

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

VITÓRIA FRIAS BATISTA

Recelularização da matriz extracelular de músculo de cães saudáveis e distróficos

SÃO PAULO

2021

VITÓRIA FRIAS BATISTA

Recelularização da matriz extracelular de músculo de cães saudáveis e 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 Obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Dra. Paula Fratini

SÃO PAULO

2021

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4033
FMVZ

Batista, Vitória Frias
Recelularização da matriz extracelular de músculo de cães saudáveis e distróficos/
Vitória Frias Batista. – 2021.
108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2021.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Fratini.

1. Distrofia muscular. 2. Descelularização. 3. Recelularização. 4. Matriz extracelular. 5.
Cultivo celular. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 18 de dezembro de 2020
CEUA N 4520070119

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Paula Fratini
Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Recelularização da matriz extracelular de músculo de cães saudáveis e distróficos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 007310)

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 Emenda (versão de 14/dezembro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Caro Sr.(a) Avaliador (a), Em resposta a solicitação referente ao parecer de emenda deste projeto (4520070119), salientamos que houve um equívoco na solicitação da mesma, enviada para outro projeto (7744050218). Destacamos aqui que mesma solicitação já foi previamente analisada pelo avaliador. Ressaltamos que no item "origem" o mesmo só aparece a opção "animais provenientes de outros projetos". Esta solicitação coletará novas amostras, conforme TCLE incluso no documento anexo de 02 animais (cães de 08 a 12 anos) que vieram à óbito por morte natural. Desta forma, não utilizaremos materiais provenientes de outros projetos já aprovados nesta solicitação adicional. Nos colocamos a disposição para qualquer tipo de esclarecimento necessário. Atenciosamente, Paula Fratini Ao Sr. (a) Avaliador (a) "Vimos por meio desta solicitar a Emenda do projeto de mestrado da aluna Vitória Frias Batista, no sentido de acrescentar 02 (duas) coletas de amostras de músculos de cães velhos (bíceps femoral). Justifica-se a necessidade desta emenda para complementação dos estudos conduzidos e resultados finais da dissertação em questão. As amostras serão coletadas após a aprovação desta CEUA. Estas serão coletadas em Clínica Particular (Termo de Doação anexo, assinado pelo responsável), por meio da doação espontânea do tutor do animal (Modelo de TCLE anexo). Foi incluída a justificativa da mesma (necessidade de coleta de material com idade superior ao já aprovado por esta CEUA), bem como as alterações no projeto foram incluídas e destacadas em cor vermelha. Solicitamos urgência no parecer, visto a defesa da aluna em janeiro de 2021. Nos colocamos a disposição para maiores esclarecimentos. Atenciosamente, Dra. Paula Fratini / Vitória Frias Batista".

Comentário da CEUA: "Não existem óbices para a aprovação da coleta de tecido de dois cadáveres. O termo de anuência da clínica foi devidamente apresentado, assim como o modelo do TCLE. Solicitamos que o formulário CONCEA dos relatórios seja preenchido como zero quando o número se referir a cadáveres. "

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-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BATISTA, Vitória Frias

Título: **Recelularização da matriz extracelular de músculo de cães saudáveis e 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 Obtenção do Título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô **Alberto Batista** e ao meu avô **José Venicius Marinho Frias**. Apesar de não estarem mais aqui, tenho certeza estão felizes por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe **Karla Frias** e meu pai **Paulo Batista**, por terem me trazido a este mundo e por terem me dado todo o suporte desde o início. O apoio de vocês foi essencial em toda a trajetória. Tudo que sou hoje, devo a vocês. Ao meu irmão **Pedro Frias**, agradeço pelo apoio e pela parceria. A todos os outros membros da minha família agradeço por sempre acreditarem em mim e darem forças para seguir meus sonhos. Amo vocês!

Ao meu namorado **Sherlon Ruy da Silva**, agradeço por ser meu companheiro, sempre me apoiar e torcer por mim. Seu suporte foi crucial para continuar e não desistir. Aprendo muito com você e quero um dia ser tão empenhada quanto você. Obrigada por me ouvir e ser meu fã, eu também sou sua fã. Amo você!

Agradeço a minha orientadora **Paula Fratini**, por ter acreditado no meu potencial e ter sido grande fonte de aprendizado a partir de sua vasta experiência em toda a trajetória. Sempre se dispôs a ajudar e me orientar e ao final de tudo, se tornou não somente orientadora, mas também uma grande amiga. Obrigada!

Agradeço aos meus amigos **Beatriz Alonso**, **Cristovam Pereira** e **Lucas Borges** por torcerem por mim e me ouvirem em momentos de difíceis, mas também em momentos bons.

Ao meu amigo **Gustavo Schiavo**, agradeço por ter me ajudado ao longo de todo o meu trabalho. Sua ajuda e suporte foram peças chave em todo o processo. Espero ter contribuído na sua tese, tanto quanto você contribuiu na minha dissertação. Além de colega de laboratório e irmão de orientadora, também se tornou um grande amigo.

Agradeço a **Ana Cláudia Carreira** e **Rodrigo Barreto**, por compartilharem todo seu conhecimento conosco e contribuírem com análises essenciais a este trabalho. Obrigada!

Agradeço a **Rose Eli Rici**, que apesar da pandemia, se dispôs a vir a faculdade fazer nossas análises de microscopia sempre que foi necessário através do **Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem (CADI)** na FMVZ-USP. Obrigada!

Ao **Ronaldo Agostinho**, técnico do laboratório de histologia, agradeço por sempre se dispor a me ajudar e compartilhar todo seu conhecimento.

Agradeço a professora **Maria Angélica Miglino**, juntamente a agência **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio recebido pelo Projeto Temático (2014/50844-3) para realização deste trabalho.

Aos cães distróficos **Zé e Frank** e aos cães não distróficos, agradeço por tornarem possível a realização deste trabalho e de tantos outros através da utilização de amostras dos mesmos. Zé e Frank foram cães muito especiais no nosso canil (GRMD Brasil) e tenho certeza que os cães não distróficos foram muito especiais para seus tutores quando vivos.

Agradeço a **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, uma das melhores Instituições de ensino no país, pela realização da minha dissertação de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 88882.327831/2019-01

Por fim, agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres**, que me permitiu realizar este trabalho, e por me orgulhar em obter a titulação em um Programa de excelência nota 7 CAPES.

RESUMO

BATISTA, V. F. **Recelularização da matriz extracelular de músculo de cães saudáveis e distróficos** [Recellularization of the extracellular muscle matrix of healthy and dystrophic dogs]. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária de caráter progressivo causada por mutação no gene produtor da proteína distrofina, responsável por ligar o citoesqueleto da célula muscular a matriz extracelular (MEC). Além de humanos, outros animais podem apresentar distrofias musculares, podendo ser utilizados como modelos para o estudo de distrofias musculares em humanos. O modelo animal mais utilizado é o modelo de Distrofia Muscular do *Golden Retriever* (GRMD). Os estudos de distrofias musculares podem ser associados a diversas áreas, como a Bioengenharia de tecidos, área que visa a utilização de MEC descelularizadas (*scaffolds*) para reparação/substituição de órgãos e tecidos, porém estes *scaffolds* também podem servir como ferramenta para estudo de MEC em doenças. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a caracterização de alguns componentes da MEC distrófica, sugerir se uma MEC distrófica pode ser um possível biomaterial para medicina regenerativa e a recelularização de MEC distróficas para observação da relação célula-matriz. Para realização deste trabalho, músculos bíceps femorais distróficos e não distróficos foram descelularizados com protocolo de utilização de SDS a 1% e passaram por análises de quantificação de DNA e fluorescência por DAPI para validação da descelularização e análises histológicas (colorações), imunohistoquímica e de Microscopia Eletrônica de Varredura para avaliação da composição, ultraestrutura e preservação das MEC distróficas e não distróficas. Como resultados, obtivemos as quantificações de DNA que alcançaram quantidade inferior a 50ng de DNA por mg de tecido e na fluorescência por DAPI não foram visualizados núcleos celulares nos tecidos descelularizados. Pelas análises histológicas foi possível observar a ausência de células nos tecidos descelularizados e a preservação de fibras colágenas da MEC. Pela imunohistoquímica, não foram observadas grandes diferenças nos componentes da MEC de músculos distróficos quando comparados com músculos não distróficos. Quando observadas, as células utilizadas para recelularização dos *scaffolds* apresentaram maior taxa de proliferação quando em contato com o *scaffold* muscular e o protocolo de esterilização do *scaffold* foi eficiente, já que os testes para detecção de micoplasma foram negativos. Foi observado o aumento da quantidade de DNAg após a recelularização dos *scaffolds* e pela MEV são visíveis camadas de células sobre a matriz extracelular. Concluímos que a MEC de músculo distrófico não interfere na diferenciação e adesão celular quando comparadas às MEC de

músculo não distrófico. Embora o aumento de distrofina tenha sido observado em alguns processos de recelularização, mais estudos precisam ser realizados para comprovação deste dado.

Palavras-chave: Distrofia Muscular. Descelularização. Recelularização. Matriz Extracelular. Cultivo Celular.

ABSTRACT

BATISTA, V. F. *Recellularization of the extracellular muscle matrix of healthy and dystrophic dogs* [Recelularização da matriz extracelular de músculo de cães saudáveis e distróficos]. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive hereditary disease caused by a mutation in the gene producing the dystrophin protein, responsible for linking the cytoskeleton of the muscle cell to the extracellular matrix (ECM). In addition to humans, other animals may have muscular dystrophies and can be used as models for the study of muscular dystrophies in humans. The most used animal model is the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) model. Muscular dystrophy studies can be associated with several areas, such as tissue bioengineering, an area that aims to use decellularized ECM (scaffolds) for repairing / replacing organs and tissues, but these scaffolds can also serve as a tool for studying the ECM in diseases. Therefore, the objective of this work was to characterize some components of the dystrophic ECM, to suggest whether a dystrophic ECM may be a possible biomaterial for regenerative medicine and the recellularization of dystrophic ECM to observe the cell-matrix relationship. To perform this work, dystrophic and non-dystrophic femoral biceps muscles were decellularized using a 1% SDS protocol and underwent DNA quantification and fluorescence analyzes by DAPI to validate decellularization and histological (staining), immunohistochemistry and Scanning Electron microscopy analyzes to evaluate the composition, ultrastructure and preservation of dystrophic and non-dystrophic ECM. As a result, we obtained the DNA quantifications that reached a quantity of less than 50ng of DNA per mg of tissue and in the fluorescence by DAPI, cell nuclei were not seen in the decellularized tissues. Through histological analyzes it was possible to observe the absence of cells in the decellularized tissues and the preservation of collagen fibers of the ECM. Due to immunohistochemistry, no major differences were observed in the ECM components of dystrophic muscles when compared with non-dystrophic muscles. When observed, the cells used to recellularize the scaffolds showed a higher proliferation rate when in contact with the muscle scaffold and the scaffold sterilization protocol was efficient, since the tests for mycoplasma detection were negative. An increase in the amount of DNA_g was observed after the scaffolds were recellularized and by SEM, layers of cells are visible on the extracellular matrix. We conclude that the ECM of dystrophic muscle does not interfere with cell differentiation and adhesion when compared to the ECM of non-dystrophic muscle. Although

the increase in dystrophin has been observed in some recellularization processes, more studies need to be carried out to prove this data.

Keywords: Muscular dystrophy. Decellularization. Recellularization. Extracellular Matrix. Cell Culture.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

3T3 – Fibroblastos de linhagem 3T3

ATB – Antibiótico

BSA - albumina de soro bovino

CD44 – Molécula de adesão celular teleguiada

CD73 - *Cluster* de diferenciação 73

CD90 - *Cluster* de diferenciação 90

CD105 - Glicoproteína de membrana tipo I

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CO₂ - Dióxido de carbono

CTGF - Fator de crescimento de tecido conjuntivo

CTMg - Células-Tronco Mesenquimais de gordura

CXMD_J - Distrofia muscular canina ligada ao X no Japão

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DMB – Distrofia Muscular de Becker

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne/*Duchenne Muscular Dystrophy*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ECM – *Extracellular matrix*

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

fCTM - *mesenchymal fat stem cells*

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FN – Fibronectina

GAGs – Glicosaminoglicanos

gDNA – DNA genômico

GRMD – Distrofia Muscular do Golden Retriever/*Golden Retriever Muscular Dystrophy*

H&E - Hematoxilina-Eosina

HSPGs - Proteoglicanos de sulfato de heparan

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina

IPSC - Células tronco pluripotentes induzidas

M – Músculo

MD – Músculo distrófico

Mm – Músculos
MN – Músculo não distrófico
MEC – Matriz Extracelular
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MMP2 – Metaloproteínase 2
MRFs – Fatores reguladores da miogênese
mRNA – RNA mensageiro
MyoD - Gene determinante miogênico
PBS – Tampão Fosfato Salino/*Phosphate Buffered Saline*
PCNA - Antígeno nuclear de célula proliferante
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - Reação em cadeia da polimerase
PFA – Paraformaldeído
PGs – Proteoglicanos
PLGA - Ácido glicólico polilático
Rpm – rotação por minuto
SDS – (*Sodium Dodecyl Sulfate*) – Dodecil Sulfato de Sódio
SEM – *Scanning Electron Microscopy*
SLRPs - Proteoglicanos ricos em leucina
TGFβ - Fator de crescimento transformador beta
TGFβ1 - Fator de crescimento transformado beta 1
TIMP1 – Inibidor de metaloproteínase I
UV - Luz Ultravioleta
VEGF – Fator de Crescimento Vaso Endotelial

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO I)

Artigo I - Caracterização de matrizes extracelulares musculares distróficas

- Figura 1** – Desenho experimental dos materiais e métodos utilizados no trabalho.....35
- Figura 2** - Visão macroscópica de músculos bíceps femorais antes (controle) e após a descclularização (descclularizado).....40
- Figura 3** - Marcação fluorescente por DAPI e quantificação de DNA genômico em músculos (Mm.) bíceps femorais descclularizados (descclularizado) e não descclularizados (controle).....41
- Figura 4** - Mm. bíceps femorais de cães distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4), controle (A-D e I-L) e descclularizados (E-H e M-P) pelas colorações Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Masson.....43
- Figura 5** - Mm. bíceps femorais de cães distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4), controle (A-D e I-L) e descclularizados (E-H e M-P) pelas colorações Tricromo de Gomori e Ferro Coloidal.....44
- Figura 6** - Mm. bíceps femorais de cães distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4), controle (A-D e I-L) e descclularizados (E-H e M-P) pelas colorações Azul de Alcian e Safranina O.....45
- Figura 7** - Mm. bíceps femorais de cães distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4), controle (A-D e I-L) e descclularizados (E-H e M-P) pela coloração Picrossírius.....46
- Figura 8** – Microscopia Eletrônica de Varredura de Mm. bíceps femorais controle (A-D) e descclularizados (E-H) de cães distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4)....47
- Figura 9** – Quantificação de colágenos totais (A) e de marcação imunohistoquímica (B-F) em músculos controle e descclularizados.....48

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO II)

Artigo II – Recelularização de músculos caninos e o papel de sua matriz extracelular na distrofia muscular

