UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA DOS ANIMAIS
DOMÉSTICOS E SILVESTRES

MICAEL NUNES DA SILVA

Avaliação da composição da matriz extracelular do músculo estriado esquelético de cães com distrofia muscular comparados com cães não distróficos

SÃO PAULO
2020

MICAEL NUNES DA SILVA

Avaliação da composição da matriz extracelular do músculo estriado esquelético de cães com distrofia muscular comparados com cães não distróficos

Dissertação/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 Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Dra. Paula Fratini

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2020

Obs.: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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. 3915 FMVZ	Silva, Micael Nunes da Avaliação da composição da matriz extracelular do músculo estriado esquelético de cães com distrofia muscular comparados com cães não distróficos / Micael Nunes da Silva. – 2020. 55 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020. Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientador: Profa. Dra. Paula Fratini. 1. Distrofia muscular. 2. Músculo estriado esquelético. 3. Matriz extracelular. 4. Cães. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DE CÃES COM DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE COMPARADOS COM CÃES NORMAIS", protocolada sob o CEUA nº 7744050218 (10 005555), sob a responsabilidade de **Paula Fratini e equipe; Micael Nunes da Silva** - 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 12/12/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE COMPOSITION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX OF THE SKELETAL MUSCLE OF DOGS WITH DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY COMPARED WITH STANDARD DOGS", utilizing 6 Dogs (6 males), protocol number CEUA 7744050218 (10 005555), under the responsibility of **Paula Fratini and team; Micael Nunes da Silva** - 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 12/12/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **10/2020**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem:	Animais provenientes de outros projetos			
Espécie:	Cães	sexo:	Machos	idade: 1 a 8 anos N: 3
Linhagem:	Golden Retriever			Peso: 20 a 35 kg
Origem:	Animais provenientes de outros projetos			
Espécie:	Cães	sexo:	Machos	idade: 1 a 8 anos N: 3
Linhagem:	Golden Retriever			Peso: 20 a 30 kg

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Histologia e no laboratório de medicina Regenerativa no depto de Cirurgia, setor de Anatomia da FMVZ-USP, os animais utilizados são mantidos no Canil GRMD-Brasil da FMVZ-USP.

São Paulo, 20 de janeiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Micael Nunes da.

Título: *Avaliação da composição da matriz extracelular do músculo estriado esquelético de cães com distrofia muscular comparados com cães não distróficos*

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à todos os cientistas brasileiros, que tanto se esforçam para fazer ciência nesse país, mesmo em meio a tantas dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e louvar a Deus e Pai de nosso Senhor Jesus Cristo, porque é o Criador, Provedor e Salvador da minha vida, pois se não fosse o Pai Celestial nada disso seria possível, afinal, o fôlego de vida é dEle, a sabedoria é dEle, a força é dEle, a glória é dEle, o louvor é dEle e a honra é dEle. “*Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas; glória pois à Ele, eternamente. Amém!*” (Romanos 11:36).

Agradeço também à minha digníssima esposa Bruna Suzart, uma fiel companheira e ajudadora em todos os momentos, principalmente na execução dessa dissertação e conclusão do mestrado. Um homem pode herdar fazendas e heranças de um pai, mas uma boa esposa só o Senhor pode conceder.

Agradeço meus pais, Fernando Nunes e Rosemeire Severina, bem como meus familiares, pelo apoio e compreensão nesse processo idas e vindas ao local das aulas e desenvolvimento de tarefas.

Agradeço à Dra. Paula Fratini, bem como pela sua competente equipe, em especial à Vitória, que me ajudou de forma extraordinária na execução desse trabalho, sem essa equipe nada disso seria possível, sou grato à cada um, pela dedicação, conselho e ajuda.

Agradeço aos cães do canil GRMD-Brasil e da ANCLIVEPA-SP que doam suas vidas à nobre pesquisa científica, bem como essas instituições veterinárias pela gentileza em disponibilizar amostras à pesquisa. .

Agradeço também à todos os alunos e professores do Mestrado da FMVZ, do setor de Anatomia, pois foram pessoas que me ajudaram a construir diariamente uma vida acadêmica.

*“Deus nos permitiu conhecer a Ciência Médica Veterinária,
mas guardou para si o sopro da vida”*

Henrique Marcelo Guérin Reis

RESUMO

SILVA, M. N. Título em português: *Avaliação da composição da matriz extracelular do músculo estriado esquelético de cães com distrofia muscular comparados com cães não distróficos*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença que causa degeneração progressiva dos músculos estriados esqueléticos e cardíacos, causada pela perda da função do gene da distrofina, devido a uma mutação genética. É caracterizada por uma perda progressiva da função muscular. Músculos com deficiência de distrofina são vulneráveis à danos induzidos pela contração, o que leva a ciclos repetidos de necrose e regeneração, resultando em falha de regeneração, aumento da fibrose e perda progressiva da função muscular. Dentro do músculo esquelético, a matriz extracelular é duplamente importante para fornecer um suporte celular e transmitir forças contráteis musculares. No entanto, o acúmulo patológico de certos componentes na matriz extracelular muscular, que ocorre na fibrose especificamente, prejudica a função celular normal e a transmissão de força, bem como inibe o reparo e a regeneração, compondo desse modo o defeito celular primário. A DMD vem recebendo atenção especial das comunidades médicas por ser uma doença comum em homens (devido à mutação que ocorre no cromossomo X), além de ser um distúrbio grave e atualmente uma doença sem cura. Devido à necessidade de se descobrir o real impacto da DMD na estrutura molecular dos músculos estriados esqueléticos e cardíacos – a partir dos componentes proteicos da matriz extracelular dos músculos –, avaliamos o grau de alterações de distrofia muscular de cães usados como modelo da DMD comparados com cães não distróficos. Assim, utilizando modelos caninos com distrofia muscular, devido à proximidade de sinais fenotípicos humanos, a saber, atrofia muscular, perda de massa corporal, fadiga muscular e comprometimento cardíaco, buscamos verificar a influência da distrofia muscular na estrutura proteica do músculo estriado esquelético. A partir de amostras de músculos descelularizados de cães distróficos e não distróficos, realizamos análises histológicas e imunohistoquímicas visando avaliar alteração nos componentes da matriz extracelular em cães com deficiência de distrofina. Obtivemos uma satisfatória descelularização, com ausência de núcleos celulares na matriz, e também constatamos que houve alterações na estrutura da matriz extracelular, a saber,

preservação de colágeno e proteínas adesivas como fibronectina e laminina, bem como uma diminuição dos glicosaminoglicanos após o processo de descelularização.

Palavras-chave: distrofia muscular, músculo estriado esquelético, matriz extracelular, cães.

ABSTRACT

SILVA, M. N. Título em inglês: *Evaluation of skeletal striated muscle extracellular matrix composition in dogs with muscular dystrophy compared with non-dystrophic dogs*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a disease that causes progressive degeneration of the skeletal and cardiac striated muscles, caused by the loss of dystrophin gene function due to a genetic mutation. It is characterized by a progressive loss of muscle function. Muscles with dystrophin deficiency are vulnerable to contraction-induced damage, which leads to repeated cycles of necrosis and regeneration, resulting in failed regeneration, increased fibrosis, and progressive loss of muscle function. Within the skeletal muscle, the extracellular matrix is doubly important for providing cellular support and transmitting contractile muscle forces. However, the pathological accumulation of certain components in the extracellular muscle matrix, which occurs in fibrosis specifically, normal cell function and force transmission impairs, as well as inhibits repair and regeneration, thus composing the primary cell defect. DMD has been receiving special attention from medical communities because it is a common disease in men (due to the mutation that occurs in the X chromosome), as well as being a serious disorder and currently a disease without cure. Due to the need to discover the real impact of DMD on the molecular structure of the skeletal and cardiac striated muscles - from the protein components of the extracellular muscle matrix -, I evaluated the degree of muscular dystrophy changes in dogs used as a model of DMD compared with non-dystrophic dogs. Thus, using canine models with muscular dystrophy, due to the proximity of human phenotypic signs, namely, muscle atrophy, loss of body mass, muscle fatigue and cardiac involvement, I sought to verify the influence of muscular dystrophy on the protein structure of skeletal striated muscle. From samples of decellularized muscles of dystrophic and non-dystrophic dogs, we performed histological and immunohistochemical analyzes to evaluate changes in extracellular matrix components in dogs with dystrophin deficiency. We obtained satisfactory decellularization, with absence of cell nuclei in the matrix, and we also found that there were changes in the structure of the extracellular matrix, namely, preservation of collagen and adhesive proteins such as fibronectin and laminin, well as a decrease in glycosaminoglycans after the process of decellularization.

