVY, R. J. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve cusp and aortic wall with ethanol and aluminium chloride. **Ann Thorac Surg**, Minneapolis, v. 79, n. 3, p. 897-904, Mar. 2005.

CONCONI, M. T.; DE COPPI, P.; BELLINI, S.; ZARA, G.; SABATTI, M.; MARZARO, M.; ZANON, G. F.; GAMBA, P. G.; PARNIGOTTO, P. P.; NUSSDORFER, G. G. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. **Biomaterials**, Padova, n. 26, p. 2567-2574, Sept. 2005.

COSTA, A.; NARANJO, J.D.; LONDONO, R.; BADYLAK, S.F. Biologic Scaffolds, **Cold Spring Harb Perspect in Med.**, Pittsburgh, v. 7, Oct. 2017

EL-SABBAN, M. E.; EL-KHOURY, H.; HAMDAN-KHALIL, R.; SINDER-PEDERSEN, S.; BAZARBACHI, A. Xenogenic bone matrix extracts induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Regen Med**, Beirut, v 2, n. 4, p. 383-90, Jul. 2007.

FLYNN, L.; SEMPLER, J. L.; WOODHOUSE, K. A. Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. **J Biomed Mater Res**, Toronto, n. 79A, p. 359–369, Feb. 2006

FUNAMOTO, S.; NAM, K.; KIMURA, T.; MURAKOSHI, A.; HASHIMOTO, Y.; NIWAYA, K.; KITAMURA, S.; FUJISATO, T.; KISHIDA, A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularized blood vessels. **Biomaterials**, Tokyo, v. 31, n. 13, p. 3590-5, Feb. 2010.

GILBERT, T.W.; SELLARO, T.L.; BADYLAK, S.F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**. Pittsburgh, v. 27, p. 3675–3683, Jul. 2006.

GILBERT, T. W.; FREUND, J.; BADYLAK, S. F. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. **J Surg Res**, Pittsburgh, v. 152, n. 1, p. 135-9, Mar. 2009.

GILLIES, A.R.; LIEBER, R.L. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. **Muscle Nerve**. San Diego, v. 44, n. 3, p. 318–331, Sept. 2011.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International.**, Morgantown, v. 2017, Apr. 2017

GRASMAN, J.M.; ZAYAS, M.J.; PAGE, R.L.; PINS, G.D. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. **Acta Biomater.** Massachusetts, v. 25, p. 2-15, Jul. 2015.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S.; SASAKI, S.; HONDA, T.; HATTORI, S.; NAM, K.; KIMURA, T.; MOCHIZUKI, M.; FUJISATO, T.; KOBAYASHI, H.; KISHIDA A. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. **Biomaterials**, Tokyo, n. 31(14), p. 3941-8, May. 2010.

HREBIKOVA, H.; DIAZ, D.; MOKRY, J. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.** Hradec Kralove, v.159, n. 1, Oct. 2015.

JONG, O.G.; VAN BALKOM, B.W.; SCHIFFELERS, R.M.; BOUTEN, R.M.; BOUTEN, C.V.; VERHAAR, M.C. Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine. v. 5, n. **Front. Immuno.** Utrecht, v. 5, n. 608, p. 1–13, Dec. 2014.

JUNG, J.; LEE, H-J.; LEE, J. M.; NA, K-H.; HWANG, S-G.; KIM, G. J. Placenta extract promote liver regeneration in CCl4-injured liver rat model. **International Immunopharmacology**, Seoul, n. 11, p. 976–984, Feb. 2011.

KAKABADZE, A.; KAKABADZE, Z. Prospect of Using Decellularized Human Placenta and Cow Placentome for Creation of New Organs: Targeting the Liver (Part I: Anatomic Study). **Transplantation Proceedings.** Georgia, v. 47 (4), p. 1222-1227, May. 2015.

KANG, S. S.; WOO, S. S.; IM, J.; YANG, J. S.; YUN, C. H.; JU, H. R.; SON, G. C.; MOON, E. Y.; HAN, S. H. Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF-kappaB and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells. **Int Immunopharmacol**, Seoul, n. 7, p. 1488–95, Jul. 2007.

LI, Z.; CUI, Z. Three-dimensional perfused cell culture. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 32, p. 243–254, Oct. 2014.

LOBO, S.E.; LEONEL, L.C.P.C.; MIRANDA, C.M.F.C.; COELHO, T.M.; FERREIRA,

G.A.S.; MESS, A.; ABRÃO, M.S.; MIGLINO, M.A. The placenta as an organ and a source of stem cells and extracellular matrix: a review. **Cells Tissues Organs**. Brazil, v. 201, n. 4, p. 239-52, Apr. 2016.