- Figura 1** - Desenho experimental da recelularização de *scaffolds* musculares.....60
- Figura 2** - Imunocitoquímica de células musculares de cão não distrófico.....68
- Figura 3** - Imunocitoquímica de células musculares de cão distrófico.....69
- Figura 4** - Imunocitoquímica de células fibroblásticas de linhagem 3T3.....70
- Figura 5** - Imunocitoquímica de células tronco mesenquimais de gordura.....71
- Figura 6** - Citometria de células tronco mesenquimais de gordura e fibroblastos 3T3 e células musculares distróficas e não distróficas.....72
- Figura 7.** Teste de PCR para detecção de Micoplasma em meios de cultivo utilizados na recelularização de *scaffolds* musculares.....73
- Figura 8.** Teste de Resazurina em *scaffolds* musculares.....74
- Figura 9.** Quantificação de DNA genômico em *scaffolds* de músculos distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**) após a recelularização (7 e 14 dias) com células tronco mesenquimais de gordura, fibroblastos 3T3, células musculares distróficas e células musculares não distróficas.....76
- Figura 10** - Microscopia Eletrônica de Varredura da recelularização de músculos distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4) por 7 dias.....77
- Figura 11** - Microscopia Eletrônica de Varredura da recelularização de músculos distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4) por 14 dias.....78

Figura 12 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 1 com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	79
Figura 13 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 2 com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	80
Figura 14 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 3 com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	81
Figura 15 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 4 com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	82
Figura 16 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 1 com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	83
Figura 17 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 2 com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	84
Figura 18 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 3 com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	85
Figura 19 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 4 com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	86
Figura 20 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 1 com células musculares não distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI- JIV).....	87
Figura 21 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 2 com células musculares não distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	88
Figura 22 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 3 com células musculares não distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	89

Figura 23 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 4 com células musculares não distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	90
Figura 24 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 1 com células musculares distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	91
Figura 25 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 2 com células musculares distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	92
Figura 26 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 3 com células musculares distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	93
Figura 27 - Imunofluorescência da recelularização de <i>scaffolds</i> do Animal 4 com células musculares distróficas por 7 dias (AI-EIV) e 14 dias (FI-JIV).....	94

LISTA DE TABELAS (ARTIGO I)

Tabela 1 - Caracterização dos animais utilizados.....	36
--	----

LISTA DE TABELAS (ARTIGO II)

Tabela 1 - Células e anticorpos utilizados na imunocitoquímica.....	63
Tabela 2 - Anticorpos utilizados na Imunofluorescência da recelularização.....	66
Tabela 3 - Avaliação microbiológica do meio de cultivo utilizado na recelularização de <i>scaffolds</i> musculares.....	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
3. OBJETIVOS	30
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	30
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	30
4. Artigo I – Caracterização de matrizes extracelulares musculares distróficas 31	
4.1. INTRODUÇÃO	33
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.2.1. <i>Coleta de Amostras</i>	36
4.2.2. <i>Descelularização</i>	36
4.2.3. <i>Concentração de DNA genômico (gDNA)</i>	37
4.2.4. <i>Análise Histológica</i>	37
4.2.5. <i>Fluorescência por DAPI</i>	38
4.2.6. <i>Imunohistoquímica</i>	38
4.2.7. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	39
4.2.8. <i>Quantificação da imunohistoquímica e colágenos totais</i>	39
4.3. RESULTADOS	40
4.4. DISCUSSÃO	49
4.5. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
5. Artigo II – Recelularização de músculos caninos e a influência de sua matriz extracelular na distrofia muscular	55
5.1. INTRODUÇÃO	59
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	60
5.2.1. <i>Descelularização de Recelularização de músculos distróficos e não distróficos</i>	61
5.2.2. <i>Cultivo celular</i>	61
5.2.3. <i>Imunocitoquímica</i>	62
5.2.4. <i>Citometria de fluxo</i>	63
5.2.5. <i>Teste de resazurina</i>	64
5.2.6. <i>Teste de PCR de Mycoplasma</i>	64
5.2.7. <i>Avaliação Microbiológica</i>	65
5.2.8. <i>Quantificação de DNA de amostras recelularizadas</i>	65
5.2.9. <i>Imunofluorescência</i>	65

5.2.10 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	66
5.3. RESULTADOS	67
5.4 DISCUSSÃO	95
5.5. CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
7. CONCLUSÃO FINAL	104
REFERÊNCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

As distrofias musculares são doenças que causam enfraquecimento e degeneração progressiva do sistema muscular, e isso se dá devido ao comprometimento da síntese e regeneração de proteínas contráteis. As distrofias musculares apresentam-se em mais de 30 tipos diferentes (ECHEVERRY-MARÍN; BUSTAMANTE-VEGA, 2018) e o padrão de distrofia não é igual em todos os tipos de distrofias musculares, dentre estes tipos é possível observar variações no tamanho da fibra muscular, proliferação marcante de tecido conjuntivo endomisial e perimisial e posteriormente a substituição de tecido muscular por tecido adiposo (REED, 2009). Dentre as distrofias musculares existe a classificação de distrofinopatias (ECHEVERRY-MARÍN; BUSTAMANTE-VEGA, 2018), causadas por deleções ou mutações no gene que expressa a proteína distrofina (HASLETT et al., 2002), e são elas a Distrofia Muscular de Becker (DMB) e a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). A DMD apresenta-se como o tipo mais comum e mais grave de distrofia muscular (ECHEVERRY-MARÍN; BUSTAMANTE-VEGA, 2018).

A DMD é uma enfermidade hereditária e progressiva ligada ao cromossomo X e é causada por mutações no gene da distrofina, tornando sua expressão reduzida ou inexistente (NOWAK; DAVIES, 2004).

A DMD afeta aproximadamente 1 em cada 3500 – 5000 nascidos vivos (quase exclusivamente do sexo masculino) (NGHIEM et al., 2017) e no Brasil são registrados 700 mil novos casos por ano (REZENDE, 2010). Além de humanos, outros animais também podem apresentar distrofias musculares e existem aproximadamente 60 modelos animais para DMD, exceto felinos e não mamíferos, pois raramente são utilizados (MCGREEVY et al., 2015).

Os estudos das distrofias musculares podem estar associados a diversas áreas, tais como biologia molecular, imunologia e dentre elas, a bioengenharia de tecidos. Essa é a área que une a biologia, a engenharia de biomateriais e a medicina (JAFARI et al., 2017) visando a reparação e/ou substituição de tecidos e órgãos, esta pode ser classificada por três componentes, *scaffolds*, células e moléculas sinalizadoras (ASGHARI et al., 2017). Um *scaffold* é uma estrutura tridimensional que servirá como local para interação celular (JAFARI et al., 2017) podendo ser formado a partir de polímeros sintéticos, polímeros naturais e moléculas biológicas (colágeno, elastina, ácido hialurônico, dentre outros componentes da matriz extracelular (MEC)). Este deve ser capaz de se assemelhar fisicamente e quimicamente a uma MEC natural que é composta por proteoglicanos, proteínas e moléculas sinalizadoras (ASGHARI et al., 2017). Os *scaffolds* biológicos (biomateriais) são produzidos a partir de processos de descelularização

(combinação de agentes físicos, químicos e enzimáticos) de órgãos e tecidos permitindo a produção do mesmo órgão ou partes dele através da recelularização destes (BARRETO et al., 2019).

Além de produção de novos órgãos, os processos de descelularização e recelularização também podem ser utilizados para estudos da MEC em doenças, visando o desenvolvimento de novas terapias regenerativas (WANG et al., 2019), como apresentado neste trabalho.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. *Distrofia Muscular de Duchenne*

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a miopatia neuromuscular que apresenta maior incidência dentre os diversos tipos de distrofias musculares. Esta é causada por mutação no gene da distrofina presentes no cromossomo X (FALZARANO et al., 2015). A DMD, pode ser causada por mutação “*out-of-frame*”, quando não há produção de distrofina, ou “*in-frame*”, quando é possível produzir uma distrofina curta, mas funcional, ocasionando um fenótipo menos grave (SHIMIZU-MOTOHASHI et al., 2019). O gene da distrofina é o maior gene descrito no ser humano sendo expresso em sua maior parte nos músculos esqueléticos e cardíacos e em pequena quantidade no encéfalo (músculo liso dos vasos). A distrofina está localizada no sarcolema ao longo de todo o comprimento das miofibrilas se unindo a um complexo presente na membrana plasmática das miofibrilas chamado complexo de glicoproteínas associadas a distrofina (dístroglicana, sarcoglicana e óxido nítrico sintase) (FALZARANO et al., 2015). Sua função essencial é ligar o citoesqueleto a MEC (NOWAK; DAVIES, 2004) e estabilizar as fibras musculares durante a contração através da ligação na F-actina (actina filamentosa) com domínio N-terminal (amino-terminal) e no β -dístroglicano (glicoproteína associada à distrofina – DAGs) com domínio C-terminal (carboxi-terminal), tendo assim a sua importância estrutural (FALZARANO et al., 2015).

A doença não apresenta sinais clínicos no nascimento, porém apresenta desenvolvimento rápido podendo ser diagnosticada nos primeiros anos de vida do indivíduo (FALZARANO et al., 2015).

As mutações responsáveis pelo desenvolvimento da DMD ocorrem na região p21 do cromossomo X e geralmente levam o indivíduo afetado (sexo masculino em sua maioria) a morte por volta da segunda ou terceira década de vida. Os indivíduos do sexo feminino dificilmente são afetados devido a uma cópia funcional do gene no outro cromossomo X, o que, de certa forma, “compensa” a mutação ocorrida, os tornando portadores (FERRANCE et al., 2003).

O diagnóstico da DMD é feito a partir de exame físico; análise de histórico familiar e achados clínicos; dosagem da creatinofosfoquinase (responsável por fornecer energia as células musculares e é liberada na corrente sanguínea quando ocorre degeneração muscular) no soro; biópsia muscular; testes de duplicação/deleção de distrofina e sequenciamento genético

(BUSHBY et al., 2010). A doença se manifesta entre 3 e 5 anos de vida e na maioria das vezes o indivíduo entre 11 e 12 anos já necessita da utilização de cadeira de rodas. A primeira manifestação da doença ocorre com fraqueza do membro inferior proximal e fraqueza troncular, posteriormente o membro superior, os músculos distais e os flexores do pescoço também são acometidos. Em exame físico os pacientes apresentam marcha anserina (marcha ceifante), aumento das panturrilhas e sinal positivo de Gowers (YIU; KORNBERG, 2015). A doença apresenta progressão rápida com desenvolvimento de severa cardiomiopatia, em muitos casos, por volta dos 10 anos de vida. A expectativa de vida (20 a 30 anos) dos pacientes pode ser prolongada com o uso de corticoides e respiradores artificiais, porém a maioria dos pacientes vai a óbito por complicações respiratórias e cardíacas (FALZARANO et al., 2015).

1.2. Modelos Animais

A utilização de modelos animais até os tempos atuais é debatida levando em consideração que a utilização destes para benefício do homem pode ser prejudicial para o animal utilizado, porém eles são essenciais para muitas questões científicas, como o desenvolvimento de vacinas e terapias e o estudo de doenças humanas que afetam da mesma forma ou de formas semelhantes outros animais (FRANÇOISE BARRÉ-SINOUSI; MONTAGUTELLI, 2015), como a distrofia muscular.

O uso de modelos animais se baseia nos conceitos de analogia e homologia, sendo analogia apenas uma relação de semelhança entre estruturas ou processos e a homologia relacionada a histórias evolutivas compartilhadas e semelhanças genéticas. Em 1987, com a descoberta do gene DMD, foi possível identificar modelos animais geneticamente homólogos a DMD. Modelos animais com fenótipo semelhante a DMD foram definidos em camundongos, cães, gatos e porcos. Dentre todos, os cães apresentam maior semelhança fenotípica com a DMD em humanos (KORNEGAY, 2017). Distrofias musculares semelhantes a DMD já foram descritas em *Rottweilers* (mutação sem sentido no exon 58), *German shorthaired pointers* (grande deleção com "nocaute da distrofina"), *Pembroke Welsh corgis* (inserção repetitiva do elemento 1 [LINE-1] no íntron 13) e *Cavalier King Charles spaniels* (mutação missense no local de *splice* do doador 5' do exon 50, resultando na deleção do exon 50 em transcritos de mRNA) (KORNEGAY et al., 2012).

Os modelos animais mais utilizados para estudo da DMD em humanos são o camundongo *mdx* e cães GRMD (distrofia muscular do *Golden Retriever*). No camundongo *mdx* ocorre mutação pontual sem sentido (citosina para timina) no exon 23, parando completamente a expressão de distrofina (MCGREEVY et al., 2015), porém apresenta sinais clínicos mínimos, o que se acredita ocorrer devido a mecanismos compensatórios ou particularidades da espécie, portanto se torna necessária a desativação destes mecanismos para que o camundongo *mdx* apresente fenótipo semelhante ao apresentado por humanos afetados pela DMD. No cão GRMD a mutação ocorre no intron 6 (adenina para guanina) fazendo com que o exon 7 seja pulado pelo mRNA (RNA mensageiro), e sua ausência causa a formação de um códon de parada prematuro no exon 8 dando origem a uma proteína truncada. Os cães distróficos têm expectativa de vida de 3 a 5 anos (VIEIRA et al., 2015). A doença em cães GRMD já é perceptível desde o nascimento, muitas vezes necessitando de suplementos alimentares. Após 6 semanas de vida os membros pélvicos já começam a ser afetados e é possível observar trismo (contração involuntária e prolongada dos músculos da mastigação) e com o desenvolvimento da doença os cães apresentam marcha atrofiada e salivação excessiva sugerindo envolvimento muscular faríngeo e cifose lombar inicial que evolui para lordose (KORNEGAY et al., 2012). O modelo GRMD é o modelo animal mais semelhante à DMD, por isso em uma comparação entre a DMD e a GRMD, pode-se dizer que a doença se desenvolve da mesma forma (analogamente) até os 6 meses em GRMD e até os 10 anos em DMD. Apesar de cães já apresentarem sintomas da doença desde o nascimento, ocorre estabilização do quadro clínico por volta de 2 semanas com desenvolvimento leve até 3 meses de vida e progressão maior a partir deste período, o que se assemelha a DMD, onde indivíduos afetados apresentam quadro relativamente estável até os 6 anos de vida, quando a doença apresenta progressão mais acentuada (NGHIEM et al., 2017).

1.3. Bioengenharia de Tecidos

As estratégias da engenharia de tecidos podem envolver o uso *in vivo* ou *in vitro* de estruturas chamadas de *scaffolds* (COSTA et al., 2017). Os *scaffolds* são indispensáveis para a engenharia de tecidos, pois estes não proporcionam somente um suporte estrutural, mas também fornecem componentes necessários para construção e crescimento de um novo tecido (SHADJOU; HASANZADEH; KHALILZADEH, 2018). Estes *scaffolds* podem ser sintéticos, como o ácido glicólico polilático (PLGA) ou biológicos provenientes de matrizes extracelulares (MEC) (COSTA et al., 2017), sendo estas um conjunto de macromoléculas cuja composição e

estruturas variam de tecido para tecido, sendo responsável pelo suporte físico e pela regulação de processos biológicos, como crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese. Os principais constituintes das MECs são proteínas formadoras de fibras, como colágenos, elastina, fibronectina (FN), lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs), sendo o colágeno I o mais abundante na maioria dos tecidos, exceto em cartilagem (colágeno II). Outros componentes importantes são os fatores de crescimento, como TGF β (fator de crescimento transformado beta), IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) e CTGF (fator de crescimento de tecido conjuntivo) e a água (GILLIES; LIEBER, 2011); (THEOCHARIS et al., 2016).