Keywords: muscular dystrophy, skeletal muscle, extracellular matrix, dogs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Coleta e descelularização de músculos distróficos.....	30
Figura 2: Fotomicrografia coloração por HE.....	31
Figura 3: Fotomicrografia coloração por HE.....	32
Figura 4: Fotomicrografia coloração por Tricômio de Masson.....	34
Figura 5: Análise de fluorescência por DAPI.....	35
Figura 6: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura.....	36
Figura 7: Análise Imunohistoquímica (Colágeno)	37
Figura 8: Análise Imunohistoquímica (Laminina).	38
Figura 9: Análise Imunohistoquímica (Fibronectina)	39
Figura 10: Análise Imunohistoquímica (Distrofina)	41
Figura 11: Análise Imunohistoquímica (MyoD)	42
Figura 12: Análise DNA genômico.....	43
Figura 13: Fotomicrografia coloração Ferro coloidal.....	44
Figura 14: Fotomicrografia coloração Gomori.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3. OBJETIVOS	25
3.1.Objetivo Geral	25
3.2.Objetivos Específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1.Coleta das amostras	26
4.2. Descelularização de músculo	27
4.3. Análises Histológicas.....	27
4.4. Fluorescência por DAPI	28
4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
4.6. Análise imunohistoquímica	29
4.7. Concentração do DNA genômico (DNAg).....	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Coleta e processo de descelularização	30
5.2 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)	30
5.3. Fluorescência por DAPI	35
5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
5.5. Análise imunohistoquímica	37
5.6. Concentração do DNA genômico (DNAg).....	43
5.7. Ferro Coloidal.....	44
5.8. Coloração de Gomori.....	46

6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente trinta diferentes tipos de distrofias musculares causadas por alterações genéticas, as quais se caracterizam pela perda progressiva de força dos músculos. As proteínas acometidas por essas distrofias localizam-se nas fibras musculares e também estão ligadas à outras proteínas, enzimas e à matriz extracelular (GUZMÁN, O.R.C. *et al.*, 2012). Uma miopatologia comumente difundida é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). A forma mais comum em crianças é a DMD, que ocorre em aproximadamente 1: 3500 nascimentos; em populações com acesso à triagem de portadores e diagnóstico pré-natal, a incidência é de 1:5000 - 1:10.000 (QUATTROCELLI, M. *et al.*, 2017).

A DMD é causada por mutações que alteram a funcionalidade do gene DMD, que codifica para a proteína distrofina. Nas miofibras, a distrofina liga o citoesqueleto de actina a membrana da célula muscular, o sarcolema, que ajuda a manter um complexo de proteínas chamado complexo de distrofina glicoproteína (DGC). O DGC é ligado à laminina no lado extracelular do sarcolema. Mutações genéticas no gene desestabilizam a distrofina, o que resulta na perda da integridade da membrana e contínua lesão e necrose das miofibras, que são progressivamente substituídas por tecido fibroso. A remodelação prejudica a funcionalidade do músculo e, eventualmente, leva à insuficiência muscular esquelética e cardíaca.

Para se elucidar os efeitos prejudiciais da ausência da distrofina, é necessário verificar alguns componentes da matriz extracelular, como alguns tipos de colágeno, fibronectina e entre outros. Sabe-se que a matriz extracelular é uma complexa e estável rede de macromoléculas. As mutações que causam a DMD podem ser resultantes de deleções, duplicações ou mudança das localizações dos nucleotídeos, que levam a perda total ou parcial da distrofina. Essas mutações causam danos tanto estruturais quanto funcionais no músculo estriado esquelético e músculo cardíaco. Em biópsias observam-se fibras musculares necróticas ou em degeneração, as primeiras ficam repletas de macrófagos, com núcleos imaturos bem no centro das fibras.

A capacidade de regeneração muscular é perdida com o tempo, e após essa exaustão celular e fisiológica, as fibras musculares gradualmente são substituídas por depósitos de colágeno e por tecido adiposo (OGURA, Y. *et al.*, 2014). Evidentemente, a manifestação clínica em cães com distrofia muscular não é idêntica à DMD de humanos, onde com apenas duas semanas, filhotes de cães com distrofia muscular morrem devido à lesão no diafragma, em contrapartida é raríssimo ocorrer alguma

morte de meninos recém-nascidos com DMD. Entretanto, numa análise de lesões histológicas, os efeitos em cães distróficos são similares aos efeitos nos seres humanos acometidos com DMD, por exemplo, a fibrose dos músculos esqueléticos, principalmente dos membros, sinal comum da DMD, afeta semelhantemente os cães distróficos. (MCGREEVY, J.W. *et al.*, 2015; KORNEGAY, J.N. 2017).

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa é um campo interdisciplinar que avança rapidamente e combina os princípios ciências da vida, ciências dos materiais e engenharia para construir enxertos de engenharia de tecidos, que são transplantados para o corpo como substitutos dos desaparecidos ou gravemente danificados tecidos e / ou órgãos.

Vários biomateriais naturais comumente usados na preparação de *scaffold*, como colágeno, fibrina, laminina, fibronectina e hialuronano, são componentes principais da matriz extracelular. Mais importante, estudos emergentes sugerem que a matriz extracelular pode funcionar como um *scaffold* indutivo ou modificar um andaime com base em biomaterial para regeneração de tecidos e / ou órgãos. A matriz extracelular é geralmente composta de três categorias de moléculas: proteínas fibrosas (por exemplo, colágeno, elastina, fibrilina e fibulina), glicoproteínas adesivas (por exemplo laminina, fibronectina, tenasina, trombospondina e integrina),e glicosaminoglicanos (YI, Sheng, et al., 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Distrofia muscular

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é caracterizada pela degeneração progressiva das fibras musculares esqueléticas e substituição por tecido conjuntivo e adiposo, o que leva à fraqueza muscular, insuficiência cardiorrespiratória e morte por volta dos 25 anos de vida. A falta ou deficiência da proteína distrofina leva à instabilidade e perda da integridade do sarcolema e aumento do influxo de cálcio. A presença de citocinas interfere na evolução da reação inflamatória observada após lesão, bem como na regeneração muscular. Enquanto os mecanismos envolvidos na inflamação, mionecrose e regeneração muscular distrófica são semelhantes para todos os músculos distróficos, são diferentemente afetados em resposta à falta de distrofina (MARANHÃO, J.B. 2014).

A distrofina é uma proteína do citoesqueleto crítica para a estabilidade e função das fibras musculares no músculo: a distrofina estabelece uma ligação mecânica entre a matriz extracelular e a actina citoesquelética nas fibras musculares através do complexo proteico associado à distrofina (DAPC). A deficiência de distrofina leva à ruptura da membrana da fibra muscular durante a contração e causa sinalização intracelular prejudicada. No nível celular, os músculos dos pacientes com DMD mostram evidências de necrose, degeneração e regeneração, atrofia de miofibras, acúmulo de gordura, fibrose e inflamação (CORDOVA, G. *et al.*, 2018).

As mutações no gene DMD limitam a produção da proteína distrofina, resultando em perda da integridade da membrana de miofibras e ciclos repetidos de necrose e regeneração. Dessa forma, o músculo é substituído gradualmente com tecido conjuntivo fibroso e gordura, levando à fraqueza e contraturas debilitantes. Eventualmente, o envolvimento de músculos respiratórios e coração causam insuficiência cardiopulmonar e morte na segunda a terceira década de vida em humanos (KORNEGAY, J.N. 2017).

Embora a base molecular para DMD tenha sido definida há 30 anos, glicocorticóides e terapia de suporte continuam sendo o padrão de atendimento. Antes da descoberta do gene DMD e da proteína distrofina na década de 1980, não havia modelos animais genéticos para DMD. Várias miopatias primárias herdadas e experimentais em animais, principalmente em camundongos, galinhas e hamsters, foram estudadas com esforço para obter informações sobre a patogênese e potencial tratamento das distrofias humanas. A discrepância mais óbvia nesses modelos está

relacionada ao seu padrão de herança autossômico versus padrão vinculado ao cromossomo X. Enquanto esses estudos em animais forneceram informações úteis sobre a doença patogênese, seu valor geral foi questionado (BRINKMEYER-LANGFORD, C. *et al.*, 2013)

Posteriormente, distrofinopatias geneticamente homólogas foram identificadas em várias espécies de mamíferos, incluindo ratos e cães. Porque o fenótipo de cães distróficos assemelha-se mais à DMD, estudos de tratamento patogênético e pré-clínico pode se tornar mais recomendados numa comparação com humanos. A maioria dos estudos caninos foi realizado no golden retriever com distrofia muscular (GRMD), que ocorre devido a uma mutação espontânea no local de emenda no gene DMD. Verdadeiros desafios são enfrentados por médicos e cientistas na extrapolação de terapias em animais para seres humanos, com ênfase na importância de primeiro e acima de tudo estabelecer-se uma segurança. Tendo o modelo GRMD um papel preponderante no desenvolvimento de tratamento para humanos acometidos da DMD (KORNEGAY, J.N. *et al.*, 2016).