LONDONO, R.; BADYLAK, S.F. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. **Annals of Biomedical Engineering**, Pittsburgh, v.. 43, n. 3, p. 577–592, Mar. 2015

LULLOVE, E. Acellular fetal bovine dermal matrix in the treatment of nonhealing wounds in patients with complex comorbidities. **J Am Podiatr Med Assoc**. v. 102, n. 3, p. 233-9, May. 2012.

MERRITT, E. K.; CANNON, M. V.; HAMMERS, D. W.; LE, L. N.; GOKHALE, R.; SARATHY, A.; SONG, T. J.; TIERNEY, M. T.; SUGGS, L. J.; WALTERS, T. J.; FARRAR, R. P. Repair of traumatic skeletal muscle injury with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix. **Tissue Eng Part A**, Austin, n. 16, p. 2871-2881, Sept. 2010.

MERTENS, J.P.; SUGG, K.B.; LEE, J.D.; LARKIN, L.M. Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue. **Regen. Med.**, Michigan, v. 9, n. 1, p. 89–100, Jan. 2014.

MOFID, M. M.; MEININGER, M. S.; LACEY, M. S. Veritas® bovine pericardium for immediate breast reconstruction: A xenograft alternative to acellular dermal matrix products. **European Journal of Plastic Surgery**, California, v. 35, p. 717–722, Jun. 2012.

MORRIS, A.H.; KYRIAKIDES, T.R. Matricellular proteins and biomaterials. **Matrix Biol.**, New Haven, v. 0, p. 183–191, Jul. 2014.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; LOGAN, M.; WANG, Y.; YUAN, Y.; BAE, H.; DIXON, B.; CHEN, P. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances.**, Ontario, v. 35, p. 530-544, Sept. 2017.

NAKAYAMA, K. H.; BATCHELDER, C. A.; LEE, C. I.; TARANTAL, A. F. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. **Tissue Eng Part A**, Davis, v. 16, n. 7, p. 2207-16, Jul. 2010.

PERNICONI, B.; COSTA, A.; AULINO, P.; TEODORI, L.; ADAMO, S.; COLETTI, D. The pro-myogenic environment provided by whole organ scale acellular scaffolds from skeletal muscle. **Biomaterials**. Rome, v. 32, p. 7870-7882, Nov. 2011.

NIEPONICE, A.; GILBERT, T.W.; JOHNSON, S.A.; TURNER, N.J.; BADYLAK, S.F. Bone marrow-derived cells participate in the long-term remodeling in a mouse model of esophageal reconstruction. **J Surg Res.** Pittsburgh, v. 182, n. 1, p.1-7, Jun. 2013

PERNICONI, B.; COLETTI, D.; AULINO, P.; COSTA, A.; APRILE, P.; SANTACROCE, L.; CHIARAVALLOTI, E.; COQUELIN, L.; CHEVALLIER, N.; TEODORI, L.; ADAMO, S.; MARRELLI, M.; TATULLO, M. Muscle acellular scaffold as a biomaterial: effects on C2C12 cell differentiation and interaction with the murine host environment. **Front Physiol.**, Paris, v. 26, n. 5, p. 354, Sept. 2014.

PHILLIPS, M.; MAOR, E.; RUBINSKY, B. Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization. **J Biomech Eng.** v. 132, n. 9, Aug. 2010.

RIZZI, R.; BEARZI, C.; MAURETTI, A.; BERNARDINI, S.; CANNATA, S.; GARGIOLI, C. Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. **Muscles Ligaments Tendons J.**, Rome, v. 2 (3), p. 230-4, Oct. 2012.

ROSSI, C. A.; POZZOBON, M.; COPPI, P. DE. Advances in musculoskeletal tissue engineering: Moving towards therapy. **Organogenesis**, Padua, v. 6, p. 167–172, May. 2010.

SCHULTZ, G.S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Rep Reg.**, Florida, v. 17, p. 153–162, Mar. 2009

SICARI, B.M.; AGRAWAL, V.; SIU, B.F.; MEDBERRY, C.J.; DEARTH, C.L.; TURNER, N.J.; BADYLAK, S.F. A murine model of volumetric muscle loss and a regenerative medicine approach for tissue replacement. **Tissue engineering. Part A.**, Pittsburgh, v.18, n. 19-20, p. 1941-8 p.1941–1948, Oct. 2012.