Scaffolds biológicos provenientes de MEC são comumente usados para uma variedade de aplicações e seu uso na medicina regenerativa cresce cada vez mais. A obtenção de *scaffolds* biológicos pode ser através de processos de descclularização (remoção de todas as células de um tecido) e durante estes processos, é essencial a preservação da ultraestrutura e composição da MEC. A descclularização pode ser feita através da utilização de agentes químicos, biológicos e/ou físicos. Agentes químicos podem ser ácidos e bases; soluções hipo e hipertônicas; detergentes; álcoois. Agentes biológicos podem ser enzimas; agentes não enzimáticos (ácido etilendiaminotetracético – EDTA). Agentes físicos podem ser temperatura; força e pressão; eletroporação irreversível não térmica (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Scaffolds descclularizados possibilitam o repovoamento do tecido com células (recelularização) *in vitro* e *in vivo*, porém o tipo celular escolhido para a recelularização é crucial para que o processo tenha êxito. Para a recelularização podem ser utilizadas linhagens celulares, células primárias, células tronco mesenquimais (CTMs), células tronco embrionárias, células tronco pluripotentes induzidas (IPSC). Linhagens celulares correspondem a uma população de células obtidas de um indivíduo, imortalizada para se diferenciar indefinidamente. Seu uso apresenta duas importantes limitações, por estarem em constante crescimento, seu fenótipo pode ser alterado após muitas passagens e possuem a capacidade restrita de diferenciação (BILODEAU et al., 2019). Um exemplo de linhagem celular é a linhagem 3T3, esta foi estabelecida a partir de embriões de camundongo com 17 a 19 dias de idade. As células foram estabelecidas a partir de embriões de camundongos albinos suíços em 1962 (BIOARRAY, 2021). Células primárias são obtidas por cultivo primário de tecidos vivos sem nenhuma modificação, por isso conseguem representar a fisiologia celular *in situ*. A vantagem de sua utilização é que estas podem ser isoladas, cultivadas *ex vivo* e transplantadas de volta para o mesmo paciente. As células-tronco mesenquimais são acessíveis, de fácil expansão e

podem ser extraídas e expandidas antes da aplicação no próprio paciente. Sua utilização é vantajosa, pois causam resposta imunológica leve ou inexistente devido à baixa expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e nenhuma expressão do MHC de classe II. As células-tronco embrionárias são células pluripotentes que podem originar qualquer célula derivada dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma). Apesar de serem indicadas para a recelularização, apresentam o risco de formação de teratoma (tumor germinativo) ao longo de sua diferenciação devido ao aumento da expressão do MHC de classe I (presença de MHC de classe I e II é muito baixa ou inexistente na fase indiferenciada). As iPSC são formadas a partir da reprogramação de uma célula somática em uma célula pluripotente semelhante a células tronco embrionárias. Estas células possibilitam a correção de defeitos genéticos através da utilização das tecnologias lentiviral e CRISPR-Cas9 (BILODEAU et al., 2019).

1.4. *Músculo esquelético e sua Matriz Extracelular (MEC)*

Em humanos, os músculos esqueléticos correspondem a aproximadamente 40% do peso total do corpo e possuem de 50 a 75% de todas as proteínas do organismo (FRONTERA; OCHALA, 2015). Estes músculos têm origem no mesoderma paraxial e nos somitos (segmentos do mesoderma paraxial) é iniciada a miogênese (CHAL; POURQUIE, 2017). Ao falar da importância mecânica, a principal função dos músculos esqueléticos é converter energia química em energia mecânica gerando força que possibilita a produção de movimento. Em sua importância metabólica, músculos esqueléticos tem como principais funções sua contribuição para o metabolismo energético basal, servindo como armazenamento de substratos importantes como aminoácidos e carboidratos, a produção de calor para a manutenção da temperatura e o consumo da maior parte do oxigênio usado durante atividade ou exercício (FRONTERA; OCHALA, 2015).

A arquitetura do músculo esquelético é descrita como um arranjo de fibras musculares (miofibras ou células musculares) e tecido conjuntivo associado. As fibras musculares são multinucleadas e pós-mitóticas. Cada um dos núcleos celulares é responsável pela síntese de proteínas na região específica da célula em que o mesmo se encontra (domínio nuclear). No músculo esquelético são encontradas as células satélites, que correspondem as células tronco adultas de músculo esquelético. As células satélites se localizam entre a membrana celular e a membrana basal e tem extrema importância no crescimento, reparo e regeneração do músculo,

pois quando ativadas por fatores miogênicos, se proliferam e se diferenciam em novas fibras musculares (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Os músculos, individualmente, são envoltos por uma lâmina de tecido conjuntivo chamada epimísio. Ao longo do músculo, grupos de fibras são formados e este grupo é também envolto por uma lâmina de tecido conjuntivo, o perimísio (FRONTERA; OCHALA, 2015). Cada célula muscular se encontra envolta por uma lâmina basal especializada chamada endomísio (CHAL; POURQUIE, 2017) e pela membrana celular (sarcolema) Associados ao sarcolema, estão vários complexos de proteínas ligados a estrutura interna de miofilamentos. Cada célula muscular é composta por milhares de miofibrilas que contêm bilhões de miofilamentos. Quando agrupados, os miofilamentos formam sarcomeros, que são unidades contráteis básicas, compostas, principalmente, por actina e miosina, responsáveis pelas propriedades mecânicas e fisiológicas (FRONTERA; OCHALA, 2015). As fibras musculares residem em uma estrutura tridimensional que consiste em vários colágenos, glicoproteínas, proteoglicanos e elastina, sendo esta a matriz extracelular (MEC) (CSAPO; GUMPENBERGER; WESSNER, 2020).

A matriz extracelular do músculo esquelético pode ser dividida em tecidos conjuntivos endomisiais, perimisiais e epimisiais. Durante o desenvolvimento do músculo esquelético os colágenos tipo I, III, IV, V, VI, XI, XII, XIV, XV e XVIII são identificados. No músculo adulto os colágenos tipo I (1-10% de sua massa seca) e III (distribuído entre endomísio e epimísio) são os mais expressivos no tecido. As fibras paralelas de colágeno tipo I, que estão presentes no endomísio, perimísio e epimísio, conferem resistência à tração e rigidez ao músculo, enquanto o colágeno tipo III forma uma camada frouxa de fibras que confere elasticidade ao endomísio e perimísio (CSAPO; GUMPENBERGER; WESSNER, 2020). O endomísio é composto de duas lâminas compostas, predominantemente, dos colágenos I e III (DUEWEKE; AWAN, 2016). A membrana basal muscular consiste principalmente de uma rede de colágenos tipo IV, mas os tipos VI, XV e XVIII também estão presentes (GILLIES; LIEBER, 2011).

Os proteoglicanos estão presentes na MEC muscular e muitos pertencem a família de proteoglicanos ricos em leucina (aminoácido essencial) (SLRPs). As SLRPs consistem em uma proteína principal com cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) conectadas e incluem decorina, biglican, fibromodulina e lumicana. Proteoglicanos de sulfato de heparan (HSPGs), colágeno V, perlecan e agrin correspondem a aproximadamente 30% dos proteoglicanos na MEC e tem a capacidade de se ligarem a fatores de crescimento (GILLIES; LIEBER, 2011).

Muitas glicoproteínas funcionam como moléculas ligantes entre o colágeno tipo IV e a membrana basal e o sarcolema. No sarcolema estão localizadas a laminina (ligadas a integrinas, β -dístroglicano, colágeno tipo IV e indiretamente a fibronectina e nidogênio) e a fibronectina (pode se ligar as integrinas). Junto às redes de colágeno IV, formam a base para a arquitetura da membrana basal (GILLIES; LIEBER, 2011).

A MEC também apresenta glicoproteínas caracterizadas como moduladores (não estruturais) das funções celulares, facilitando as interações célula-célula e célula-MEC, e promovendo um modo de adesivo celular transitório necessário para a migração celular (THEOCHARIS et al., 2016). São elas as osteopontinas, trombospondinas e tenascina-C. As osteopontinas possuem função semelhante à citocinas e normalmente só são observadas em músculos em regeneração. As trombospondinas aparentemente são responsáveis pela regulação da formação de capilares. As tenascinas-C estão localizadas nas junções neuromusculares e possuem papel importante na sinalização e manutenção da organização da MEC (GILLIES; LIEBER, 2011).

Com base em dados da literatura, este trabalho visa a recelularização de matrizes de músculos distróficos e não distróficos com diferentes tipos celulares para análise da interação célula- matriz e de que forma a MEC pode interferir no processo de recelularização quando há uma alteração genética importante como a distrofia muscular.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

Analisar a interação da matriz extracelular descelularizada de músculos esqueléticos de cães distróficos e não distróficos com células musculares distróficas e não distróficas de cão, células tronco mesenquimais de gordura canina e fibroblastos de linhagem 3T3 a fim de observar até que ponto a matriz extracelular proveniente de músculo distrófico pode interferir na recelularização do tecido.

2.2.Objetivos Específicos

- 2.2.1.** Descelularização e caracterização de componentes da MEC distrófica;
- 2.2.2.** Determinar se músculos distróficos também podem ser utilizados como *scaffolds* biológicos para a bioengenharia de tecidos;
- 2.2.3.** Avaliar a interação célula-MEC com testes dos três (4) tipos celulares para recelularização dos *scaffolds* de músculos caninos: 1. Células Tronco Mesenquimais de gordura (CTMg); 2. Fibroblastos 3T3 (3T3); 3. Células musculares distróficas (MD); 4. Células musculares não distróficas (MN).

3. Artigo I – Caracterização de matrizes extracelulares musculares distróficas

Vitória Frias Batista; Gustavo de Sá Schiavo Matias; Ana Claudia O. Carreira; Rodrigo Barreto e Paula Fratini.

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença hereditária de caráter progressivo causada por mutação no gene produtor da proteína distrofina, responsável por ligar o citoesqueleto da célula muscular a matriz extracelular (MEC). Sua ausência causa diminuição ou perda da integridade da membrana das miofibrilas e ciclos repetidos de necrose e regeneração, resultando em fraqueza muscular, dentre outros sintomas. Além de humanos, outros animais podem apresentar distrofias musculares, podendo ser utilizados como modelos para o estudo de distrofias musculares em humanos. O modelo animal mais utilizado é o modelo de Distrofia Muscular do *Golden Retriever* (GRMD). Os estudos de distrofias musculares podem ser associados a diversas áreas, como a Bioengenharia de tecidos, área que visa a utilização de MEC descelularizadas (*scaffolds*) para reparação/substituição de órgãos e tecidos, porém estes *scaffolds* também podem servir como ferramenta para estudo de MEC em doenças. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a caracterização de alguns componentes da MEC distrófica visando sugerir se uma MEC proveniente de músculos distrófico possui alterações na sua composição que possam interferir no processo de recelularização. Para realização deste trabalho, músculos bíceps femorais distróficos e não distróficos caninos foram descelularizados com utilização de SDS a 1% e os músculos controle e descelularizados passaram por análises de quantificação de DNA e fluorescência por DAPI para validação da descelularização e análises histológicas, imunohistoquímica e de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliação da preservação e composição das MEC distróficas e não distróficas. Como resultados, as quantificações de DNA das MEC descelularizadas alcançaram quantidade inferior a 50ng de DNA por mg de tecido e na fluorescência por DAPI não foram visualizados núcleos celulares nos tecidos descelularizados. Pelas análises histológicas foi possível observar a ausência de células nos tecidos descelularizados e a preservação de fibras colágenas da MEC. Pela imunohistoquímica, não foram observadas grandes diferenças nos componentes da MEC de músculos distróficos quando comparados com músculos não distróficos.

Palavras-chave: Distrofia Muscular. Músculo esquelético. Matriz extracelular. *Scaffold* biológico. Descelularização.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a progressive hereditary disease caused by a mutation in the gene producing the dystrophin protein, responsible for linking the cytoskeleton of the muscle cell to the extracellular matrix (ECM). Its absence causes a decrease or loss of myofibril membrane integrity and repeated cycles of necrosis and regeneration, resulting in muscle weakness, among other symptoms. In addition to humans, other animals may have muscular dystrophies and can be used as models for the study of muscular dystrophies in humans. The most used animal model is the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) model. Muscular dystrophy studies can be associated with several areas, such as tissue bioengineering, an area that aims to use decellularized ECM (scaffolds) for repairing / replacing organs and tissues, however these scaffolds can also serve as a tool for studying ECM in diseases. Therefore, the objective of this work was to characterize some components of the dystrophic ECM in order to suggest whether an ECM from dystrophic muscles has changes in its composition that may interfere with the recellularization process. To perform this work, canine dystrophic and non-dystrophic femoral biceps muscles were decellularized using 1% SDS and the control and decellularized muscles underwent DNA quantification and fluorescence analyzes by DAPI to validate decellularization and histological, immunohistochemical and Scanning Electron Microscopy (SEM) to evaluate the preservation and composition of dystrophic and non-dystrophic ECM. As a result, the DNA quantifications of the decellularized ECM reached less than 50ng of DNA per mg of tissue and in the fluorescence by DAPI cell nuclei were not seen in the decellularized tissues. Through histological analyzes it was possible to observe the absence of cells in the decellularized tissues and the preservation of collagen fibers of the ECM. Due to immunohistochemistry, no major differences were observed in the ECM components of dystrophic muscles when compared with non-dystrophic muscles.

Keywords: Muscular dystrophy. Skeletal muscle. Extracellular matrix. Biological scaffold. Decellularization.

3.1.INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular ligada ao cromossomo X e é causada por uma mutação no gene da distrofina que causa diminuição ou falta na expressão da proteína distrofina (BUSHBY et al., 2010). A distrofina tem como função ligar a estrutura sarcomérica à matriz extracelular (MEC) para proteger o sarcolema de lesões induzidas por contração (SHIMIZU-MOTOHASHI et al., 2019), além de prover força, estabilidade e funcionalidade as miofibrilas (BUSHBY et al., 2010). Indivíduos afetados pela distrofia muscular apresentam fraqueza progressiva, podendo levar a casos de falência respiratória e cardíaca, sendo estas as principais causas de morte entre pacientes com DMD (SHIMIZU-MOTOHASHI et al., 2019). A DMD afeta 1 a cada 3.500 a 5000 nascidos vivos do sexo masculino. Indivíduos do sexo feminino, mesmo apresentando cromossomo mutado, geralmente não apresentam sintomas, sendo chamadas de portadoras. Isso se deve a presença de outro cromossomo X, possibilitando rearranjos cromossômicos (DIAS et al., 2018). Para estudo de distrofias musculares, incluindo a DMD, podem ser utilizados modelos animais que apresentam características semelhantes as apresentadas por distrofias musculares que afetam seres humanos.