A descoberta dos mecanismos da DMD muito se deve a utilização de animais como modelos experimentais por apresentarem alteração no gene que codifica a proteína distrofina. Cães distróficos foram identificados em 1988, em que algumas raças como o labrador, rottweiler, fox terriers, pointer alemão e golden retriever apresentaram deficiência de distrofina. Apesar da doença parecer mais severa, com início e evolução mais rápidos do que em humanos, a utilização de cães como modelo experimental torna-se pouco atrativa pelo alto custo de manutenção. O gato distrófico, apesar de apresentar processo de fibrose mais brando, desenvolve hipertrofia muscular exagerada com evolução geralmente fatal devido à hipertrofia da língua e do diafragma e cardiomiopatia. O zebrafish apesar de não apresentar musculatura similar aos humanos tem se mostrado uma opção viável para as etapas iniciais dos testes envolvendo fármacos (COLLINS, C. A. *et al.*, 2003).

O camundongo distrófico da linhagem mdx (murine x-linked dystrophy), genético e bioquimicamente homólogo a DMD humana e tem sido utilizado extensivamente como modelo pré-clínico ao longo dos últimos 20 anos. O camundongo mdx apresenta mutação espontânea no códon terminal do exon 23 no gene da distrofina e sua forte semelhança com os meninos portadores de DMD em termos de histopatologia e mudanças em seu proteoma, juntamente com seu pequeno custo de manutenção, o tornam o modelo animal mais adequado ao estudo da fisiopatologia da

DMD (RAYAVARAPU, S. *et al.*, 2013). Com base na análise de expressão gênica em larga escala, estudos anteriores descreveram alterações transcricionais no músculo esquelético de indivíduos com DMD e em animais distróficos, incluindo o camundongo *mdx* e os modelos caninos (CXMDJ e Golden Retriever com distrofia muscular (GRMD)). A assinatura da expressão gênica que caracteriza o músculo distrófico mostra uma expressão alterada de genes envolvidos na resposta inflamatória, bem como no remodelamento da matriz extracelular, regeneração muscular e metabolismo (MAROTTA, M. *et al.*, 2009).

Em análises proteômicas comparativas de tecidos de modelos de animais estabelecidos, tais como o camundongo *mdx* e o cão GRMD, levaram a contribuições cruciais no campo da pesquisa da distrofia muscular, permitindo-nos explorar a complexidade dos vários passos fisiopatológicos envolvidos nesta doença. Mudanças na concentração de proteínas musculares fornecem novos desdobramentos sobre a patologia molecular da doença. Evidências crescentes sugerem que mecanismos secundários, como a alteração do sinal de chaves e vias metabólicas, podem desempenhar um importante papel (MARANHÃO, J.B. 2014).

Estudo da matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) do músculo esquelético é organizada de maneira hierárquica na qual o endomísio envolve cada fibra muscular, o perimísio envolve cada fascículo muscular e a epimísio envolve todo o corpo muscular. A principal proteína estrutural no esqueleto A MEC muscular é o colágeno, responsável por 1 a 10% do peso seco da massa muscular. Vários tipos de colágeno são expressos durante o desenvolvimento do músculo esquelético, incluindo colágeno tipo I, III, IV, V, VI, XI, XII, XIV, XV e XVIII. No entanto, o colágeno os tipos I e III predominam no epi-, peri e endomísio adulto. Como outro ECM dos tecidos mesenquimais, os proteoglicanos também estão presentes na MEC do músculo esquelético (BRANDAN, E. *et al.* 1987).

A MEC do músculo esquelético pode desempenhar um papel complexo no desenvolvimento muscular e regeneração. A MEC do músculo esquelético está envolvida na regulação de fatores de crescimento durante regeneração, agindo como um reservatório para eles. Estudos moleculares mostraram que certos fatores de crescimento se ligam a GAGs carregados negativamente, particularmente sulfato de heparano na MEC. Por exemplo, demonstrou-se que TGF- β 1 e - β 2 se ligam às cadeias GAG de sulfato de heparano proteoglicanos da decorina, e o fator de crescimento fibroblástico

(FGF) -1, -2 e -5 se liga a as cadeias GAG de sulfato de heparano em vários proteoglicanos. Enzimas na MEC, como metaloproteinases da matriz, collagenase e estromelisina, podem clivar moléculas GAG associadas ao fator de crescimento, permitindo a liberação dos fatores de crescimento necessários para a célula sinalização (NISHIMURA, T. *et al.*, 1997).

Fatores de crescimento e vários componentes da MEC, como fibronectina, sulfato de heparina, dermatan sulfato, sulfato de condroitina e ácido hialurônico ainda estejam presentes e parcialmente ativo mesmo após a descelularização. A remodelação da MEC durante a regeneração pode liberar fatores que ajudam na regeneração do tecido. Além disso, a MEC também pode participar da migração celular, particularmente, a migração de células satélites para o local da lesão. A migração celular envolve uma interação complexa entre as células e a matriz através da ligação de várias integrinas no ECM. Uma vez no local da lesão, o ECM direciona as células para o seu alinhamento adequado, permitindo transmissão de forças (HASHIMOTO, Y. *et al.*, 2011).

O uso de uma MEC descelularizada como suporte para o desenvolvimento de um músculo esquelético produzido por tecidos teve alguns resultados promissores preliminares e ganhou muita atenção como alternativa aos *scaffolds* projetados. O conceito de usar uma MEC descelularizada como *scaffold* na engenharia de tecidos decorre do fato de que as células dos tecidos se adaptam ao microambiente circundante, e uma melhor resposta tecidual pode ser esperada se é fornecido um microambiente quase “nativo”. Com sua superior biocompatibilidade e capacidade de guiar tecidos a MEC descelularizada tem sido amplamente aplicada na engenharia de substituir tecidos para órgãos como bexiga, uretra, traqueia, válvula cardíaca, pele e intestino delgado (LIN, C.H. *et al.*, 2014).

Os materiais biológicos do *scaffold* compostos por matriz extracelular foram utilizados com sucesso para reparar ou substituir uma variedade de tecidos doentes ou danificados, incluindo o tecido cardíaco, a saber, o miocrádio. No estudo de BADYLAK, S, *et al.*, 2005, tinha como objetivo avaliar as características de remodelação de um scaffold de matriz extracelular (MEC) quando usado como modelo para reparo do miocrádio em modelo porcino, e houve uma substituição completa dos suportes acelulares por uma mistura de tipos de tecido, incluindo tecido conjuntivo fibroso bem vascularizado, cartilagem, tecido conjuntivo adiposo e tecido do miocrádio.

O tecido do *scaffold* remodelado mostrou contratilidade espontânea e força contrátil máxima equivalente a 70% da força contrátil do miocárdio nativo adjacente.

A bexiga urinária, é o outro órgão estudado utilizando *scaffold* de matriz extracelular na medicina regenerativa. No estudo de KROPP, Bradley P. *et al.*, (1996) avaliou a submucosa do intestino delgado como possível material de aumento tecidual da bexiga. Todos os cães sobreviveram ao período de sobrevivência pretendido sem morbidade. Histologicamente, todas as três camadas (mucosa, músculo liso, serosa) da bexiga normal apresentaram evidências de regeneração. A submucosa do intestino delgado atuou como um *scaffold* para o aumento da bexiga através da regeneração e pode ser uma opção potencial para a reconstrução da bexiga.

O uso de *scaffold* composto por matriz extracelular também aplica-se ao pulmão. HILL, Ryan C. *et al.*, (2015), obtiveram resultados indicando que o *scaffold* pulmonar acelular de ratos é predominantemente composto por colágenos estruturais, com a maioria dessas proteínas encontradas na MEC insolúvel, uma fração que é frequentemente descartada usando métodos proteômicos amplamente aceitos. O procedimento de descelularização removeu mais de 98% das proteínas intracelulares avaliadas e retêm, em graus variados, proteoglicanos e glicoproteínas da MEC. A caracterização precisa de proteínas de ECM a partir de amostras de tecido ajudará a avançar os esforços de engenharia de órgãos, gerando uma leitura molecular que pode ser correlacionada com o resultado funcional para impulsionar a próxima geração de órgãos manipulados.