SICARI, B. M.; DEARTH, C. L.; BADYLAK, S. F. Tissue engineering and regenerative medicine approaches to enhance the functional response to skeletal muscle injury. **Anatomical record**, Pittsburgh, v. 297, p. 51–64, Dec. 2014.

SONG, J. J.; OTT, H. C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. **Trends in molecular medicine**, Massachusetts, v. 17, n. 8, p. 424–32, Aug. 2011.

SWINEHART, I.T.; BADYLAK, S.F. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. **Dev Dyn.**, Pittsburgh, v. 245, n. 3, p. 351–360, Mar. 2016.

TEODORI, L.; COSTA, A.; MARZIO, R.; PERNICONI, B.; COLETTI, D.; ADAMO, S.; GUPTA, B.; TARNOK, A. Native extracellular matrix: a new scaffolding platform for repair of damaged muscle. **Frontiers in Physiology**, Rome, v. 5, n. 218, Jun, 2014

TIDBALL, J.G.; DORSHKIND, K.; WEHLING-HENRICKS, M. Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. **Development.**, California, v. 141, n. 6, p. 1184–1196, Mar. 2014.

TURNER, N.J.; YATES, A.J. JR.; WEBER, D.J.; QURESHI, I.R.; STOLZ, D.B.; GILBERT, T.W.; BADYLAK, S.F. Xenogeneic extracellular matrix as an inductive scaffold for regeneration of a functioning musculotendinous junction. **Tissue engineering. Part A**, Pittsburgh, v. 16, n. 11, p. 3309–17, Nov. 2010.

WOLF, M.T.; CARRUTHERS, C.A.; DEARTH, C.L.; CRAPO, P.M.; HUBER, A.; BURNSED, O.A.; LONDONO, R.; JOHNSON, S.A.; DALY, K.A.; STAHL, E.C.; FREUND, J.M.; MEDBERRY, C.J.; CAREY, L.E.; NIEPONICE, A.; AMOROSO, N.J.; BADYLAK, S.F. Polypropylene surgical mesh coated with extracellular matrix mitigates the host foreign body response. **J Biomed Mater Res A.**, Pittsburgh, v. 102, n. 1, p. 234–246, Jan. 2014.

WONG, M.L.; WONG, J.L.; VAPNIARSKY, N.; GRIFFITHS, L.G. *In vivo* xenogeneic scaffold fate is determined by residual antigenicity and extracellular matrix preservation. **Biomaterials**, Davis, v. 92, p. 1–12, Jun. 2016.

YANG, B.; ZHANG, Y.; ZHOU, L.; SUN, Z.; ZHENG, J.; CHEN, Y.; DAI, Y. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. **Tissue Eng Part C Methods**, Nanjing, v. 16, n. 5, p. 1201–11, Oct. 2010.

Apêndice

APÊNDICE A- Valores de Média $\pm$ Desvio Padrão da imunohistoquímica para CD163

Grupo/Dias	Alto Positivo	Médio Positivo	Baixo Positivo	Negativo
	Média $\pm$ Desv. Pad.	Média $\pm$ Desv. Pad.	Média $\pm$ Desv. Pad.	Média $\pm$ Desv. Pad.
Controle 3 Dias	54,17 $\pm$ 1,37	2,76 $\pm$ 0,07	2,41 $\pm$ 0,06	40,67 $\pm$ 1,29
Controle 15 Dias	51,52 $\pm$ 1,42	2,94 $\pm$ 0,05	2,54 $\pm$ 0,05	43,00 $\pm$ 1,32
Controle 45 Dias	52,44 $\pm$ 1,72	2,88 $\pm$ 0,12	2,50 $\pm$ 0,10	42,17 $\pm$ 1,51
Músculo 3 Dias	54,92 $\pm$ 2,82	2,72 $\pm$ 0,06	2,36 $\pm$ 0,08	40,00 $\pm$ 2,69
Músculo 15 Dias	55,33 $\pm$ 1,38	2,73 $\pm$ 0,07	2,36 $\pm$ 0,05	39,58 $\pm$ 1,28
Músculo 45 Dias	51,77 $\pm$ 1,44	2,93 $\pm$ 0,07	2,58 $\pm$ 0,15	42,98 $\pm$ 1,20
Placenta 3 Dias	54,05 $\pm$ 1,24	2,79 $\pm$ 0,05	2,43 $\pm$ 0,02	40,73 $\pm$ 1,27
Placenta 15 Dias	50,93 $\pm$ 0,92	2,83 $\pm$ 0,10	2,49 $\pm$ 0,06	43,76 $\pm$ 0,87
Placenta 45 Dias	51,22 $\pm$ 1,37	2,96 $\pm$ 0,03	2,55 $\pm$ 0,04	43,27 $\pm$ 1,34