Existem mais de 60 modelos animais para estudo de distrofias musculares (MCGREEVY et al., 2015), porém o modelo de distrofia muscular do *Golden Retriever* (GRMD) é o mais utilizado por apresentar sinais clínicos semelhantes aos apresentados por seres humanos portadores da DMD (KORNEGAY, 2017). Associado a utilização de modelos animais, podemos utilizar a bioengenharia de tecidos como ferramenta para estudo de distrofias musculares.

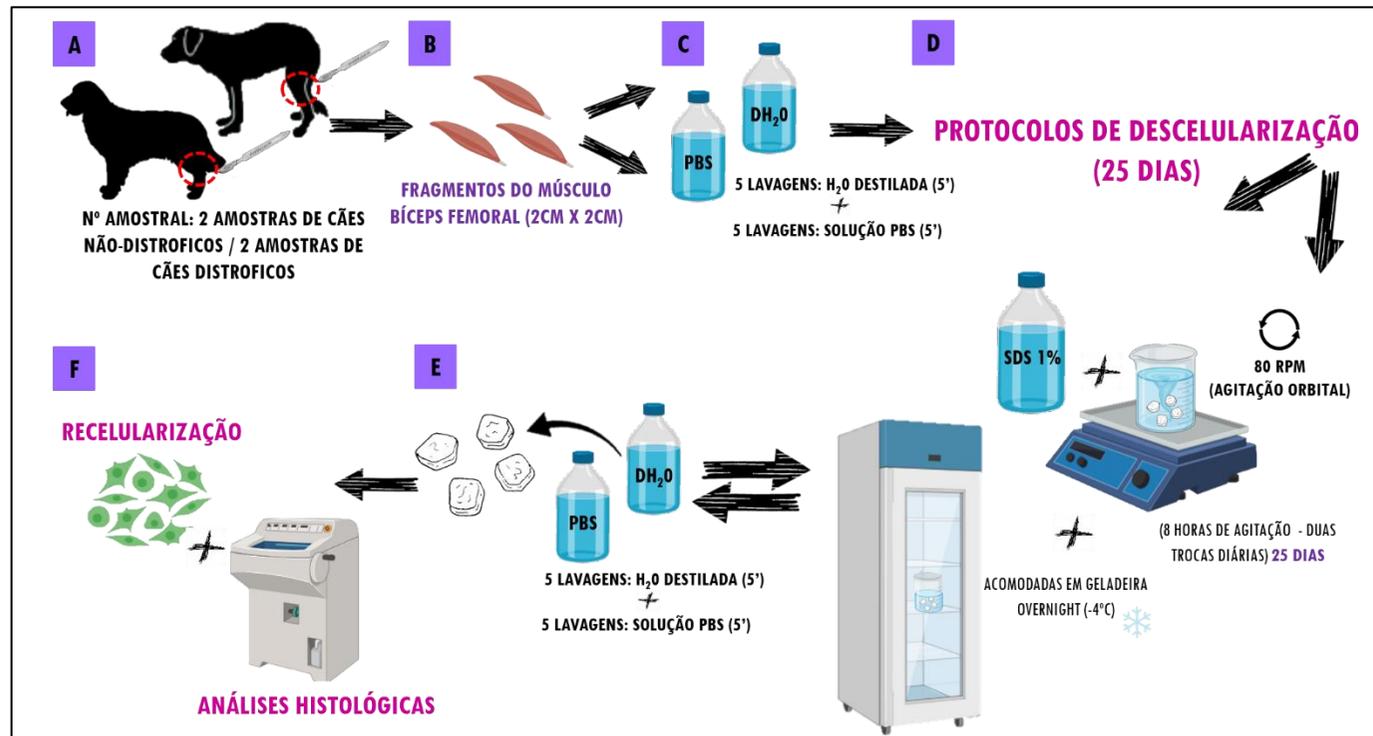
A bioengenharia de tecidos possui como principal objetivo a reparação ou substituição de órgãos e tecidos e normalmente envolve a utilização de um *scaffolds*, este que é responsável por permitir a adesão de proliferação celular. *Scaffolds* podem ser provenientes de materiais sintéticos ou materiais biológicos, como a MEC (COSTA et al., 2017). Um *scaffold* proveniente de MEC pode ser produzido a partir do processo de descclularização, que permitirá a remoção de todo conteúdo celular do tecido, mantendo somente a MEC. A MEC possui importante papel na migração celular, proliferação e diferenciação, portanto é necessário que a mesma seja preservada no processo de descclularização para que seja possível adicionar células ao tecido descclularizado no processo de recelularização (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). As técnicas de decelularização podem ser utilizadas, não só para reparação e substituição de

órgãos, mas também para estudos da MEC em casos de doenças. Existem estudos acerca da MEC na distrofia muscular (M ROIG , A FARGAS, M GRATACÓS, 1998), porém não em tecidos descelularizados.

Portanto, este trabalho tem como objetivo a caracterização de componentes da MEC distrófica em comparação a animais saudáveis através de análises histológicas para determinar diferenças entre elas e possibilitar melhor entendimento do músculo distrófico e sua MEC.

3.2.MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1. Desenho experimental dos materiais e métodos utilizados no trabalho.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Coleta de materiais de 4 animais (2 distróficos e 2 não distróficos) (A), em seguida a fragmentação das amostras de músculo (B) com lavagem em água destilada (DH_2O) (C) para início da descelularização. Músculos foram mantidos em SDS a 1% durante 25 dias sob agitação, sendo acomodados em geladeira *overnight* (D). Após a descelularização, músculos foram lavados em PBS 1X (E) e preparados para as análises histológicas e moleculares (controle e descelularizado) (F).

3.2.1. Coleta de Amostras

Foram utilizados músculos bíceps femorais de cães acometidos por distrofia muscular e de cães saudáveis. Amostras de músculos de cães distróficos foram obtidas no canil GRMD Brasil, localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e se encontravam em acervo (congelados a -20°C) após coleta para trabalhos anteriores. Amostras de músculos de cães não distróficos foram obtidas através de doação de amostras (amostras só foram coletadas após assinatura de termo de doação pelo tutor do animal) no Hospital Veterinário da Faculdade Anclivepa. Todos os animais utilizados foram a óbito por causas naturais e seus músculos só foram coletados após confirmação do óbito. Esta pesquisa foi realizada em conformidade com os regulamentos do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA n.º 4520070119).

Tabela 1 - Caracterização dos animais utilizados.

<i>Identificação</i>	<i>Idade</i>	<i>Condição</i>	<i>Raça</i>
<i>Animal 1</i>	2,5 anos	Distrófico	<i>Golden Retriever</i>
<i>Animal 2</i>	9 anos	Distrófico	<i>Golden Retriever</i>
<i>Animal 3</i>	1 ano	Não distrófico	Sem raça definida
<i>Animal 4</i>	11 anos	Não distrófico	Sem raça definida

3.2.2. Descelularização

Após a dissecação do material, parte deste foi selecionada e fragmentada em pedaços de aproximadamente 2cm por 2cm. O material já fragmentado passou por 5 lavagens de 5 minutos em água destilada para remoção de resíduos de sangue dos fragmentos. Após a limpeza do material, os fragmentos foram distribuídos em recipientes identificados por animal, sendo estes preenchidos por dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%. As amostras foram mantidas em agitação durante o dia (aproximadamente 8h por dia/80rpm), com duas trocas diárias de SDS, e acomodadas em geladeira durante a noite a -4°C (*overnight*). Após 25 dias imersos em SDS e sob agitação, os músculos passaram por 5 lavagens de 5 minutos em tampão fosfato-salino (PBS) a 1% para remoção de resíduos de SDS. Ao fim do processo de descelularização o

material foi mantido em geladeira a -20°C até a utilização. O material foi acompanhado diariamente macroscopicamente visando avaliar o processo de descclularização pela mudança de coloração (o material torna-se translúcido a medida que vai perdendo conteúdo celular) e também por análises histológicas periódicas.

3.2.3. Concentração de DNA genômico (gDNA)

As amostras controle e descclularizadas foram submetidas à análise de DNA genômico remanescente para confirmar a eficiência da descclularização. O DNA genômico foi isolado a partir de 50 mg de tecido muscular descclularizado utilizando-se o Spin Kit Illustra Cells (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram digeridas em Proteinase K e tampão de lise a partir do kit a 56°C durante 2 horas. As amostras de gDNA purificadas foram analisadas em espectrofotômetro a 260 nm (Nanodrop, ThermoScientific). Para todas as quantificações foram analisadas duas repetições.

3.2.4. Análise histológica

As amostras de músculos descclularizados e não descclularizados (controles) foram mantidas em geladeira a -20°C . Para realização da análise histológica, os fragmentos dos 4 animais foram fragmentados em pedaços de aproximadamente 0,5cm por 1cm. Após a separação dos fragmentos, estes foram levemente secos e mergulhados em talco neutro para preservação do material no processo de congelamento. Em seguida, os fragmentos foram colados em discos de cortiça, presos pela sua base, com Tissue-Tek OCT (#4583-1, Sakura - Torrance, EUA) e mergulhados em nitrogênio líquido até congelamento completo do material. Os fragmentos foram mantidos em nitrogênio líquido desde o congelamento até o transporte para o criostato (Leica CM1520 ®), onde foram feitas secções de 9 μm de espessura que foram fixadas em lâminas silanizadas. Parte das lâminas produzidas foi corada por Hematoxilina e Eosina (H&E); Tricromo de Masson; Tricromo de Gomori; Azul de Alcian; Safranina O; Ferro Coloidal; e Picrossírius. Outra parte foi utilizada para imunohistoquímica e DAPI. Lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Leica DM6 B®).

3.2.5. *Fluorescência por DAPI*

Utilizando-se lâminas cortadas em criostato, o DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol (marcador fluorescente de núcleos celulares), em diluição de 1 µl de solução para 10 ml de PBS a 1%, foi adicionado a cada fragmento das lâminas e após um período de espera de 10 minutos, em ambiente não iluminado, o material foi lavado em PBS a 1%, as lâminas foram montadas com lamínulas e o material foi analisado em microscópio de luz com fluorescência como uma das análises para efetivação da descelularização (Nikon Eclipse 80i com fluorescência).

3.2.6. *Imunohistoquímica*

Para análise imunohistoquímica foi utilizado o sistema de detecção Dako EnVision™ FLEX. As lâminas com amostras de músculos distróficos e não distróficos descelularizadas e controle passaram por processo de recuperação do antígeno em banho-maria a 95°C durante 20 minutos em EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution (Tampão Tris/EDTA, pH 9, 50x) em diluição de 1:50. Após a diminuição de temperatura as lâminas foram lavadas em EnVision™ FLEX Wash Buffer (solução salina com tampão Tris com Tween 20, pH 7,6, 20x), em seguida a peroxidase endógena foi bloqueada através de solução de água destilada com 6% de peróxido de hidrogênio durante 30 minutos no escuro. Após o bloqueio de peroxidase, foi feito o bloqueio com proteínas em solução de PBS + Albumina de Soro Bovino (BSA) a 2%. Cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica. Os cortes foram incubados em anticorpos primários para laminina (Invitrogen - PA1-16730 – 1:450), fibronectina (LSBio - C353995 – 1:100), elastina (ABCAM - AB9519 – 1:100), MMP2 (LSBio - C352523 – 1:150) e TIMP1 (LSBio - LS-C149170 – 1:100) diluídos em PBS + BSA a 0,2% (1:200) por 3 horas em câmara úmida a 4°C. Nos cortes controle negativos foi aplicado TBS + BSA 2% nas mesmas condições para substituir o anticorpo primário que não é aplicado nos mesmos. Após 3 horas de incubação os cortes foram lavados em EnVision™ FLEX Wash Buffer e foi feita a aplicação do EnVision™ FLEX/HRP anticorpo secundário (Dextrato associado a moléculas de peroxidase e moléculas de anticorpo secundário de caprino contra Imunoglobulina de coelho e rato em solução tamponada contendo proteína estabilizadora e conservante) durante 30 minutos. Em seguida os cortes foram lavados em PBS + albumina de soro bovino (BSA) 0,2% e foi feita a revelação através de 1 gota de EnVision™ FLEX DAB+Chromogen em 1mL de

EnVision™ FLEX Substrate Buffer durante 20 segundos. A revelação foi interrompida com água destilada. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina e montadas com lamínulas.

3.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de músculos antes e depois da descclularização foram fixadas em solução paraformaldeído (PFA) a 4% por 72 horas, lavadas em banho ultrassônico e armazenados em álcool 70% por 24 horas. Posteriormente as amostras foram desidratadas em uma crescente série de etanóis, sendo duas lavagens em álcool 80%, 2 lavagens em álcool 90% e 2 lavagens em álcool 100% (5 minutos para cada lavagem), sob agitação vigorosa. As amostras foram secas em aparelho de ponto crítico automatizado (Leica EM CPD300®), transferidas para *stubs* e metalizadas com ouro (# K550, Emitech-Ashford, Reino Unido) possibilitando a formação da imagem através da reflexão de elétrons. As análises foram feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO 435VP®).

3.2.8. Quantificação da imunohistoquímica e dos colágenos totais

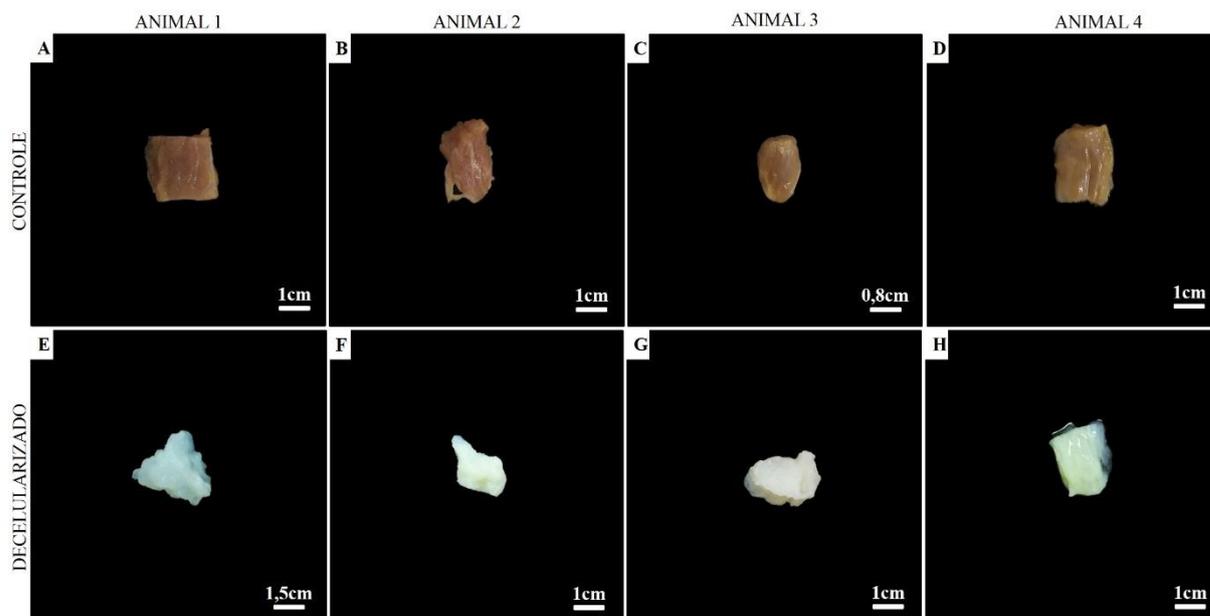
Para estimativa dos colágenos totais dos *scaffolds* descclularizados de músculos caninos comparados aos tecidos controle, foi utilizada a coloração de *Picrosirius Red* (PSR). Para quantificação da imunohistoquímica foram utilizadas as imagens da marcação. Para tanto, foram adquiridas para cada lâmina 06 imagens no aumento de 20x, em microscópio LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy). As imagens foram então analisadas utilizando o plugin *MRI fibrosis tool* para o software *Image J*. Os dados foram analisados pela análise da variância de quadrados mínimos (*LSMeans = least square means*) usando o procedimento de modelos lineares gerais (*GLM = General Linear Models*) do programa SAS (versão 5.1).