No recente estudo de Remuzzi, A. *et al.*, (2017), acerca da bioengenharia renal, verificou-se que através da produção de *scaffolds* acelulares e recelularização com células-tronco é uma estratégia potencial. Embora os protocolos para a obtenção de *scaffolds* de órgãos tenham sido desenvolvidos com sucesso, a recelularização de *scaffold* é mais desafiadora. Avaliaram o potencial de procedimentos de recelularização de *scaffold* renais *in vivo* e *in vitro*. Os resultados mostraram que os *scaffolds* acelulares implantados em ratos não podem ser repovoados com células hospedeiras e *in vitro* a recelularização é necessária. No entanto, obtiveram uma semeadura celular muito limitada e inconsistente ao usar diferentes protocolos de infusão, independentemente do local da injeção. Esses resultados destacaram as principais barreiras físicas que limitam a recelularização *in vitro* de estruturas renais acelulares e os obstáculos que devem ser investigados para avançar efetivamente essa estratégia para a medicina regenerativa.

Embora o implante de músculo esquelético descelularizado é um método promissor para a reconstrução do tecido muscular, a eficácia desses implantes varia. Acredita-se que os diferentes métodos aplicados para obter a descelularização sejam a principal causa dessa inconsistência. O processo de descelularização geralmente envolve uma série de tratamentos físicos, químicos e enzimáticos (GILLIES, Allison R. et al., 2011). No entanto, esses tratamentos podem, em certa medida, danificar a MEC e alterar suas propriedades bioquímicas, mecânicas e estruturais. Na avaliação dessas estratégias procura-se, a princípio, uma satisfatória remoção de células e do genética material seguido pela manutenção de proteínas estruturais. Além disso, costuma-se comparar as propriedades mecânicas e a ultraestrutura do tecido ou órgão antes e após o tratamento de descelularização (VALENTIN, JE. *et al.*, 2010).

Processos de descelularização de matriz extracelular (MEC)

Vários tipos de agentes químicos são utilizados na descelularização, incluindo surfactantes, ácidos e bases. Os surfactantes, os mais comuns agentes decelularizantes, normalmente funcionam através da lise de células através de desarranjo da membrana celular fosfolipídica. Esses agentes são classificados com base em sua carga, pois são iônico ou não iônico. Ácidos como ácido peracético e bases como hidróxido de sódio solubilizam a membrana celular e o material nuclear, utilizando suas propriedades carregadas intrinsecamente. O surfactante iônico amplamente utilizado, é o sódio sulfato de dodecil (SDS), que obtém sucesso em várias aplicações em descelularização devido à sua capacidade de remover com eficiência células e material genético. Os tratamentos com SDS cumprem os requisitos de remoção completa das células e eliminação de pelo menos 90% do DNA do hospedeiro em vários tipos de tecidos e órgãos, como por exemplo no músculo estriado esquelético (Petersen, T. H. *et al.*, 2012; GILBERT. T.W. *et al.* 2006).

O surfactante não iônico Triton X-100 é frequentemente utilizado para remover o restante de SDS na matriz. Essa prática tem sido especialmente prevalente na descelularização da perfusão de órgãos inteiros e também em imersão. O Triton X-100 não é apenas benéfico no processo de lavagem, mas também é comumente usado como um agente descelularizante sozinho. Como não é iônico, é menos severo que o SDS e, em última análise, menos prejudicial para a integridade estrutural do tecido. Em conjunção com hidróxido de amônio, remove completamente todo o DNA e mantém uma quantidade maior de colágeno I em comparação com tratamentos com SDS

isolado. Além disso, a ultraestrutura dos tecidos são bem preservadas após o processo de descelularização (MENDOZA-NOVELO, B. *et al.*, 2011).

Agitação mecânica e sonicação têm sido utilizadas simultaneamente com o tratamento químico para auxiliar na lise celular e na remoção de detritos celulares. A agitação mecânica pode ser aplicada usando uma placa de agitação magnética, um agitador orbital ou um rolo de baixo perfil. Não foram realizados estudos para determinar a magnitude ou a frequência ideal de sonicação para rompimento das células, mas um limpador ultrassônico padrão parece ser tão eficaz na remoção de material celular quanto a colocação do tecido em um agitador orbital. Em todos esses procedimentos, a velocidade ideal, o volume de reagente e o comprimento da agitação mecânica dependem da composição, volume e densidade do tecido. (WHITE, Lisa J. *et al.*, 2017; GILBERT, T.W. *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostraram o papel crucial desempenhado pelo ambiente 3D e pela MEC na regulação da identidade e função das células-tronco. As abordagens de bioengenharia tentaram combinar *scaffolds* naturais / sintéticos com células-tronco e fatores de crescimento para aplicação em medicina regenerativa. Os biomateriais precisam replicar as propriedades da MEC específica de um tecido, fornecendo um *scaffold* 3D onde as células-tronco podem preservar sua identidade, aderir, proliferar, diferenciar e gerar uma estrutura celular 3D semelhante ao tecido de interesse (HE, M. *et al.*, 2016).

Além disso, também é importante que os *scaffolds* têm uma boa taxa de biocompatibilidade e biodegradabilidade, a fim de promover a substituição progressiva por tecido recém-formado, sem induzir nenhuma resposta inflamatória adversa, que pode levar à rejeição de *scaffold* após implantação *in vivo*. Apesar da melhoria na fabricação de biomateriais nos últimos anos, há uma necessidade não atendida de desenvolver *scaffolds* que respeitem todas as características e dê suporte para o desenvolvimento de tecidos funcionais. A geração de *scaffolds* de MEC por meio de descelularização elimina conteúdo celular e nuclear, mas mantém atividade biológica, integridade mecânica e estrutura 3D do tecido da qual a MEC é derivada (URCIUOLO, A. *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo Geral

Realizar uma análise comparativa de cães acometidos pela distrofia muscular com cães não acometidos, a partir de um estudo da composição da matriz extracelular do músculo estriado esquelético controle e descelularizado.

3.2.Objetivos Específicos

3.2.1. Realizar a descelularização de músculo de cão distrófico e não-distrófico;

3.2.2. Verificar a deposição de colágenos, glicoproteínas, fibronectina e laminina na matriz extracelular, comparando músculos de cães distróficos com cães não-distróficos;

3.2.3. Verificar por análise histológica, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de varredura, a morfologia da matriz extracelular muscular de cães distróficos e cães não-distróficos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das amostras

O trabalho passou por aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (nº **7744050218**). As coletas foram em cães não-distróficos e cães distróficos provenientes do canil GRMD Brasil da FMVZ-USP. As coletas de músculo de cães não-distróficos foram realizadas em momentos de cirurgia ou em cães que acabaram de vir a óbito no Hospital Público Veterinário da ANCLIVEPA-SP. Dos cães distróficos foram realizadas coletas de animais que vieram a óbito por morte natural no canil GRMD Brasil.

Para acessar o tecido muscular foi realizada a incisão da pele, divulsão do subcutâneo e incisão da quadríceps femoral. Após a coleta, o fragmento muscular foi lavado em solução de PBS 1x (phosphate buffered saline) e passou posteriormente pelo protocolo de descelularização.

Tabela 1: Coleta de amostras

Músculo	CONTROLE		GRMD	
	Distrófico	Não distrófico	Distrófico	Não distrófico
Bíceps femoral	x	x	x	x
Vasto Lateral	x	x	x	x
Tibial Cranial	x	x	x	x
Intercostais	x	x	x	x
Músculo peitoral	x		x	
Bíceps braquial	x		x	

Tabela 1: Músculos esqueléticos coletados de animais não-distróficos e animais distróficos.

4.2. Descelularização de músculo

As amostras foram descelularizadas com SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 1% por 21 dias – com certo grau de variação a fim de alcançar uma satisfatória descelularização –, mantidas sob agitação a temperatura ambiente com trocas diárias do SDS. No último dia, foram realizadas 3 lavagens com Triton X-100, 15 minutos cada, seguido de lavagens com PBS 1x para remoção de qualquer solução detergente remanescente.

Posteriormente o material em parte foi fixado em paraformol 4% para as análises histológicas e microscopia eletrônica de varredura e em parte foi congelado para mensuração da concentração de DNA genômico e imunohistoquímica.

4.3. Análises Histológicas

As amostras controle (não descelularizadas) e experimentais (descelularizadas), foram fixadas em PFA 4% por 72 horas e submetidas ao protocolo de desidratação, diafanização e inclusão em parafina ou congelados sem fixação. Cortes de 5 micrômetros de espessura foram feitos e corados com Hematoxilina-Eosina para a avaliação da descelularização e visualização de possíveis núcleos remanescentes. A conservação e organização das fibras colágenas foram avaliadas por meio do método de coloração de Tricrômio de Masson.