Desv. Pad.: Desvio Padrão

APÊNDICE B- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente: Alto Positivo/CD163

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,4545	0,5489	0,7187	0,0018	0,0107	0,0107	0,0034	0,0555
PLAC 3D	0,4545		0,9244	0,2718	0,0113	0,0501	0,0562	0,0200	0,2031
CRTL 3D	0,5489	0,9244		0,3538	0,0144	0,0548	0,0625	0,0244	0,2013
MUSC 15D	0,7187	0,2718	0,3538		0,0007	0,0048	0,0045	0,0014	0,0273
PLAC 15D	0,0018	0,0113	0,0144	0,0007		0,6365	0,4673	0,8016	0,2295
CRTL 15D	0,0107	0,0501	0,0548	0,0048	0,6365		0,8392	0,8097	0,4872
MUSC 45D	0,0107	0,0562	0,0625	0,0045	0,4673	0,8392		0,6324	0,5880
PLAC 45D	0,0034	0,0200	0,0244	0,0014	0,8016	0,8097	0,6324		0,3284
CRTL 45D	0,0555	0,2031	0,2013	0,0273	0,2295	0,4872	0,588	0,3284	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

APÊNDICE C- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente: Médio Positivo/CD163

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,2163	0,5277	0,8708	0,0507	0,0005	0,0005	<,0001	0,0066
PLAC 3D	0.2163		0,5977	0,2799	0,4391	0,0093	0,0103	0,0022	0,0852
CRTL 3D	0,5277	0,5977		0,6295	0,2186	0,0044	0,0047	0,0011	0,0393
MUSC 15D	0,8708	0,2799	0,6295		0,0706	0,0008	0,0007	0,0001	0,0095
PLAC 15D	0,0507	0,4391	0,2186	0,0706		0,0465	0,0573	0,0144	0,2968
CRTL 15D	0,0005	0,0093	0,0044	0,0008	0,0465		0,8043	0,7336	0,3436
MUSC 45D	0,0005	0,0103	0,0047	0,0007	0,0573	0,8043		0,5267	0,4417
PLAC 45D	<,0001	0,0022	0,0011	0,0001	0,0144	0,7336	0,5267		0,1812
CRTL 45D	0,0066	0,0852	0,0393	0,0095	0,2968	0,3436	0,4417	0,1812	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

APÊNDICE D- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente: Baixo Positivo/CD163

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,1848	0,4449	0,9560	0,0232	0,0053	0,0005	0,0015	0,0225
PLAC 3D	0,1848		0,6305	0,1681	0,3002	0,0835	0,0130	0,0365	0,2514
CRTL 3D	0,4449	0,6305		0,4156	0,1552	0,0423	0,0066	0,0180	0,1330
MUSC 15D	0,9560	0,1681	0,4156		0,0205	0,0046	0,0004	0,0013	0,0201
PLAC 15D	0,0232	0,3002	0,1552	0,0205		0,4172	0,1171	0,2589	0,8471
CRTL 15D	0,0053	0,0835	0,0423	0,0046	0,4172		0,5034	0,8085	0,5608
MUSC 45D	0,0005	0,0130	0,0066	0,0004	0,1171	0,5034		0,6433	0,2026
PLAC 45D	0,0015	0,0365	0,0180	0,0013	0,2589	0,8085	0,6433		0,3899
CRTL 45D	0,0225	0,2514	0,1330	0,0201	0,8471	0,5608	0,2026	0,3899	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

**APÊNDICE E- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente:
Negativo/CD163**

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,5020	0,5677	0,6978	0,0018	0,0155	0,0101	0,0053	0,0720
PLAC 3D	0,5020		0,9592	0,2932	0,0092	0,0600	0,0455	0,0255	0,2230
CRTL 3D	0,5677	0,9592		0,3549	0,0132	0,0702	0,0564	0,0334	0,2349
MUSC 15D	0,6978	0,2932	0,3549		0,0007	0,0067	0,0040	0,0020	0,0342
PLAC 15D	0,0018	0,0092	0,0132	0,0007		0,5216	0,4753	0,6549	0,1823
CRTL 15D	0,0155	0,0600	0,0702	0,0067	0,5216		0,9835	0,8190	0,5053
MUSC 45D	0,0101	0,0455	0,0564	0,0040	0,4753	0,9835		0,7875	0,4893
PLAC 45D	0,0053	0,0255	0,0334	0,0020	0,6549	0,8190	0,7875		0,3494
CRTL 45D	0,0720	0,2230	0,2349	0,0342	0,1823	0,5053	0,4893	0,3494	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