Todas as análises por imagem foram realizadas no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CADI – FMVZ USP), por técnica responsável.

3.3.RESULTADOS

Para descclularização de músculos distróficos e não distróficos foi empregado um protocolo com a utilização de SDS a 1% para remoção das células do tecido. Após o processo, os músculos utilizados apresentaram mudança de coloração de rosa/marrom para branco (**Figura 2**).

Figura 2. Visão macroscópica de músculos bíceps femorais antes (controle) e após a descclularização (descclularizado).



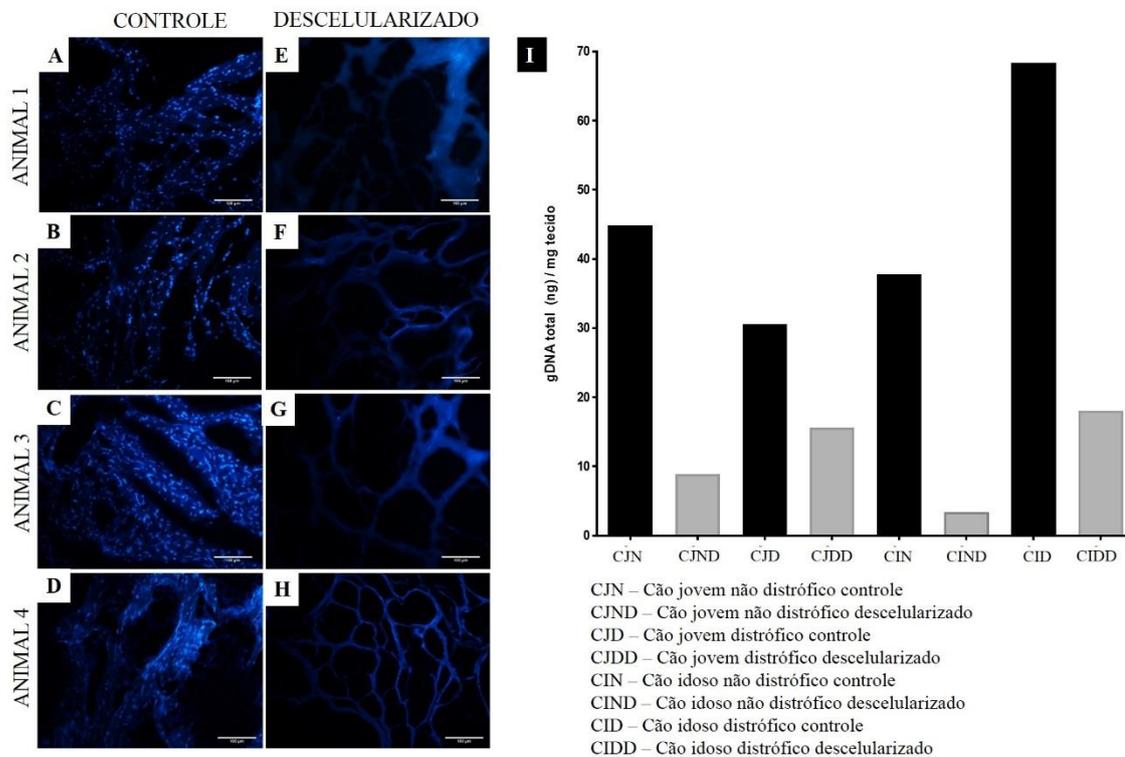
Fonte: BATISTA (2021).

Legenda: Em **A, B, C e D**: Amostras de músculos após lavagem em água destilada e antes do processo de descclularização, apresentando coloração rosa/marrom. Em **E, F, G e H**: Amostras de músculos após a descclularização, apresentando coloração translúcida, deixando evidente a mudança de coloração quando comparados a músculos não descclularizados.

Para determinar se a descclularização foi eficiente foi realizada a marcação fluorescente do tecido por DAPI, permitindo a observação de núcleos celulares (em azul) nos tecidos que não passaram pelo processo de descclularização e a ausência dos mesmos nos tecidos descclularizados (**Figura 3 – A-H**). A quantificação de DNA genômico permitiu mensurar a quantidade de DNA presente nos tecidos antes e após a descclularização, mostrando diminuição da concentração de DNA nos tecidos. Em animais distróficos (**animais 1 e 2**) houve diminuição de 30,63ng para 15,63ng e 68,37ng para 18,03ng na concentração de DNA nos tecidos, respectivamente. Em animais não distróficos (**animais 3 e 4**) houve diminuição de 44,88ng para 8,91ng e 37,8ng para 3,48ng na concentração de DNA nos tecidos, respectivamente. A partir disto, pode-se dizer que a descclularização foi eficiente (**Figura 3 – I**). Embora ambos os

músculos tenham sido descelularizados, observa-se uma menor concentração de DNAg nos tecidos controle quando comparados com os distróficos.

Figura 3. Marcação fluorescente por DAPI e quantificação de DNA genômico em músculos (Mm.) bíceps femorais descelularizados (descelularizado) e não descelularizados (controle).



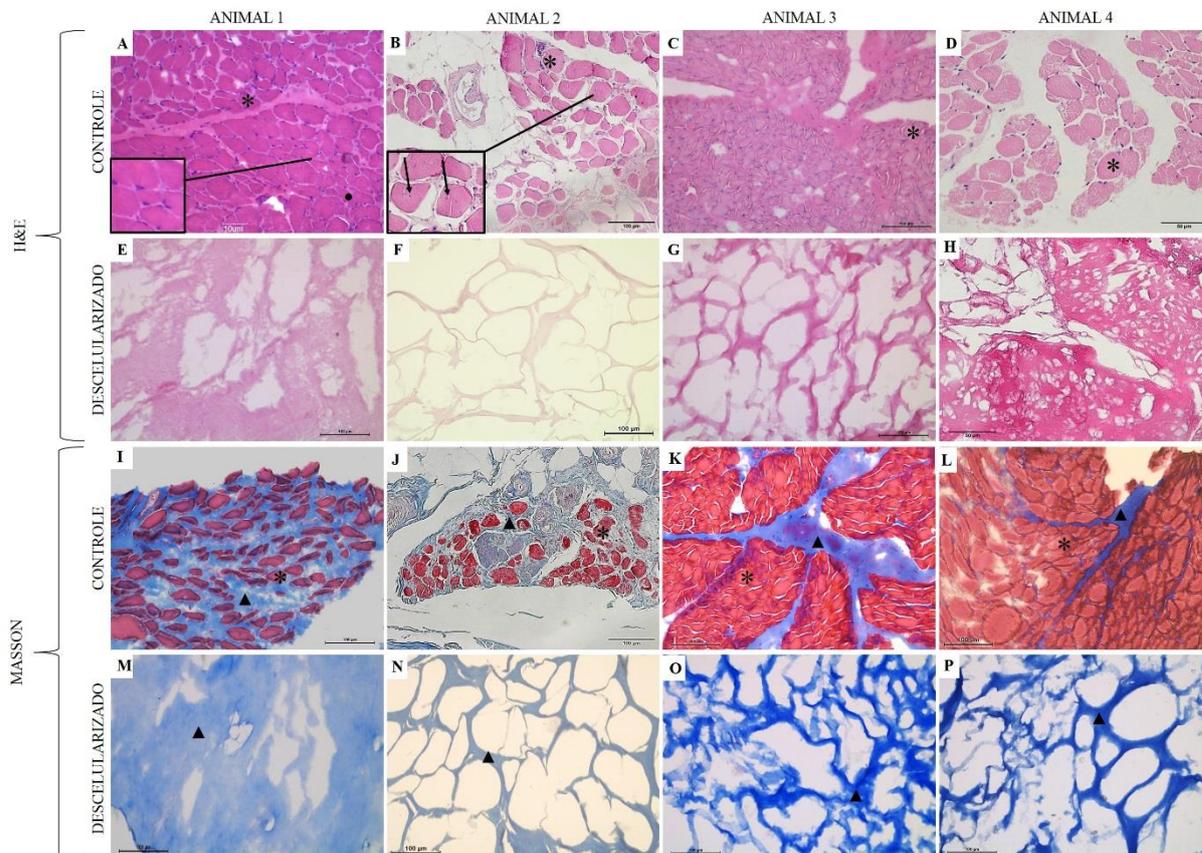
Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Mm. não descelurizados (controle) (A, B, C e D) e descelularizados (E, F, G e H) de cães distróficos (Animais 1 e 2) e não-distróficos (Animais 3 e 4) através de marcação por DAPI, possibilitando a observação de núcleos celulares (pontos azuis fluorescentes) em tecidos não descelularizados (E, F, G e H) e a ausência dos mesmos em tecidos descelularizados. Em I, quantificação de DNA genômico de Mm. antes e após a descelularização, com todos os tecidos descelularizados apresentando quantidade menor de 50ng de conteúdo celular por centímetro cúbico de tecido. Aumento: 100µm.

Através de colorações histológicas foi possível observar a arquitetura e a composição de músculos antes e após a descelularização. Através da coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E) foi possível observar a ausência de núcleos celulares nos tecidos descelularizados (Figura 4 – E-H) e em tecidos controle distróficos são encontradas fibras que passaram por processo de regeneração e a presença de núcleos internos em algumas fibras, indicando ciclos de degeneração e regeneração destas fibras (Figura 4 – A e B). Pelas colorações Tricromo de Masson, Tricromo de Gomori e Ferro Coloidal foram localizadas nos tecidos controle e descelularizados as regiões de fibras colágenas dos tecidos. Assim, pode-se julgar que as

estruturas colágenas foram preservadas após a descelularização (**Fig.4; Fig.5**). Quando corados por Azul de Alcian, foi possível observar a presença de proteoglicanos na MEC de músculos controle e descelularizados, com quantidade aparentemente maior em músculos distróficos (**animais 1 e 2**) (**Figura 6 – A-H**). A coloração Safranina O tem como objetivo a detecção de cartilagem, glicosaminoglicanos (GAGs) e mastócitos nos tecidos, porém músculos controle e descelularizados não apresentaram marcação para nenhum destes componentes (**Figura 6 – I-P**). Com a coloração Picrossírius é possível localizar colágeno I (birrefringência laranja-vermelho) e colágeno III (birrefringência verde-amarelo) na MEC através da exposição das lâminas a luz polarizada (**Figura 7**). A partir disto foi possível quantificar os colágenos da MEC através das imagens obtidas, mostrando que após a descelularização a marcação de colágeno foi maior em todos os músculos, exceto no músculo distrófico idoso. Dentre os 4 músculos analisados, o músculo distrófico jovem apresentou a maior quantidade de colágenos, tanto no controle, quanto no material descelularizado (**Figura 9 – A**).

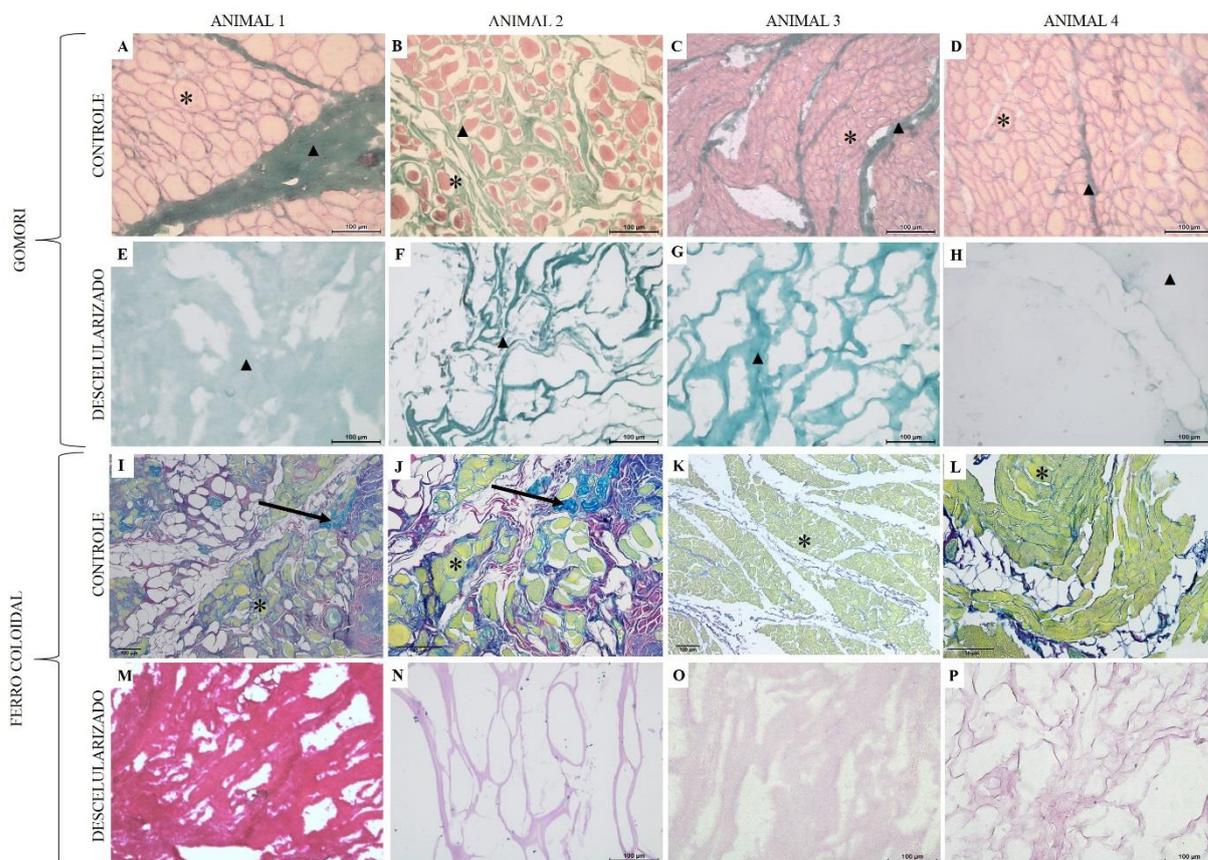
Figura 4. Mm. bíceps femorais de cães distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**), controle (**A-D e I-L**) e descelularizados (**E-H e M-P**) pelas colorações Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Masson.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Visualização de fibras musculares (**asterisco**) em Mm. controle e presença de fibra regenerada (**bola preta**) e núcleos internos (**seta preta**) em Mm controle distróficos. Regiões de fibras colágenas (**triângulo preto**) em Mm. controle e descelularizados. Aumento: 100 μ m.