Na coloração por ferro coloidal, após desparafinar as lâminas e hidratar com água destilada, permaneceu durante 3 minutos em solução de Ácido Acético Glacial 12%, posteriormente foi submetido à solução trabalho de Muller por 1 hora. Houve o enxágue em solução aquosa de ácido acético glacial 12% em 4 etapas, durante 3 minutos cada. As lâminas depois foram submetidas à solução de trabalho de Ferrocianeto de Potássio/Ácido Clorídrico por 20 minutos. Lavadas em água corrente por 5 minutos, enxaguadas em água destilada, foram contracoradas com solução corante de Van Gieson por 5 a 7 minutos ou solução corante de vermelho rápido por 5 minutos. Ao final, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina. Tendo por finalidade corar de vermelho as fibras colágenas e de cor preta os proteoglicanos.

Na coloração Gomori, a princípio as lâminas foram desparafinadas e hidratadas, depois oxidadas em permanganato de Potássio 0,5% por 5 minutos, lavadas em água

corrente por 2 minutos, submetidas à metabissulfito de Potássio 2% por 5 minutos, e lavadas em água corrente por 2 minutos. Posteriormente foram sensibilizadas em sulfato de amônio férrico 2% por 5 minutos, e lavadas em água corrente por 5 minutos e passadas em água destilada 3 vezes. Impregnando na solução de prata amoniacal (filtrando a solução sobre a lâmina) por 30 segundos foi desprezada a solução utilizada e lavada em água destilada rapidamente. Reduzidas em Formol 20% por 3 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Passadas em cloreto de ouro 0,2% por 10 minutos e lavadas em água destilada por 3 trocas, foram mergulhadas em metabissulfito de potássio por 5 minutos e lavadas em água destilada por 3 trocas. Logo após foram passadas em tiosulfato de sódio 2% por 5 minutos e lavadas em água corrente por 2 minutos. Por fim, as lâminas foram coradas em Hematoxilina por 5 segundos, desidratadas, diafanizadas e montadas. Esse tipo de coloração tem por finalidade corar de vermelho as fibras musculares, da cor verde as fibras colágenas e da cor preta os núcleos celulares.

A análise das lâminas histológicas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômio de Masson, Ferro coloidal e Gomori foram realizadas no 'Microscópio de Luz Nikon 80I'.

4.4. Fluorescência por DAPI

As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x estéril a cada 5 minutos, colocadas e solução DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), por 15min. Foram lavadas novamente com PBS. As lâminas foram montadas em solução Paramount, sendo cobertas com uma lamínula e realizada a fotomicrografia por microscópio de fluorescência.

4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foi realizada uma avaliação da estrutura do músculo não-distrófico e distrófico, tanto controle quanto o descelularizado. Para a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura foram utilizados fragmentos das amostras controle e das amostras descelularizadas. Após a fixação em paraformaldeído (PFA) 4% por no mínimo 72 horas, as amostras foram fragmentadas com lâminas de bisturi e lavadas em ultrassom por 24 minutos em água destilada, sendo feito a troca da água a cada 5 minutos. Após a lavagem as amostras foram acondicionadas em álcool 70% *overnight*. Posteriormente, foi realizada a desidratação utilizando-se concentrações crescentes de álcool, onde a

amostras passaram por duas imersões em álcool 80%, seguidas de imersões em álcool 90% por 5 minutos (com troca do álcool entre cada imersão) e três lavagens com álcool 100% por 10 minutos (cada imersão compreendendo duas trocas de solução).

4.6. Análise imunohistoquímica

As amostras de músculo controle e descelularizada incluídas em parafina foram seccionadas em micrótomo (# RM2265, Leica) e transferidas para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (Sigma, # p8920). As secções foram reidratadas em tampão citrato (1,83mM de ácido cítrico monohidratado e 8,9 mM de citrato de sódio desidratado tribásico, pH 6,0) em micro-ondas para recuperação antigênica. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 3% de peróxido de hidrogênio em H₂O destilada durante 30 minutos no escuro. A interação proteica não específica foi bloqueada com 2% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS durante 30 minutos. Anticorpos primários: anti-colágeno I (Rockland, # 600-401-103S, 1: 400), anti-colágeno III (Santa Cruz, # sc-8779, 1: 100), anti-colágeno IV (Quarteto, # 1- CO083-0, 1: 500), subunidade anti-laminina alfa-2 (BiossAntibodies # bs-8561R, 1: 200) e anti-fibronectina (NovusBiologicals # NBP1-91258, 1: 200), IgGanti-rato (clone Sigma-Aldrich # M5284;) e IgGanti-coelho (Abcam, # 27278) foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C. A reação foi detectada pelo kit Dako Advance HRP (Dako, # K6068) e DAB (Dako, # K3468), conforme as instruções do fabricante. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina. Entre cada passo, após a incubação do anticorpo, as lâminas foram lavadas em PBS contendo 0,2% de BSA. As lâminas foram fotografadas em Microscópio Nikon Eclipse 80I.

4.7. Concentração do DNA genômico (DNAg)

Após o processo de descelularização, as amostras foram submetidas a análise de DNA genômico remanescente para confirmar a eficiência do processo. O DNA genômico foi isolado a partir de 30 mg de tecido muscular descelularizado utilizando-se o Spin Kit Illustra Cells (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram digeridas com Proteinase K e tampão de lise a partir do kit a 56°C durante 2 horas. As amostras de DNAg purificadas foram analisadas em espectrofotômetro a 260nm (Nanodrop, ThermoScientific). Para todas as quantificações, foram analisadas duas repetições.

5. RESULTADOS

5.1 Coleta e processo de descelularização

Foram realizadas coletas de músculos de cães distróficos (conforme Tabela 1) que vieram à óbito por morte natural no canil GRMD-Brasil. Foram utilizadas amostras de oito cães, quatro cães distróficos e 4 cães com não-distróficos. O músculo peitoral superficial transverso e bíceps braquial foram inicialmente lavados em PBS 1x, posteriormente em EDTA por 30 minutos e deixados em solução de SDS 1%, sendo as trocas realizadas diariamente pelo período de 21 dias. Após este período realizou-se lavagem em Triton X-100 a 1%, 3 lavagens de 10 minutos cada e finalizou-se o processo com lavagem em PBS 1X. O resultado deste processo de descelularização encontra-se na Figura 1. Onde se observou um tecido translúcido, evidenciando uma matriz extracelular sem sinais macroscópicos de dano ao material descelularizado por SDS.

Figura 1: Coleta e descelularização de músculos distróficos. Em A: músculo peitoral superficial transverso de cão distrófico, em B: músculo bíceps braquial de cão distrófico antes do processo de descelularização. Em C e D os mesmos músculos após 14 dias de descelularização em SDS 1%, sob agitação.

5.2 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

Realizou-se a descelularização do músculo distrófico de forma eficiente, sendo seus resultados comprovados pela análise histológica (Figura 2), onde observa-se a ausência de núcleos nos cortes em B e D, somente a presença das fibras colágenas representadas pela coloração de HE. Em A e C histologia do músculo distrófico antes do processo de descelularização, podemos observar as fibras musculares nucleadas.

Figura 2: Fotomicrografia coloração por HE: Em A e C, respectivamente músculos bíceps braquial e peitoral superficial transverso antes do processo de descélularização. Em B e D, os mesmos músculos após o processo de descélularização em SDS 1%.

A descélularização mostrou-se eficiente, pois na figura A e C, observamos a estrutura celular presente, no perimísio e endomísio. Em contrapartida, na figura B e D, temos a completa ausência de componentes celulares, e vemos apenas o arcabouço da matriz extracelular.

Figura 3: Fotomicrografia coloração por HE: De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

Percebemos que no procedimento de coloração por Hematoxilina e Eosina, que houve uma descelularização da matriz dos músculos analisados, com ausência de células e evidência apenas do arcabouço da matriz com seus componentes protéicos. Nos músculos de cães não-distróficos vemos uma malha de matriz mais organizada, em contrapartida vemos uma diferença na matriz dos músculos de cães distróficos após a descelularização, um rearranjo não uniforme, evidenciando uma alteração da estrutura da matriz após passar pelo SDS.

Figura 4: Fotomicrografia coloração por Tricômio de Masson: De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

Pela análise histológica da coloração por Tricômio de Masson, verificamos a presença do colágeno na cor azul e da célula muscular na cor vermelha. Foi bem evidenciado a presença de tecido fibroso, composto por colágeno, que tão bem caracteriza um músculo distrófico que passa constantemente pelo processo de atrofia e regeneração. Vemos uma proeminência de colágeno na matriz do músculo de cães distróficos após a processo de descelularização, em detrimento da expressão da proteína na matriz do músculo de cães não-distróficos.