APÊNDICE F- Valores de Média $\pm$ Desvio Padrão da imunohistoquímica para PCNA

Grupo/Dias	Alto Positivo	Médio Positivo	Baixo Positivo	Negativo
	Média $\pm$ Desv. Pad.	Média $\pm$ Desv. Pad.	Média $\pm$ Desv. Pad.	Média $\pm$ Desv. Pad.
Controle 3 Dias	2,75 $\pm$ 4,18	6,11 $\pm$ 7,03	17,41 $\pm$ 5,65	73,74 $\pm$ 16,83
Controle 15 Dias	0,02 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,03	8,33 $\pm$ 6,93	91,24 $\pm$ 6,92
Controle 45 Dias	0,04 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,33	2,37 $\pm$ 1,20	92,80 $\pm$ 9,13
Músculo 3 Dias	3,68 $\pm$ 4,04	3,72 $\pm$ 1,35	11,51 $\pm$ 7,54	69,83 $\pm$ 20,67
Músculo 15 Dias	0,52 $\pm$ 0,40	2,10 $\pm$ 1,41	16,37 $\pm$ 12,13	81,01 $\pm$ 13,77
Músculo 45 Dias	0,04 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,29	2,53 $\pm$ 2,09	97,17 $\pm$ 2,38
Placenta 3 Dias	6,80 $\pm$ 4,98	8,11 $\pm$ 4,31	19,02 $\pm$ 6,95	66,07 $\pm$ 14,99
Placenta 15 Dias	0,48 $\pm$ 0,91	1,58 $\pm$ 2,66	6,71 $\pm$ 7,90	91,22 $\pm$ 11,44
Placenta 45 Dias	0,02 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,11	4,07 $\pm$ 4,34	95,89 $\pm$ 4,15

Desv. Pad.: Desvio Padrão

APÊNDICE G- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente: Alto Positivo/PCNA

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,1018	0,6414	0,0974	0,0939	0,0770	0,0585	0,0569	0,0783
PLAC 3D	0,1018		0,0518	0,0022	0,0021	0,0022	0,0012	0,0011	0,0023
CRTL 3D	0,6414	0,0518		0,2717	0,2643	0,2103	0,1841	0,1803	0,2132
MUSC 15D	0,0974	0,0022	0,2717		0,9846	0,8041	0,7955	0,7855	0,8108
PLAC 15D	0,0939	0,0021	0,2643	0,9846		0,8179	0,8104	0,8003	0,8246
CRTL 15D	0,0770	0,0022	0,2103	0,8041	0,8179		0,9935	0,9968	0,9935
MUSC 45D	0,0585	0,0012	0,1841	0,7955	0,8104	0,9935		0,9896	0,9996
PLAC 45D	0,0569	0,0011	0,1803	0,7855	0,8003	0,9968	0,9896		0,9899
CRTL 45D	0,0783	0,0023	0,2132	0,8108	0,8246	0,9935	0,9996	0,9899	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

APÊNDICE H- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente: Médio Positivo/PCNA

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,0359	0,2740	0,4213	0,2907	0,1344	0,0934	0,0839	0,1222
PLAC 3D	0,0359		0,3574	0,0056	0,0030	0,0014	0,0006	0,0005	0,0012
CRTL 3D	0,2740	0,3574		0,0727	0,0446	0,0198	0,0115	0,0102	0,0177
MUSC 15D	0,4213	0,0056	0,0727		0,7954	0,4362	0,3621	0,3343	0,4066
PLAC 15D	0,2907	0,0030	0,0446	0,7954		0,5879	0,5111	0,4765	0,5528
CRTL 15D	0,1344	0,0014	0,0198	0,4362	0,5879		0,9461	0,9052	0,9609
MUSC 45D	0,0934	0,0006	0,0115	0,3621	0,5111	0,9461		0,9556	0,9878
PLAC 45D	0,0839	0,0005	0,0102	0,3343	0,4765	0,9052	0,9556		0,9468
CRTL 45D	0,1222	0,0012	0,0177	0,4066	0,5528	0,9609	0,9878	0,9468	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

APÊNDICE I- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente: Baixo Positivo/PCNA