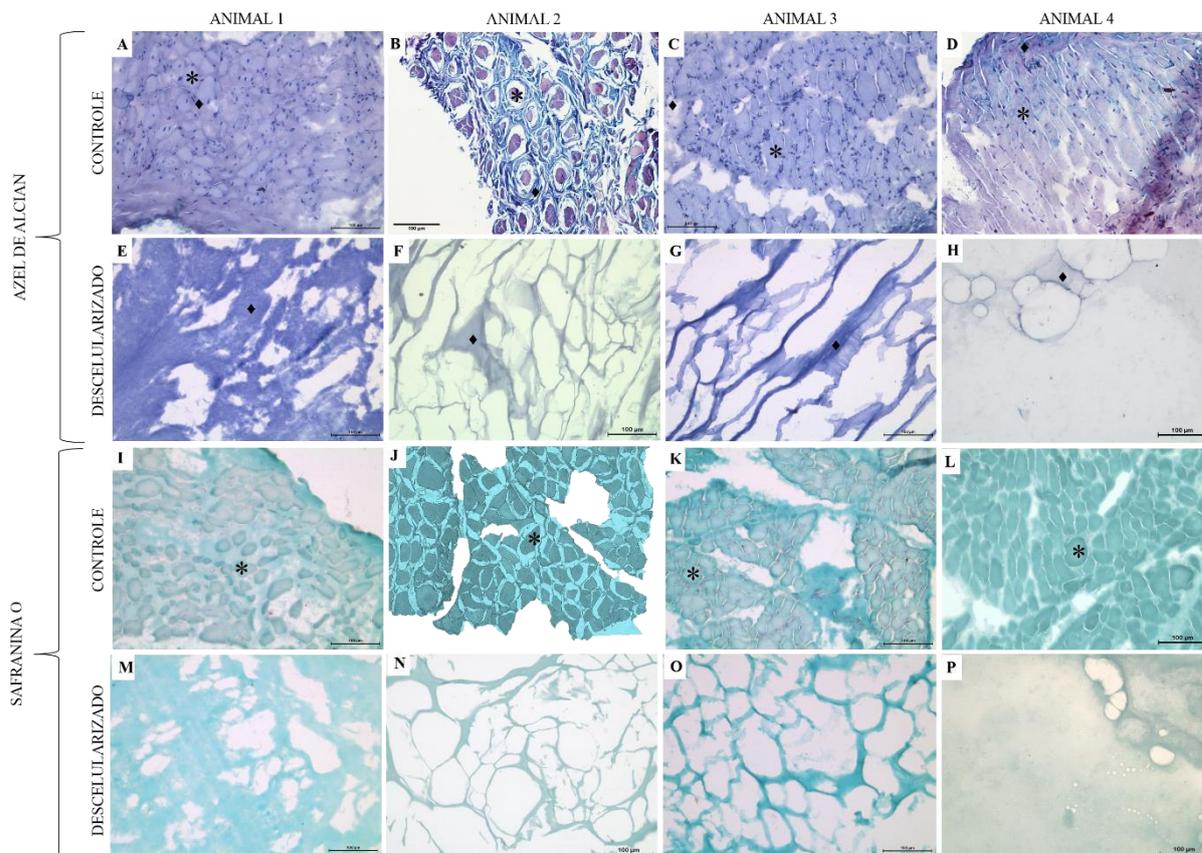
Figura 5. – Mm. bíceps femorais de cães distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**), controle (**A-D e I-L**) e descelularizados (**E-H e M-P**) pelas colorações Tricromo de Gomori e Ferro Coloidal.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Visualização de fibras musculares (**asterisco**) em Mm. Regiões de fibras colágenas (**triângulo preto**) em Mm. controle e descelularizados. Mucina entre feixes de colágeno (**seta preta**). Aumento: 100µm.

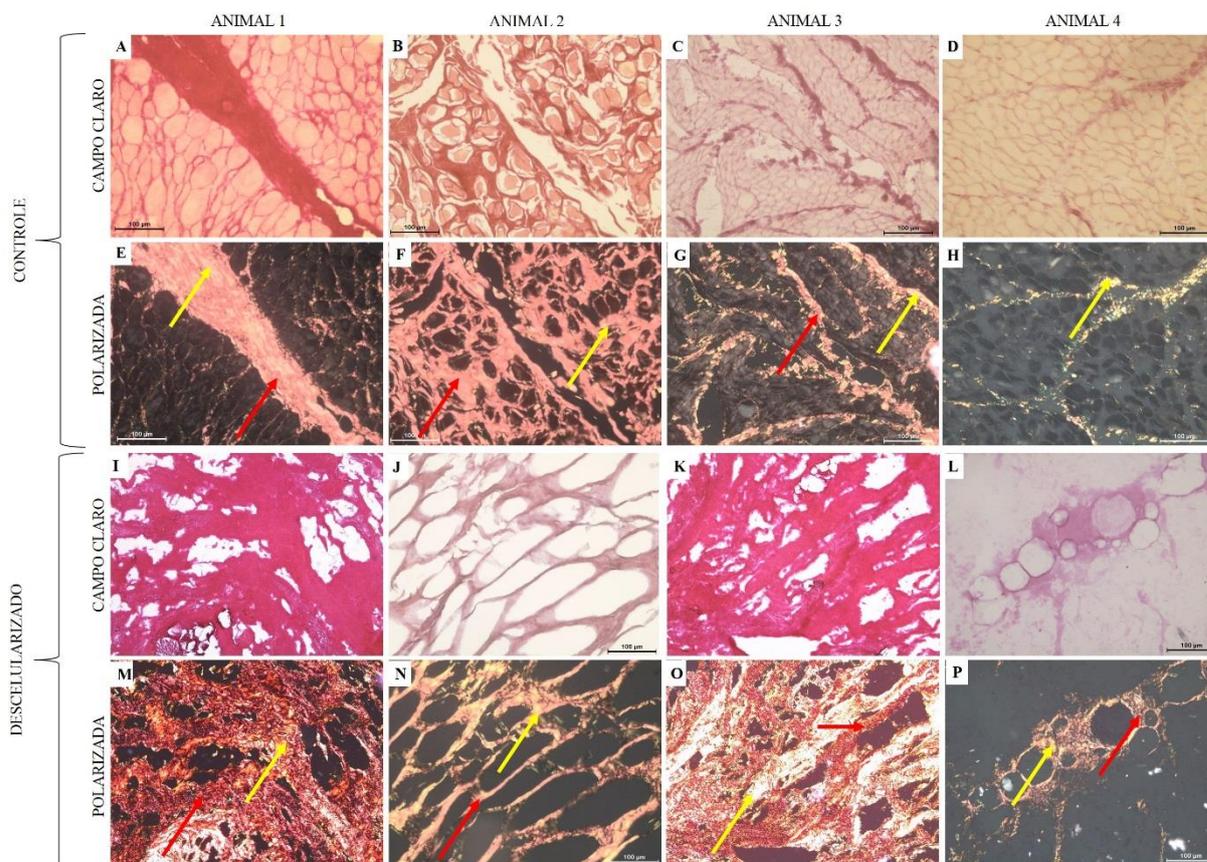
Figura 6. – Mm. bíceps femorais de cães distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**), controle (**A-D e I-L**) e descelularizados (**E-H e M-P**) pelas colorações Azul de Alcian e Safranina O.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Visualização de fibras musculares (**asterisco**) em Mm. Regiões de proteoglicanos em Mm controle e descelularizados (**losango preto**). Aumento: 100μm. Podemos observar a preservação de proteoglicanos após a descelularização na coloração Azul de Alcian (**A-H**). Pela coloração de Safranina O (**I-P**) não houve marcação aparente.

Figura 7. – Mm. bíceps femorais de cães distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**), controle (**A-D e I-L**) e descelularizados (**E-H e M-P**) pela coloração Picrosírius.

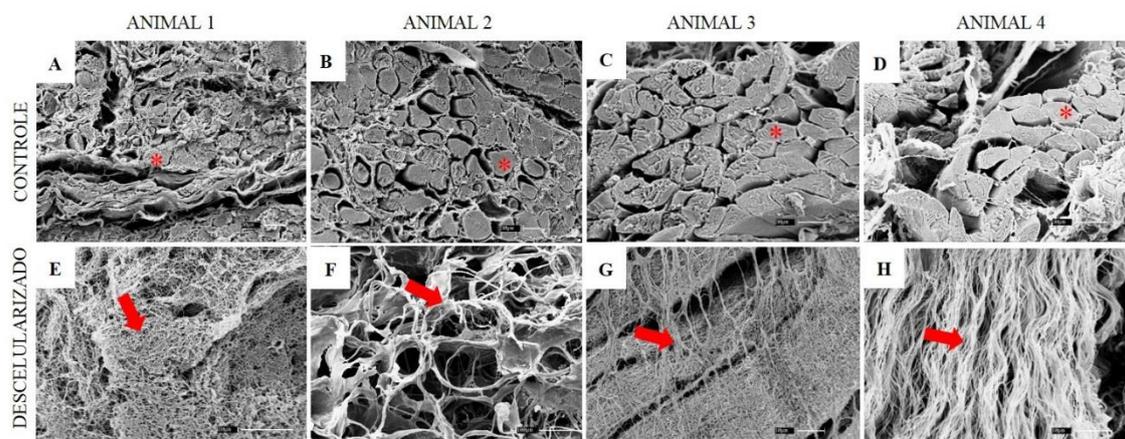


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Imagens em campo claro (**A, B, C, D, I, J, K, L**) e imagens das mesmas regiões sob luz polarizada (**E, F, G, H, M, N, O e P**) possibilitando a visualização de fibras colágenas do tipo I (**seta vermelha**), com birrefringência laranja- avermelhado e do tipo III (**seta amarela**), com birrefringência verde-amarela. Aumento: 100 μ m.

Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura foram utilizadas para observação da ultraestrutura de músculos controle e descelularizados. A partir desta técnica foi possível observar fibras musculares de tamanhos irregulares nos animais distróficos (**animais 1 e 2**) controle (**Figura 8 – A-H**) e a ausência de células nos tecidos descelularizados distróficos e não distróficos e a visualização de fibras elásticas da MEC (**Figura 8 – I-P**).

Figura 8. – Microscopia Eletrônica de Varredura de Mm. bíceps femorais controle (A-D) e descelularizados (E-H) de cães distróficos (Animais 1 e 2) e não distróficos (Animais 3 e 4).

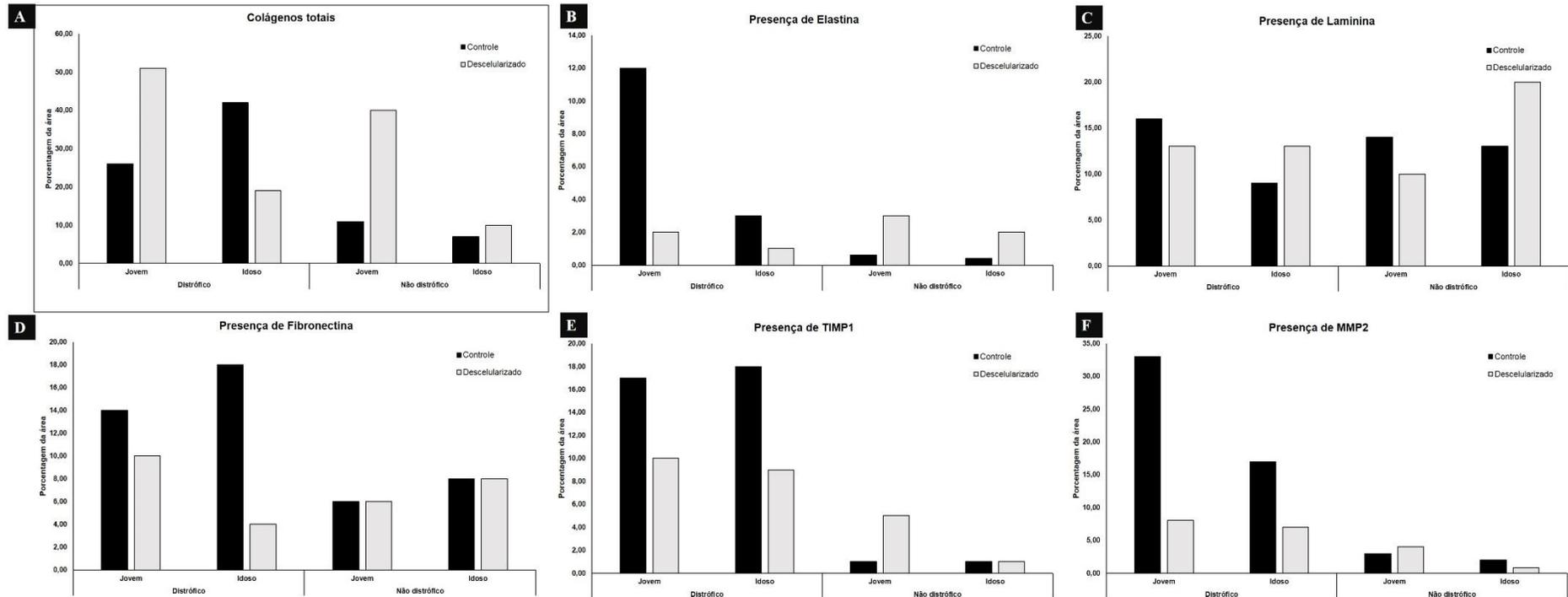


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Mm. controle com visualização das fibras musculares (asterisco vermelho) e Mm. descelularizados apresentando apenas fibras elásticas da MEC (seta vermelha). Aumento: 100 μ m.

Para observação de moléculas que compõem músculos descelularizados e controle foi realizada imunohistoquímica. Por esta análise foi possível observar a expressão de laminina em tecidos descelularizados e em tecidos controle, mostrando expressão maior da mesma nos tecidos de animais idosos após a descelularização, enquanto tecidos de animais jovens apresentaram expressão menor após a descelularização (**Figura 9 – C**). A fibronectina foi expressa em todos os tecidos, porém nos animais distróficos teve sua expressão diminuída após a descelularização, já em animais não distróficos a expressão se manteve mesmo após a descelularização (**Figura 9 – D**). A expressão de metaloproteinase 2 (MMP2) ocorreu em todos os tecidos, porém foi mais evidente nos animais distróficos antes e após a descelularização. O animal não distrófico jovem apresentou ligeiro aumento na expressão de MMP2 após a descelularização (**Figura 9 – F**). Houve maior expressão do anticorpo inibidor de metaloproteinase I (TIMP1) nos animais distróficos tanto antes, quanto após a descelularização quando comparados a músculos não distróficos. O músculo não distrófico jovem apresentou pequeno aumento na expressão de TIMP1 após a descelularização (**Figura 9 – E**). O anticorpo para elastina apresentou grande expressão no animal distrófico controle, com diminuição da mesma após a descelularização. Nos músculos não distróficos, a expressão de elastina se mostrou maior após a descelularização (**Figura 9 – B**). Controles negativos não apresentaram nenhum tipo de marcação imunohistoquímica, apenas a coloração de hematoxilina.