5.3. Fluorescência por DAPI

Ressaltando os resultados obtidos na Figura 2, realizamos a técnica de fluorescência por DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (figura 3). Nesta é possível observar em 'A' a presença de núcleos celulares em músculo controle (não descelularizado) e ausência de núcleos em 'B', músculo distrófico descelularizado, sendo possível observar somente a presença da matriz extracelular.

Figura 5: Análise de fluorescência por DAPI. Em A, músculo distrófico controle, observar presença de núcleos celulares. Em B, músculo distrófico descelularizado com SDS 1%, observar somente presença de matriz extracelular.

5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com a microscopia eletrônica de varredura, podemos verificar que além a descelularização ser eficiente, retirando as células musculares, houve uma alteração da arquitetura da matriz, onde as fibras que a compõem já não estavam numa conformidade e rigidez de uma matriz não-distrófica, apresentando as fibras colágenas interpostas à estrutura da matriz, corroborando com os outros resultados, de que verdadeiramente há uma alteração nos componentes da matriz e por sua vez na estrutura do arcabouço que compõe o músculo de um cão distrófico.

Figura 6: Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura. De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

5.5. Análise imunohistoquímica

Figura 7: Análise Imunohistoquímica (Colágeno) . De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

Pela análise imunohistoquímica, observamos que houve uma maior expressão da proteína colágeno, dos tipos I, III e V, nos músculos de cães distróficos, como esperado devido à fibrose característica no músculo que vive em processo constante de regeneração. Lembrando que há colágeno na constituição de um músculo não-distrófico.

Figura 8: Análise Imunohistoquímica (Laminina). De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

Figura 9: Análise Imunohistoquímica (Fibronectina) . De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

É sabido que a constituição básica da matriz é de proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, e de glicoproteínas alongadas como a fibronectina e laminina, que têm uma função de proporcionar adesão célula-matriz, além de glicosaminoglicanas e proteoglicanas que formam um leito constituído por um gel, onde se encontram imersos todos os constituintes da matriz. Sendo assim, notamos que a fibronectina juntamente com a laminina constituem o arcabouço que vemos sendo expresso numa matriz mesmo descelularizada, principalmente nos músculos de cães distróficos, onde ainda se mostram presentes as glicoproteínas após o processo de descelularização, todavia não mantendo a uniformidade da matriz extracelular.

Como esperado, a expressão de distrofina em músculos de cães distróficos não foi evidente, pois justamente é o elemento estrutural da matriz extracelular afetado diretamente pela distrofia muscular em cães, tendo como resultado a alteração dessa proteína e por consequência uma má funcionalidade ou ausência da mesma, que faz justamente a ligação entre a membrana da célula muscular com a matriz extracelular no tecido muscular.

Figura 10: Análise Imunohistoquímica (Distrofina) . De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos

Figura 11: Análise Imunohistoquímica (MyoD) . De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

O MyoD é um fator de transcrição que pertence à família de proteínas, que também inclui outras proteínas (como o Myf-5, a miogenina e o MRF4), controla a diferenciação de células da linhagem miogênica. O MyoD é um excelente marcador para células satélites musculares ativadas, sendo encontrado em elevados níveis no músculo em regeneração e de neonatos. Sua detecção ocorre doze horas após um traumatismo muscular, juntamente com outras proteínas relacionadas com a diferenciação de células da linhagem miogênica, como desmina e miogenina.

Vemos sendo expresso a MyoD nos músculos de cães distróficos, antes e depois da descclularização, o que não ficou evidenciado nos músculos de cães não-distróficos. Em suma, pelo processo de regeneração que passa um músculo de cão distrófico, justifica a aparição de expressão da proteína MyoD, afinal, a atrofia, a lesão celular e a regeneração torna-se um ciclo vicioso no músculo de um cão distrófico.

5.6. Concentração do DNA genômico (DNAg)

Figura 12: Quantificação de DNA genômico dos músculos de cães controles e decelularizados.

Vemos como houve uma redução quantitativa dos níveis de DNA nas amostras que passaram pela descclularização, evidenciado uma eficaz ação do protocolo utilizado.

5.7. Ferro Coloidal

Figura 13: Fotomicrografia coloração Ferro coloidal . De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

A substância fundamental intercelular é formada especialmente por glicosaminoglicanos (GAGs), também denominados mucopolissacarídeos ácidos, e compõe a porção principal dos proteoglicanos. A maioria dos GAGs presentes no tecido conjuntivo apresentam uma unidade repetitiva de dissacarídeo característica, que consiste em ácido urônico (ácido glicurônico) e hexosamina (glicosamina e galactosamina). Além de atuarem como preenchedoras de espaços, os GAGs atuam de diversas outras formas: regulando o crescimento celular; mudando o índice mitótico de replicação celular; proporcionando qualidade adesiva às células; mediante a comunicação intercelular; protegendo receptores de superfície.

O coloração de ferro coloidal, cora de vermelho as fibras colágenas e cora de azul os proteoglicanos, formados por GAGs. Verificamos nessa análise histológica, que o músculo de cães distróficos manteve um alta proporção de fibras colágenas, em detrimento dos GAGs, após o processo de descelularização, o que ainda víamos de certa forma presente antes do processo de descelularização, isto é, a descelularização teve um impacto nesses mucopolissacarídeos ácidos na matriz extracelular dos músculos de cães distróficos.

5.8. Coloração de Gomori

Figura 14: Fotomicrografia coloração Gomori. De A à D, temos os músculos controle/distróficos; de E à H, temos os músculos controle/ não-distróficos; de I à L, temos os músculos descelularizados/distróficos; e de M à P temos os músculos descelularizados/não-distróficos.

Nesse método de coloração também conhecido como Tricômio de Gomori, cora em vermelho as fibras musculares e citoplasma, cora em verde as fibras colágenas, e ainda cora em preto os núcleos das células. Com o resultado tivemos uma marcante presença de fibras colágenas na matriz dos músculos de cães distróficos, evidenciado claramente após o processo de descélularização, corroborando com os outros métodos, de que em toda a malha da matriz é predominante a presença de mais colágeno comparado aos cães não-distróficos. E também podemos verificar como as células musculares de cães distróficos foram atrofiadas e desarranjadas na matriz comparadas às células musculares de cães não-distróficos.

6. DISCUSSÃO

O protocolo de descelularização dos músculos esqueléticos caninos nesse trabalho obteve eficácia por meio da combinação de agentes químicos, os detergentes SDS e Triton X-100, em conjunto com agentes mecânicos (rotação orbital). No entanto, o sucesso do processo de descelularização foi dependente do tempo em que a amostra ficou imersa no SDS, onde pelo menos foram necessários 21 dias para ter algum grau satisfatório de descelularização.

Sem dúvida, as matrizes descelularizadas têm uma vantagem por mimetizar a arquitetura e organização de um tecido nativo, e ainda apresentar a mesma composição bioquímica, ativação de células hospedeiras, com propriedades biomecânicas e angiogênicas do tecido de interesse. Entretanto, o procedimento de descelularização pode alterar a matriz extracelular, suas propriedades estruturais e biomecânicas (URCIUOLO, Anna. *et al.*, 2018).

Zhao, Chenchen. *et al.*, 2018, desenvolveu um estudo de *scaffold* de junção miotendínea baseado num protocolo para obter um *scaffold* com estrutura bem preservada, assim como seus componentes e propriedades mecânicas. Apresentando uma baixa imunogenicidade e nenhuma citotoxicidade. A habilidade miogênica do scaffold primeiramente foi observada *in vitro*, onde verificou-se a superexpressão dos genes relacionados à miogênese, e por fim, o scaffold induziu a geração de novas miofibras *in vivo*. Da mesma forma, observamos, em um primeiro momento, a conservação da estrutura da matriz após a descelularização de músculos de cães não-distróficos, o que não vemos em músculos de cães distróficos.

Cheng C. W. *et al.*, dizem que as matrizes extracelulares de músculos esqueléticos criam um microambiente miogênico para células progenitoras. Tendo encontrado evidências até mesmo em estudos *in vivo*. As matrizes retêm um estoque de fatores biológicos que atraem células progenitoras e ainda estimulam proliferação e diferenciação.