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,1421	0,2806	0,3352	0,3426	0,5576	0,0824	0,1462	0,1003
PLAC 3D	0,1421		0,7659	0,5981	0,0203	0,0570	0,0028	0,0059	0,0047
CRTL 3D	0,2806	0,7659		0,8483	0,0569	0,1252	0,0103	0,0199	0,0146
MUSC 15D	0,3352	0,5981	0,8483		0,0627	0,1453	0,0100	0,0203	0,0150
PLAC 15D	0,3426	0,0203	0,0569	0,0627		0,7655	0,4068	0,5985	0,4242
CRTL 15D	0,5576	0,0570	0,1252	0,1453	0,7655		0,2893	0,4340	0,3075
MUSC 45D	0,0824	0,0028	0,0103	0,0100	0,4068	0,2893		0,7586	0,9754
PLAC 45D	0,1462	0,0059	0,0199	0,0203	0,5985	0,4340	0,7586		0,7525
CRTL 45D	0,1003	0,0047	0,0146	0,0150	0,4242	0,3075	0,9754	0,7525	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

**APÊNDICE J- Efeito dia de implantação *versus* Grupo experimental. Variável dependente:
Negativo/PCNA**

	MUSC 3D	PLAC 3D	CRTL 3D	MUSC 15D	PLAC 15D	CRTL 15D	MUSC 45D	PLAC 45D	CRTL 45D
MUSC 3D		0,6770	0,6884	0,2219	0,0245	0,0358	0,0053	0,0074	0,0253
PLAC 3D	0,6770		0,4336	0,1068	0,0094	0,0152	0,0019	0,0027	0,0105
CRTL 3D	0,6884	0,4336		0,4576	0,0819	0,1019	0,0228	0,0304	0,0764
MUSC 15D	0,2219	0,1068	0,4576		0,2631	0,2983	0,0824	0,1080	0,2327
PLAC 15D	0,0245	0,0094	0,0819	0,2631		0,9983	0,5113	0,6055	0,8716
CRTL 15D	0,0358	0,0152	0,1019	0,2983	0,9983		0,5443	0,6339	0,8814
MUSC 45D	0,0053	0,0019	0,0228	0,0824	0,5113	0,5443		0,8872	0,6540
PLAC 45D	0,0074	0,0027	0,0304	0,1080	0,6055	0,6339	0,8872		0,7509
CRTL 45D	0,0253	0,0105	0,0764	0,2327	0,8716	0,8814	0,6540	0,7509	

MUSC: Grupo Músculo

PLAC: Grupo Placenta

CRTL: Controle

D: Dias

Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Programa estatístico: SAS

APÊNDICE K- Cultivo *in vitro* de células em biomateriais descelularizados

Figura 20: Cultivo *in vitro* de células de músculo de aorta de ratos em biomateriais descelularizados

Fonte: MIRANDA, C.M.F.C., 2017.

Legenda: Células de músculo liso de aorta de ratos foram incubadas na concentração de 10^4 células/poço, em placa de 96 poços, contendo fragmentos de 0,5 cm de matriz descelularizada (dMEC) de músculo esquelético murino (A-C) e placenta canina (D-F) em volume final de meio de cultivo de 30 μ l (DMEM/F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina). A análise histológica revelou a presença de aglomerados de núcleos em regiões mais periféricas das matrizes 2, 7 e 14 dias após a incubação, porém, vale-se ressaltar que não houve disseminação das células em toda a extensão dos biomateriais. Coloração de Tricrômio de Masson. Barra de escala: 20 e 50 μ m.

APÊNDICE L- Cultivo *in vitro* de células em biomateriais descelularizados

Figura 21: Cultivo *in vitro* de células de músculo esquelético de ratos em biomateriais descelularizados

Fonte: MIRANDA, C.M.F.C., 2017.

Legenda: Células de músculo esquelético de ratos foram incubadas na concentração de 10^4 células/poço, em placa de 96 poços, contendo fragmentos de 0,5 cm de matriz descelularizada (dMEC) de músculo esquelético murino (A-C) e placenta canina (D-F) em volume final de meio de cultivo de 30 µl (MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina). Realizou-se imunofluorescência para proteína de MEC fibronectina (1:200) para a identificação da da matriz e marcação de núcleos com Vectashield associado ao DAPI. Observou-se a presença de núcleos em regiões mais periféricas das matrizes 2, 7 e 14 dias após a incubação, porém, vale-se ressaltar que não houve disseminação das células em toda a extensão dos biomateriais. Barra de escala: 100 µm.