Figura 9. – Quantificação de colágenos totais (A) e de marcação imunohistoquímica (B-F) em músculos controle e descelularizados.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Quantificação de colágenos totais em músculos distróficos e não distróficos (A), mostrando maior expressão de colágenos em todos os tecidos após a descelularização, exceto no músculo distrófico idoso. A presença de elastina em músculos esqueléticos descelularizados (B) foi mais expressiva em músculos jovens. A expressão de Laminina em músculos esqueléticos descelularizados (C) foi mais presente em músculo não distrófico idoso. A fibronectina (D) apresentou diminuição na expressão após a descelularização em músculos distróficos e se manteve em músculos não distróficos. TIMP1 apresentou maior expressão em músculos distróficos após a descelularização. A expressão de MMP2 diminui após o processo de descelularização em músculos distróficos, porém se manteve maior que em músculos não distróficos.

3.4.DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos, em geral, se baseia na utilização de biomateriais e células para regeneração de tecidos e órgãos a fim de suprir a demanda de órgãos para transplantes (BARRETO et al., 2019), porém a engenharia de tecidos também pode ser uma ferramenta para estudos toxicológicos e de enfermidades, se relacionando também a utilização de modelos animais, como apresentado neste trabalho com a distrofia muscular. Apesar de serem amplamente estudados, muitas vezes a utilização de pequenos animais como modelos não reproduz completamente a disfunção contrátil e metabólica encontrada nas miopatias humanas, para isso podem ser utilizados modelos maiores como os cães (WANG et al., 2019). A partir disto, foi possível utilizar técnicas da bioengenharia de biomateriais para melhor entendimento do músculo distrófico.

O protocolo de descclularização com a utilização de SDS a 1% de músculos distróficos e não distróficos se mostrou eficiente na remoção de componentes celulares do tecido. Em visão macroscópica, foi possível observar mudança de coloração dos tecidos musculares, de marrom/avermelhado para creme/branco após a descclularização, além de aparente diminuição na consistência do tecido, principalmente de animais não distróficos, porém sem rupturas no tecido, resultado semelhante ao apresentado por (PORZIONATO et al., 2015). A mesma não apresentou a existência de células nos tecidos após a descclularização em marcação por DAPI e todos os fragmentos obtiveram quantidade menor que 50ng de DNA por mg de tecido em análise de quantificação de DNA, como estabelecido na literatura (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

As colorações histológicas podem ser utilizadas como uma das formas de observar se houve remoção de células do tecido descclularizado e também para observação de componentes de tecidos descclularizados e não descclularizados. Podem ser utilizadas tanto colorações gerais como específicas. A partir das colorações histológicas H&E, que cora a MEC de rosa (hematoxilina) e os núcleos celulares de roxo (eosina) (GUPTA; MISHRA, 2018), foi observada a remoção total de componentes celulares de matrizes musculares descclularizadas. Em músculos controle (não descclularizados), pela mesma coloração, além de células, músculos distróficos apresentam a presença de fibras regeneradas e presença de núcleos internos, indicando ciclos de necrose, degeneração e regeneração (TERRY; WELLS, 2016). Foi possível observar a preservação das regiões de colágeno da MEC após a descclularização nas colorações de Tricromo de Masson, Tricromo de Gomori e Ferro Coloidal e a presença de proteoglicanos na MEC antes e após a descclularização, mostrando a sua preservação na coloração de Azul de

Alcian (PORZIONATO et al., 2015) (GUPTA; MISHRA, 2018). A coloração de Safranina O é capaz de marcar em vermelho os glicosaminoglicanos no tecido (HIROTAKA MUTSUZAKI, HIROMI NAKAJIMA, 2018), porém não ocorreu marcação em músculos controle e descelularizados, mesmo sendo sabido que os proteoglicanos fazem parte da MEC muscular (GILLIES; LIEBER, 2011). Pela MEV é possível observar as fibras musculares nos tecidos controle e nos tecidos descelularizados é possível visualizar somente fibras elásticas da MEC, semelhante ao encontrado por outros autores (PORZIONATO et al., 2015).

Para caracterização de componentes da MEC, foram realizadas a coloração de Picrossírius para localização dos colágenos I e III e imunohistoquímica para os anticorpos laminina, fibronectina, MMP2, TIMP 1 e elastina.

A coloração vermelha de Picrossírius Red é uma das técnicas histoquímicas mais conhecidas. Ela se baseia nas propriedades birrefringentes do colágeno e é muito mais específica do que as outras colorações de colágeno comuns. Esta coloração tem a capacidade de se ligar a diversas moléculas, não somente o colágeno, porém quando ligado ao colágeno, esta se orienta paralelamente as fibrilas de colágeno, aumentando muito sua birrifringência e tornando os colágenos mais birrifringentes que outras proteínas, assim, quando sob luz polarizada, estes apresentam marcação brilhante em tons de laranja, amarelo, vermelho e verde. Os colágenos I e III são os mais detectáveis pela coloração de Picrossírius Red (RITTIÉ, 2017). Como evidenciado por (CSAPO; GUMPENBERGER; WESSNER, 2020), os colágenos I e III são os mais abundantes no músculo esquelético adulto. Nos resultados obtidos foi possível observar grande quantidade de colágenos I e III (colágenos totais) nos 4 animais analisados (quantificação da coloração Picrossírius Red) com diminuição da quantidade do mesmo após a descelularização. A porcentagem de colágenos totais em animais distróficos controle foi maior do que a porcentagem observada em animais não distróficos, possivelmente pela deposição de tecidos na MEC causada pela degeneração do tecido muscular.

Nas análises imunohistoquímicas, a laminina é um dos componentes da MEC e se encontra principalmente na membrana basal (THEOCHARIS et al., 2016). Nos músculos analisados, a laminina foi expressa em todos os animais antes e após a descelularização. Segundo (CSAPO; GUMPENBERGER; WESSNER, 2020), a quantidade de laminina apresenta diminuição com o envelhecimento do indivíduo, como observado nos animais distrófico e não distrófico idosos, já que estes apresentaram menor porcentagem de colágenos quando comparados aos animais jovens. Os dois animais idosos utilizados (animais 2 e 4) apresentaram maior porcentagem de colágenos após a descelularização, que foi observada, provavelmente, pois com a remoção das células a MEC fica mais evidente, permitindo maior

marcação de alguns componentes. Nos animais distróficos controle a fibronectina foi expressa principalmente nas fibras musculares, já em animais não distróficos controle ela foi expressa na MEC. Em músculos normais a fibronectina é vista em uma distribuição contínua no endomísio e seu sarcoplasma é desprovido de fibronectina porém em músculos que passaram por degeneração foi vista a redução da fibronectina no endomísio e seu aparecimento no sarcoplasma (GULATI; REDDI; ZALEWSKI, 1982). O aparecimento da fibronectina no sarcoplasma pode ser a causa da maior porcentagem observada em músculos distróficos controle (animais 1 e 2). Após a descelularização, os músculos de animais distróficos apresentaram grande diminuição na porcentagem de fibronectina, também podendo estar relacionada a deposição de fibronectina no sarcoplasma dos tecidos antes da descelularização. Em animais não distróficos a porcentagem se manteve a mesma antes e após a descelularização. As metaloproteínases são moléculas reguladoras da formação, remodelação e degradação de componentes da MEC. Sua expressão é maior em músculos que passaram por algum processo de degeneração (GILLIES; LIEBER, 2011). Sua expressão foi maior em tecidos musculares distróficos controle (animais 1 e 2), como observado por (FUKUSHIMA et al., 2007) em modelos de distrofia muscular canina ligada ao X no Japão (CXMD₁). Porém, em músculos distróficos (animais 1 e 2) descelularizados a expressão de MMP2 apresentou diminuição. Nos animais não distróficos (animais 3 e 4) controle, a expressão de MMP2 foi significativamente inferior a observada em músculos distróficos, porém no músculo não distrófico jovem (animal 3) houve pequeno aumento da expressão de MMP2, podendo indicar pequenos danos a MEC. Assim como as metaloproteínases, o TIMP1, um de seus reguladores, apresentou expressão maior em animais distróficos (animais 1 e 2) controle (FUKUSHIMA et al., 2007) com diminuição da expressão após a descelularização. Sabe-se que a elastina faz parte das moléculas que compoem a MEC muscular (TAKALA; VIRTANEN, 2000). Em músculos controle a expressão de elastina foi maior no animal 1 (distrófico jovem) em comparação aos outros animais. Em músculos descelularizados, a expressão de elastina apresentou aumento nos animais não distróficos (animais 3 e 4), possivelmente relacionada a maior exposição da MEC após a descelularização.

3.5.CONCLUSÃO

Muitos trabalhos têm como objetivo descrever a MEC de músculos não distróficos, porém pouco é abordado sobre a MEC distrófica. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que existem diferenças entre a MEC distrófica e não distrófica, principalmente em relação a fatores de degeneração no tecido, como o MMP2. Proteínas de matriz, tais como laminina e fibronectina, se apresentam em maior expressão em MEC distróficas, possivelmente devido a substituição de tecidos causada pela degeneração do tecido muscular. Apesar dos relevantes resultados obtidos, mais informações obtidas através de análises moleculares destes músculos seriam de grande valia.

REFERÊNCIAS

BARRETO, R. S. N. et al. Mouse placental scaffolds : a three -dimensional environment model for recellularization. **Jornal of Tissue Engineering**, v. 10, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31448074>>.

BUSHBY, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy , part 1 : diagnosis , and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 1, p. 77–93, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29395989/>>.

COSTA, A. et al. Biologic scaffolds. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1–24, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28320826/>>.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>>.

CSAPO, R.; GUMPENBERGER, M.; WESSNER, B. Skeletal muscle extracellular matrix - What do we know about its composition, regulation and physiological roles ? A narrative review. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 253, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32265741/>>.

DIAS, C. M. et al. Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy . Part 2 : rehabilitation and systemic care. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 76, n. 7, p. 481–489, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30066800/>>.

FUKUSHIMA, K. et al. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMD J). **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 11, p. 1–11, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17598883/>>.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle & Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318–331, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mus.22094>>.

GULATI, A. K.; REDDI, A. H.; ZALEWSKI, A. A. Distribution of Fibronectin in Normal and Regenerating Skeletal Muscle. **THE ANATOMICAL RECORD**, v. 183, p. 175–183, 1982. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6760747/>>.

GUPTA, S. K.; MISHRA, N. C. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. **Methods in Molecular Biology**, v. 1577, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28550502/>>.

HIROTAKA MUTSUZAKI, HIROMI NAKAJIMA, M. S. Extension of knee immobilization delays recovery of histological damages in the anterior cruciate ligament insertion and articular cartilage in rabbits. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 30, n. 1, p. 140–144, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/322727860_Extension_of_knee_immobilization_delays_recovery_of_histological_damages_in_the_anterior_cruciate_ligament_insertion_and_articular_cartilage_in_rabbits>.

KORNEGAY, J. N. **The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy Skeletal Muscle**, 2017. . Disponível em: <file:///C:/Users/airot/Downloads/kornegay 2017 grmd duchenne (1).pdf>.

M ROIG , A FARGAS, M GRATACÓS, J. R. Role of the extracellular matrix in X-chromosome-linked muscular dystrophy: immunohistochemical study. **Revista de Neurologia**, v. 26, n. 154, p. 895–904, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9658456/>>.

MCGREEVY, J. W. et al. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Disease Models & Mechanisms**, p. 18, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4348559/>>.

PORZIONATO, A. et al. Decellularized human skeletal muscle as biologic scaffold for reconstructive surgery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14808–14831, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140375>>.

RITTIÉ, L. Fibrosis. **Methods in Molecular Biology**, p. 520, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28836216/>>.

SHIMIZU-MOTOHASHI, Y. et al. Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy : Current Status of Therapeutic Approaches. **Journal of Personalized Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30621068/>>.

TAKALA, T. E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix : the effect of loading. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in sports**, v. 10, p. 321–325, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11085558/>>.

TERRY, R. L.; WELLS, D. J. Histopathological Evaluation of Skeletal Muscle with Specific Reference to Mouse Models of Muscular Dystrophy. **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 6, p. 343–363, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27906462/>>.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>>.

WANG, J. et al. Engineered skeletal muscles for disease modeling and drug discovery. **Biomaterials**, v. 221, n. August, p. 119416, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119416>>.

4. Artigo II – Recelularização de músculos caninos e a influência de sua matriz extracelular na distrofia muscular

Vitória Frias Batista; Gustavo de Sá Schiavo Matias; Ana Claudia O. Carreira e Paula Fratini.

RESUMO

A bioengenharia de tecidos une medicina, biologia celular e engenharia de biomateriais. Os biomateriais correspondem a microambientes biológicos produzidos a partir da descclularização de tecidos, com objetivo de remover componentes celulares do tecido sem causar grandes danos a matriz extracelular (MEC) possibilitando a sua recelularização. O principal objetivo da bioengenharia de tecidos é a reparação ou substituição de tecidos e órgãos, porém as técnicas de descclularização e recelularização podem ser utilizadas também para estudo de doenças como a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). A DMD é uma doença hereditária ligada ao cromossomo X e é causada por mutação no gene responsável pela síntese de distrofina, fazendo com que sua produção seja reduzida ou inexistente. Sua principal função é ligar a matriz extracelular ao citoesqueleto e sua ausência resulta em degeneração muscular. A DMD afeta 1 a cada 3500-5000 nascidos vivos do sexo masculino e em geral o modelo de Distrofia Muscular do *Golden Retriever* é bastante utilizado como modelo animal para o estudo da DMD em humanos devido à similaridade com a doença humana. O objetivo deste trabalho foi a recelularização matrizes extracelulares de músculos distróficos e não distróficos com células tronco mesenquimais de gordura (CTMg), fibroblastos 3T3, células musculares distróficas e células musculares não distróficas, para observar a interação da MEC com as células. Seria a MEC de músculo distrófico e não distrófico capaz de influenciar/ alterar o processo de recelularização? Para isso, primeiramente, as células utilizadas foram caracterizadas por imunocitoquímica e citometria de fluxo e os músculos descclularizados por SDS a 1% passaram por esterilização em ponto crítico e lavagens em álcool 70%, PBS e exposição a luz UV. Para mensuração da proliferação das células durante o processo de recelularização, foi realizado ensaio de taxa de proliferação por Rezasurina e para detectar contaminações no meio de cultivo foi realizado teste de PCR para detecção de Micoplasma e avaliação microbiológica em meio líquido e ágar. Para validação da eficiência da recelularização foram realizadas as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), quantificação de DNA e imunofluorescência. Como resultados, as células apresentaram maior taxa de proliferação quando em contato com o *scaffold* muscular e o protocolo de esterilização

foi eficiente, já que os testes para detecção de *Mycoplasma* foram negativos e não foi observada morte celular ou contaminação do meio após plaqueamento. A quantidade de DNA apresentou aumento após a recelularização e pela MEV são visíveis camadas de células sobre o *scaffold*. Não foram observadas diferenças no processo de recelularização entre as duas matrizes estudadas, distrófica e não distrófica, ambas permitiram a proliferação dos tipos celulares estudados, sendo que as células que melhor proliferaram sobre o *scaffold* foram as CTMg. Dados obtidos pela técnica de imunofluorescência após a recelularização sugerem que a MEC não distrófica estimule a expressão de distrofina em células distróficas. Mais estudos precisam ser realizados para comprovação deste achado.