Observou-se em outros trabalhos que o uso de detergentes ou tratamentos enzimáticos, como o uso do SDS, Triton X-100, tripsina, ou a combinação desses métodos, poderia remover os componentes celulares de quaisquer matrizes, inclusive a matriz extracelular de músculos esqueléticos (BORSCHER GH. *et al.*, 2004; WOLF MT. *et al.*, 2012). Inclusive no estudo desenvolvido por URCIUOLO, Anna. *et al.*, verificou-se que o procedimento de descelularização pode alterar a matriz extracelular, suas propriedades estruturais e biomecânicas, por isso decidiu-se comparar três

protocolos de descélularização, a fim de avaliar qual preservava a matriz da melhor forma. Tanto que os protocolos tiveram os seus prós e contras, por exemplo, os scaffolds de LatB (Latrunculina B) e DET (Tratamento com detergente enzimático) mantiveram as finas fibras estruturais, diferente do SDS, em que tais fibras foram ausentes após esse processo; mas em contrapartida o protocolo de SDS manteve os constituintes da matriz. Apesar dessa diferença, nesses três protocolos, observou-se a correta deposição em volta da matriz, formando novas miofibras, miofibras funcionais, juntos com vasos sanguíneos, invasão de nervos e junção muscular. Corroborando com o estudo URCIUOLO, Anna. *et al*, nossos resultados foram concordantes, no que diz respeito à preservação dos componentes da matriz extracelular após a descélularização, evidenciado nas proteínas analisadas, como fibronectina e laminina, proteínas de adesão muito importantes para regeneração tecidual.

Baseados na preservação de proteínas e arquitetura do tecido, uma eficiente regeneração depende da habilidade do scaffold manter as quimiocinas específicas, conhecidas por serem importantes na promoção de angiogênese e migração celular, reduzindo a inflamação, facilitando a repopulação e regeneração no local. O VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e a IGF (Fator de crescimento semelhante à insulina) respectivamente estão envolvidos na formação de vasos sanguíneos e suporte de crescimento muscular, como sua regeneração e manutenção. URCIUOLO, Anna. *et al.*, também demonstraram que as células-tronco foram hábeis para migrar sobre as estruturas descélularizadas, no complexo meio 3D da matriz, a partir da presença de fibroblastos, onde essas células tronco colonizaram e realizaram a miogênese no tecido muscular; função essa desempenhada pelos produtos secretados pelos fibroblastos, como o colágeno VI e a fibronectina, que são proteínas estruturais da matriz extracelular, influenciando a dinâmica das células tronco, e propiciando a regeneração do músculo onde foi lesado ou prejudicado de alguma forma.

Nossos resultados encontrados com os GAGs, onde o teor de GAGs diminuiu após o processo de descélularização por SDS, estão na mesma linha do que foi observado por LIN, CHIH-HSUN. *et al.*; foi observado que diferente do conteúdo de colágeno – que manteve o seu teor nas duas situações – antes e depois da descélularização, observamos uma redução substancial no conteúdo de GAG para todos os grupos de matriz descélularizada. A diminuição no conteúdo de GAG pode ser devido à remoção de GAGs associados à membrana celular. Foi relatado que aproximadamente 30% dos GAGs estão associados às membranas celulares (Gilbert,

T.W. *et al.*,). Portanto, é provável que esses GAGs possam ser removidos juntamente com a interrupção do sarcolema e da membrana celular durante o processo de descelularização.

É claro que os tratamentos físicos, enzimáticos e químicos podem ter efeitos substanciais na composição, no comportamento mecânico e na resposta do hospedeiro aos scaffolds biológicos derivados da descelularização de tecidos e órgãos nativos, e podem ter implicações importantes para o uso subsequente *in vitro* e aplicações *in vivo*. No estudo de GILBERT. T.W. *et al.*, (2006), observou-se que a remoção de proteínas adesivas e GAGs do scaffold poderia retardar a migração celular no arcabouço e a bioatividade do próprio scaffold. A interrupção da rede de colágeno pode alterar o comportamento mecânico e a cinemática das fibras de colágeno do scaffold, o que pode afetar a capacidade de carga do arcabouço e alterar o ambiente mecânico ao qual as células estão expostas. A degradação é outro fator importante que se relaciona ao comportamento mecânico e à bioatividade do scaffold que pode ser afetado pelos tratamentos de descelularização. Os tratamentos químicos podem comprometer o scaffold da MEC de uma maneira que o torne mais suscetível à degradação enzimática *in vivo*, o que levaria a uma rápida diminuição na resistência do scaffold.

No estudo de WHITE, Lisa J. *et al.* (2017) descreveram um método de descelularização do músculo esquelético intacto sem o uso de detergentes ou enzimas proteolíticas. O método utilizou interrupção de actina por tratamento com latrunculina B, lise celular por choque osmótico, despolimerização de miosina por exposição a solução salina de alta força iônica e tratamento com DNase I para remover o DNA residual do músculo esquelético. Esse método removeu com sucesso as fibras musculares e os componentes sarcômicos degradados no tecido muscular sem alterar a estrutura da MEC ou as propriedades mecânicas.

Por fim, WOLF MT, *et al.*, utilizando um protocolo com 0,2% Tripsina e 0,2% EDTA a 37°C, observaram que a quantidade e tamanho do conteúdo de DNA residual após a descelularização para cada preparação de matriz extracelular de músculo foi quantificada, e mostrou-se significativamente reduzida, $7,42 \pm 1,67$ ng de DNA / mg de peso seco em comparação com o 1549 ± 489 ng de DNA / mg de peso seco encontrado no tecido muscular nativo. A análise histológica da matriz extracelular de músculo não mostrou evidência de material nuclear intacto em H & E (hematoxilina e eosina) ou DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) em comparação com o músculo nativo. Não havia bandas de DNA claramente visíveis após a separação em gel de agarose a 2%,

enquanto o músculo nativo mostrou uma variedade de fragmentos de DNA. Esses valores atenderam aos critérios de descelularização descritos anteriormente por outros autores. Em nosso protocolo de descelularização, utilizando SDS 1%, por imersão e agitação das amostras, levamos 21 dias para alcançar um nível satisfatório de descelularização.

7. CONCLUSÃO

A distrofia muscular que acomete cães GRMD, comparada à distrofia muscular de Duchenne, tem um efeito também devastador na musculatura esquelética em cães distróficos. Sendo assim, esse modelo canino foi satisfatório, pois permitiu analisarmos por meio de vários métodos histológicos e imunohistoquímicos, alterações na matriz extracelular, que trouxe à luz algumas evidências, como aumento do colágeno na matriz, bem como a preservação de fibronectina e laminina, e diminuição do teor de GAG, após a descelularização, de forma qualitativa e não quantitativa.

Com a matriz que encontramos e o estado de seus constituintes, podemos dizer que a descelularização por SDS permitiu termos um *scaffold* de músculo, com potenciais de regeneração celular, numa futura, mas não distante recuperação de lesões musculares por diversas doenças, como as distrofias. A terapêutica desses casos clínicos tem ótimas possibilidades para desbravar novos horizontes, onde uma matriz descelularizada e orgânica poderá ser utilizada para recuperar um tecido lesado.

A descelularização completa da maioria dos tecidos exigirá uma combinação de tratamentos físicos, enzimáticos e químicos, e o protocolo dependerá do tecido de interesse. É geralmente desejável usar o protocolo mais suave possível que produza um material acelular sem romper o componente estrutural e funcional da MEC. Portanto, concluímos com este trabalho ser possível obter uma ferramenta para estudo de estruturas, tais como a matriz extracelular, em condições patológicas.

A ciência permite enxergar coisas que ainda não eram vistas por ninguém, e por esse estudo e toda a imensidão de outros estudos, discernimos que nossos resultados contribuirão para estudos desenvolvidos em prol do restabelecimento de um órgão ou tecido, como o tecido muscular esquelético.

REFERÊNCIAS

- MOU, Younss Ait et al. Altered myofilament structure and function in dogs with Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology*, [s.l.], v. 114, p.345-353, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.12.008>.
- AMENTA, Peter S. et al. The Extracellular Matrix is an Integrated Unit: Ultrastructural Localization of Collagen Types I, III, IV, V, VI, Fibronectin, and Laminin in Human Term Placenta. *Collagen And Related Research*, [s.l.], v. 6, n. 2, p.125-152, jun. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0174-173x\(86\)80021-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0174-173x(86)80021-8).
- BADYLAK, S., GEDDES, L., GEDDES, L. e OBERMILLER, J. (2005). Matriz extracelular para reparo do miocárdio. *O Fórum de Cirurgia Cardíaca*, 6 (2), E20-E26. <https://doi.org/10.1532/hsf.917>.
- BORSCHER GH, DENNIS RG, KUZON WM. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on anacellular scaffold. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 113:595–602. doi:10.1097 / 01.PRS.0000101064.62289.2F
- BRANDAN, Enrique; INESTROSA, Nibaldo C.. Isolation of the heparan sulfate proteoglycans from the extracellular matrix of rat skeletal muscle. *Journal Of Neurobiology*, [s.l.], v. 18, n. 3, p.271-282, maio 1987. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/neu.480180303>.
- CARBERRY, Steven et al. Proteomics reveals drastic increase of extracellular matrix proteins collagen and dermatopontin in the aged mdx diaphragm model of Duchenne muscular dystrophy. *International Journal Of Molecular Medicine*, [s.l.], v. 30, n. 2, p.229-234, 18 maio 2012. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2012.1006>.
- Collins, C. and Morgan, J. (2003), Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *International Journal of Experimental Pathology*, 84: 165-172. doi:10.1046/j.1365-2613.2003.00354.x
- CORDOVA, Gonzalo et al. Combined Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy to Optimize Treatment Efficacy. *Frontiers In Genetics*, [s.l.], v. 9, p.1-8, 10 abr. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2018.00114>.
- FALZARANO, Maria Sofia; PASSARELLI, Chiara; FERLINI, Alessandra. Nanoparticle Delivery of Antisense Oligonucleotides and Their Application in the Exon Skipping Strategy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Nucleic Acid Therapeutics*, [s.l.], v. 24, n. 1, p.87-100, fev. 2014. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/nat.2013.0450>.
- GAIAD TP, Araujo KPC, Serraõ JC, Miglino MA, Ambrósio CE (2014) Motor Physical Therapy Affects Muscle Collagen Type I and Decreases Gait Speed in Dystrophin-Deficient Dogs. *PLoS ONE* 9(4): e93500. doi:10.1371/journal.pone.0093500

GILBERT, T.W. *et al.* Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27 (2006) 3675–3683.

GILLIES, Allison R. *et al.* Method for Decellularizing Skeletal Muscle Without Detergents or Proteolytic Enzymes. *Tissue Engineering Part C: Methods*, [s.l.], v. 17, n. 4, p.383-389, abr. 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0438>.

GUZMÁN, O.R.C; GARCÍA, A.L.C; RODRIGUEZ-CRUZ, M. Muscular dystrophies at different ages: metabolic and endocrine alterations. *International journal of endocrinology* (2012).

HASHIMOTO, Y; FUNAMOTO, S; KIMURA, T; NAM, K; FUJISATO, T; KISHIDA, A. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2011; 32:7060–7067.

HASLETT, J. N., SANOUDOU, D., KHO, A. T., HAN, M. *et al.*, Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *Neurogenetics* 2003, 4, 163–171.

HE, M. *et al.* Optimization of SDS exposure on preservation of ECM characteristics in whole organ decellularization of rat kidneys. *Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, [s.l.], v. 105, n. 6, p.1352-1360, 8 abr. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.33668>

HESLOP, L., MORGAN, J. E., PARTRIDGE, T. A., Evidence for myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J. Cell Sci.* 2000, 113 (Pt 1), 2299–2308.

HILL, Ryan C. *et al.* Quantification of Extracellular Matrix Proteins from a Rat Lung Scaffold to Provide a Molecular Readout for Tissue Engineering. *Molecular & Cellular Proteomics*, [s.l.], v. 14, n. 4, p.961-973, 8 fev. 2015. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.m114.045260>.

KENDALL, G. C., MOKHONOVA, E. I., MORAN, M., SEJBUK, N. E., WANG, D. W., SILVA, O., *et al.* (2012). Dantrolene enhances antisense-mediated exon skipping in human and mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4:164ra160. doi: 10.1126/scitranslmed.3005054

KORNEGAY, J.N. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*. 2017 19;7(1):9.

KORNEGAY, J.N.; Childers, M. K. Canine inherited dystrophinopathies and centronuclear myopathies. In: Childers MK, editor. *Regenerative medicine for degenerative muscle diseases*. Series title: stem cell biology and regenerative medicine. New York: Humana Press; 2016. p. 309–29.

Kornegay, J.N. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle* 7, 9 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0124-z>

KROPP, Bradley P. et al. Regenerative Urinary Bladder Augmentation Using Small Intestinal Submucosa: Urodynamic and Histopathologic Assessment in Long-term Canine Bladder augmentations. *Journal Of Urology*, [s.l.], v. 155, n. 6, p.2098-2104, jun. 1996. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(01\)66117-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(01)66117-2).

KUSUMA, G.D; BRENNECKE, S.P; O'CONNOR, A.J; KALIONIS, B; HEATH, D.E. Decellularized extracellular matrices produced from immortal cell lines derived from different parts of the placenta support primary mesenchymal stem cell expansion. *Plos one* (2017).

LEONEL, L.C.P.C; DE CARVALHO MIRANDA, C.M.F; DE MORAES COELHO, T; FERREIRA, G.A.S; CAÑADA, R.R; MIGLINO, M.A; LOBO, S.E. Decellularization of placentas: establishing a protocol.

LIN, CHIH-HSUN. *et al.* Evaluation of decellularized extracellular matrix of skeletal muscle for tissue engineering. *Int J Artif Organs* 2014; 37 (7): 546-555.

MARANHÃO, J.B. evolução comparativa da progressão da distrofia e dos níveis de TNF- α e TGF- β em diferentes músculos do camundongo mdx. 2014

MAROTTA, M., RUIZ-ROIG, C., SARRIA, Y., PEIRO, J.L. *et al.*, Muscle genome-wide expression profiling during disease evolution in mdx mice. *Physiol. Genomics* 2009, 37, 119–132.

MCGREEVY, J.W; HAKIM, C. H; MCINTOSH, M.A; DUAN, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *The company of biologists* (2015).

NAKAMURA, A. (2017). Moving towards successful exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J. Hum. Genet.* 62, 871–876. doi: 10.1038/jhg.2017.57.

NISHIMURA, T; OJIMA, K; HATTORI, A; TAKAHASHI, K. Developmental expression of extracellular matrix components in intramuscular connective tissue of bovine semitendinosus muscle. *Histochem Cell Biol.* 1997; 107:215–221

OGURA, Y; TAJRISHI, M.M; SATO, S; HINDI, S.M; KUMAR, A. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. *Frontiers in cell and developmental biology* (2014).

PETERSEN, Thomas H. et al. Matrix Composition and Mechanics of Decellularized Lung Scaffolds. *Cells Tissues Organs*, [s.l.], v. 195, n. 3, p.222-231, 2012. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000324896>.

PORTER, J. D., MERRIAM, A. P., LEAHY, P., GONG, B. et al., Temporal gene expression profiling of dystrophin-deficient (mdx) mouse diaphragm identifies conserved and muscle groupspecific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13, 257–269.

QING Q, QIN T. Optimal method for rat skeletal muscle decellularization. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2009; 23:836–839.

RAYAVARAPU, S., COLEY, W., CAKIR, E., JAHNKE, V. et al., Identification of disease specific pathways using in vivo SILAC proteomics in dystrophin deficient mdx mouse. *Mol. Cell. Proteomics* 2013, 12, 1061–1073

REMUZZI, A., FIGLIUZZI, M., BONANDRINI, B. et al. Avaliação Experimental da regeneração Renal por Recelularização de Órgãos. *Sci Rep.* 7, 43502 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep43502>

ROBRIQUET, F., LARDENOIS, A., BABARIT, C., LARCHER, T. et al., Differential Gene expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation. *PLoS One* 2015, 10, e0123336.

SALMANINEJAD A, VALILOU SF, BAYAT H, EBADI N, DARAEI A, YOUSEFI M, NESAEI A, MOJARRAD M. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): An updated review of common available therapies. *Int J Neurosci.* 2018;19:1-24.

SKUK, D., GOULET, M., ROY, B., PIETTE, V. et al., First test of a “high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul. Disord.* 2007, 17, 38–46.

URCIUOLO, ANNS. *et al.*, Decellularised skeletal muscles allow functional muscle regeneration by promoting host cell migration. *Scientific Reports* | (2018) 8:8398 | DOI:10.1038/s41598-018-26371-y

VALENTIN, JE; TURNER, NJ; GILBERT, TW; BADYLAK, SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials.* 2010;31(29): 7475-7484.

VALENTINE, B. A., COOPER, B. J., DE LAHUNTA, A., O’QUINN, R., BLUE, J. T., Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J. Neurol. Sci.* 1988, 88, 69–81.

WHITE, Lisa J. et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomaterialia*, [s.l.], v. 50, p.207-219, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.033>.

WOLF MT, DALY KA, REING JE, BADYLAK SF. Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. *Biomaterials.* 2012; 33:2916–2925

YI, Sheng . et al, Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2017, 12, 233-246.

ZHAO, Chenchen et al. Preparation of decellularized biphasic hierarchical myotendinous junction extracellular matrix for muscle regeneration. *Acta Biomaterialia*, [s.l.], v. 68, p.15-28, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.035>.