Palavras-Chave: Distrofia Muscular. Matriz extracelular. Descelularização. Recelularização. Músculos.

ABSTRACT

Tissue bioengineering combines medicine, cell biology and biomaterial engineering. The biomaterials corresponding to biological microenvironments obtained from the decellularization of tissues, with the objective of removing cellular components from the tissue without causing great damage to the extracellular matrix (ECM) allowing its recellularization. The main objective of tissue bioengineering is the replacement or repair of tissues and organs, however, as techniques for decellularization and recellularization can also be used for the study of diseases such as Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). DMD is an inherited disease linked to the X chromosome and is caused by a mutation in the gene responsible for dystrophin synthesis, causing its production to be reduced or non-existent. Its main function is to connect the extracellular matrix to the cytoskeleton and its absence results in muscle degeneration. DMD affects 1 in every 3500-5000 male live births and in general the Golden Retriever Muscular Dystrophy model is widely used as an animal model for the study of DMD in humans due to its similarity to human disease. The aim of this work was to recellularize extracellular matrices of dystrophic and non-dystrophic muscles with mesenchymal fat stem cells (fCTM), 3T3 fibroblasts, dystrophic muscle cells and non-dystrophic muscle cells, to observe the interaction between MEC and cells. Would a MEC of dystrophic and non-dystrophic muscle be able to influence / alter the process of recellularization? For this, first, the cells used were characterized by immunocytochemistry and flow cytometry and the muscles decellularized by 1% SDS underwent critical sterilization and washes in 70% alcohol, PBS and exposure to UV light. To measure the proliferation of cells during the recellularization process, a proliferation rate assay was performed by Rezasurin and for detection of contamination in the culture medium, a PCR test was performed for Mycoplasma detection and microbiological evaluation in liquid and agar media. To validate the efficiency of recellularization, the techniques of Scanning Electron Microscopy (SEM), DNA quantification and immunofluorescence were performed. As a result, the main cells proliferation rate when in contact with the muscular scaffold and the sterilization protocol was efficient, since the tests for Mycoplasma detection were negative and was not observed cell death or culture medium contamination after plating. The amount of DNA shown to increase after recellularization and by SEM is selected from cells on the scaffold. No differences were observed in the recellularization process between the two matrices studied, dystrophic and non-dystrophic, both allowed the proliferation of the cell types studied, and the cells that best proliferated on the scaffold were as fCTM. Data obtained by the immunofluorescence technique after recellularization suggest that non-dystrophic ECM

stimulates dystrophin expression in dystrophic cells. More studies need to be carried out to prove this finding.

Keywords: Muscular dystrophy. Extracellular matrix. Decellularization. Recellularization. Muscles.

4.1.INTRODUÇÃO

A bioengenharia de tecidos é a área que une a biologia celular, engenharia de biomateriais e medicina com o principal objetivo de reparar/substituir tecidos e órgãos (JAFARI et al., 2017). Os biomateriais correspondem a microambientes biológicos tridimensionais produzidos a partir do processo de descelularização, visando a remoção de células do tecido sem causar grandes danos a matriz extracelular (MEC), de forma que permita a posterior recelularização desse tecido. No geral, os processos de descelularização e recelularização tem como objetivo a produção do mesmo órgão ou parte dele, porém as técnicas de descelularização e recelularização podem ser utilizadas para objetivos, como por exemplo, o estudo da MEC em miopatias, como as distrofias musculares.

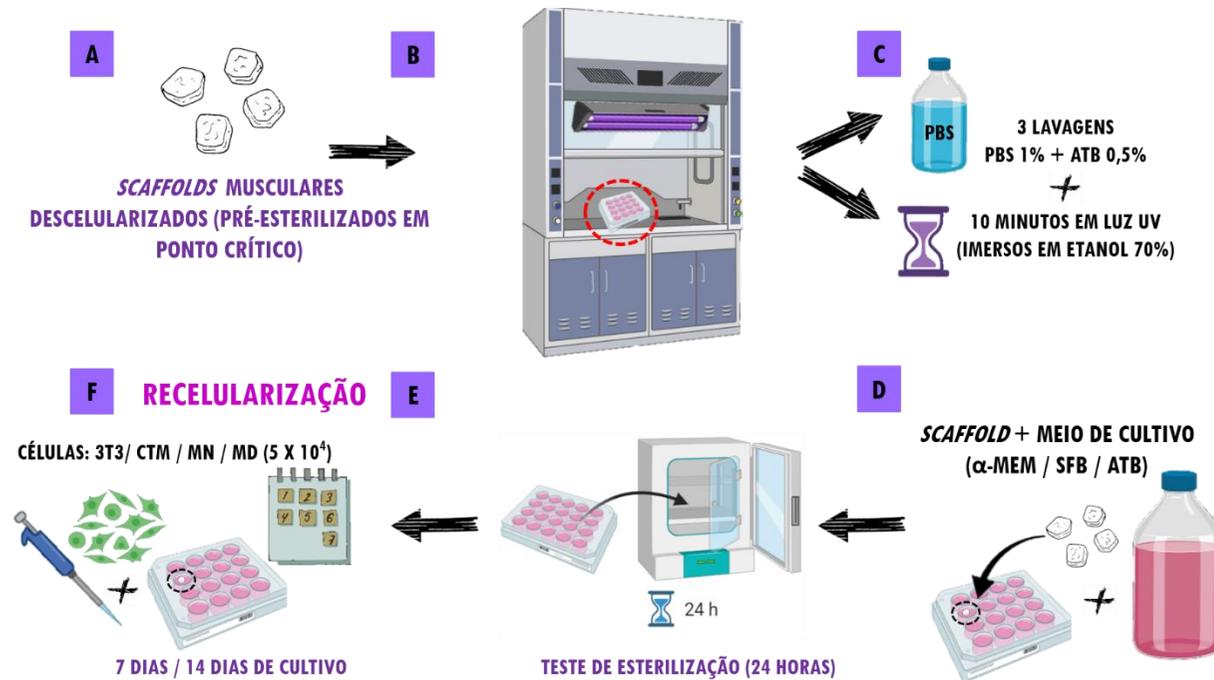
As distrofias musculares formam um complexo grupo de doenças neuromusculares hereditárias (EMERY, 2002). No geral, são caracterizadas por fraqueza muscular progressiva, porém apresentam diferenças genéticas, bioquímicas, nos músculos afetados e no grau de comprometimento respiratório e cardíaco dentre elas. A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a distrofia muscular mais comum e mais grave (CARTER et al., 2018).

A DMD é uma doença muscular progressiva geneticamente herdada como uma doença ligada ao cromossomo X e é causada por mutações no gene da distrofina causando a diminuição ou interrupção da expressão desta proteína (SALMANINEJAD et al., 2018). A distrofina tem um papel estrutural importante no músculo, pois liga o citoesqueleto à matriz extracelular (NOWAK; DAVIES, 2004) e sua ausência causa diminuição ou perda da integridade da membrana das miofibrilas e ciclos repetidos de necrose e regeneração. O músculo é gradualmente substituído por tecido conjuntivo fibroso e gordura, levando a fraqueza muscular (KORNEGAY, 2017). A DMD afeta 1 a cada 3.500 a 5000 nascidos vivos do sexo masculino (DIAS et al., 2018) e para seu estudo podem ser utilizados modelos animais. O modelo animal mais utilizado de distrofia muscular é o modelo de Distrofia Muscular do Golden Retriever (GRMD), pois é o modelo mais semelhante a DMD apresentada em humanos (KORNEGAY et al., 2012). A junção da utilização de modelos animais com técnicas de descelularização e recelularização pode ser promissora para estudos de distrofias musculares em geral.

Por fim, o objetivo deste trabalho foi a recelularização de matrizes extracelulares de músculos distróficos e não distróficos com células tronco mesenquimais de gordura, fibroblastos 3T3, células musculares distróficas e células musculares não distróficas, para observar a interação da MEC com as células. Seria a matriz extracelular de músculo distrófico e não distrófico capaz de influenciar/ alterar o processo de recelularização

4.2.MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1. Desenho experimental da recelularização de *scaffolds* musculares.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: *Scaffolds* musculares após passagem em aparelho de ponto crítico para pré-esterilização dos fragmentos (A). Esterilização de *scaffolds* musculares em fluxo laminar através de lavagens em PBS 1% + ATB 0,5%, álcool 70% e exposição a luz ultravioleta (UV) (B e C). Após a esterilização, *scaffolds* foram colocados em cultivo e foram mantidos sem células durante 24 horas para testes de esterilidade (D e E). Após o período de 24 horas, células foram postas em cultivo junto aos *scaffolds* durante 7 e 14 dias possibilitando posteriores análises (F). CTM – Célula tronco mesenquimal; 3T3 – Fibroblasto 3T3; MN e MD – Célula muscular não distrófica e distrófica.

4.2.1. *Descelularização e Recelularização de músculos distróficos e não distróficos*

Músculos bíceps femorais de cães distróficos (jovem - animal 1 e idoso animal 2) e não distróficos (jovem - animal 3 e idoso - animal 4) foram descelularizados por imersão em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% sob agitação constante durante 25 dias. Após o período de imersão em SDS, os fragmentos musculares passaram por sucessivas lavagens em tampão fosfato-salino (PBS) a 1% para remoção completa de SDS dos tecidos (Comitê de Ética no Uso de Animais - n.º 4520070119). Após o processo de descelularização as amostras de músculo foram fragmentadas e colocadas em aparelho de Ponto Crítico (EMITECH K550) para secagem e pré-esterilização. Depois de secas, as amostras ficaram imersas em 10 ml de PBS 1x estéril com 1% de antibiótico (ATB) (LGC- Penicilina-Estreptomicina) durante 48 horas. Após as 48 horas, os fragmentos foram colocados em placas de 35mm preenchidas por álcool 70%. Com os fragmentos mergulhados em álcool 70%, estes foram expostos a luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos. Em seguida, o álcool foi removido e os fragmentos passaram por três lavagens de 5 minutos com PBS 1x + ATB 0,5%. Ao fim da esterilização, os fragmentos de músculos foram distribuídos em placas não-aderentes (Sarstedt) (3 fragmentos por poço para quantificação de DNA genômico e 1 fragmento por poço para as demais análises). As placas foram preenchidas por 1ml de meio de cultivo completo (Alpha-Mem - LGC + soro fetal bovino (SFB) - LGC 10%) e colocadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (dióxido de carbono) por 24 horas para evitar possíveis contaminações. Após o período de observação as células foram colocadas sobre os músculo descelularizado (5×10^4) e mantidas em cultivo (células + *scaffolds*) pelos períodos de 7 e 14 dias, como estabelecido por (FRATINI P, RIGIOLIO NN, MATIAS GSS; RICI REG, 2018). Tecidos dos 4 animais foram recelularizados com os 4 tipos celulares.

4.2.2. *Cultivo Celular*

As células utilizadas foram células musculares de cães distróficos, células musculares de cães não distróficos, fibroblastos de linhagem 3T3 e células tronco mesenquimais de gordura (CTMg). As células musculares distróficas e não distróficas e fibroblastos utilizados para cultivo foram adquiridos no banco de células do laboratório de bioengenharia tecidual da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ – USP). As células tronco mesenquimais de gordura (CTMg) foram doadas após cultivo primário e caracterização em trabalho desenvolvido no Núcleo de Terapia Celular e Molecular da USP (CEUA n° 8941120916) (KOGA, 2020).

Depois de retiradas do freezer -150°C , as células armazenadas em criotubos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (DMSO + SFB) foram descongeladas com acréscimo de meio de cultivo completo previamente aquecido e centrifugadas (Quimis: Q-222T116). Ao fim da centrifugação foi possível observar um *pellet* de células no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o aglomerado de células foi ressuspense em meio de cultivo completo e após a homogeneização, o meio com células foi transferido para garrafa de cultivo de 25cm^3 (50ml) sendo colocada em estufa a 37°C com 5% de CO_2 até atingirem confluência ideal para utilização.

4.2.3. *Imunocitoquímica*

A imunocitoquímica foi feita em células cultivadas sobre lamínula circular em placa 24 poços.

Para realização de imunocitoquímica, o material foi fixado em PFA a 4% durante 10 minutos, em seguida as células passaram por 3 lavagens de 5 minutos em PBS + 0,5% Tween 20. A diluição do anticorpo primário foi feita em PBS + BSA 1%. Após a aplicação do anticorpo primário, o material ficou em incubação em estufa a 37°C durante uma hora. Após o período de incubação dos anticorpos primários para distrofina (BIOSS - 980809W – 0,5:100 Rb), desmina (Invitrogen - MA5-13259 – 1:100 Ms), MyoD (Invitrogen – MA1-41017 – 0,5:100 Ms), n-caderina (Abcam - AB51034 – 1,5:100 Rb), PCNA (Invitrogen – MA5-11358 - 1:100 Ms), faloidina (Alexa FluorTM 594 – A12381 – 1:100), vimentina (GENETEX - GTX35160 – 1:150 Ms), CD105 (Invitrogen - MA5-11854 – 1:200 Ms), CD90 (Abcam - AB11155 – 1:100 FITC), CD73 (BIOSS - BS-4834R – 1:100 Rb) e β -tubulina (Santa Cruz - SC-47751 – 1:100 Ms), o material foi lavado novamente em PBS + 0,5% Tween 20 (3 lavagens de 5 minutos) para aplicação dos anticorpos secundários Alexa FluorTM 488 (Invitrogen – A11059 – anti-mouse – 1:100) e Alexa Fluor[®] 568 (Life Technologies – A11011 – anti-rabbit – 1:100) que ficaram em incubação em câmara úmida durante uma hora. Mais uma sequência de lavagens foi feita e em seguida o DAPI foi aplicado com incubação de 10 minutos. O material passou por últimas lavagens e as lamínulas circulares com células foram retiradas da placa e colocadas em lâminas histológicas. Todo o material foi analisado e fotografado em microscópio confocal (Olympus Fluo ViewTM 1000).

Tabela 1 - Células e anticorpos utilizados na imunocitoquímica.

<i>Células</i>	<i>Anticorpos utilizados</i>
<i>Musculares distróficas</i>	Distrofina, desmina, MyoD, N-caderina, PCNA, Faloidina e Vimentina.
<i>Musculares não distróficas</i>	Distrofina, Desmina, MyoD, N-Caderina, PCNA, Faloidina e Vimentina.
<i>Fibroblastos 3T3</i>	CD105, CD90, β -Tubulina, PCNA, Faloidina e Vimentina.
<i>Tronco Mesenquimais de gordura (CTMg)</i>	CD105, CD90, CD73, PCNA, Faloidina e Vimentina.

4.2.4. Citometria de fluxo

O método de citometria de fluxo foi utilizado para análise imunofenotípica das células de acordo com (FRATINI et al., 2016).

As células em cultivo tiveram seu meio descartado e 1 ml de tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia) adicionado e colocado em estufa por 5 minutos para soltura de células da placa. Após a remoção da tripsina as células foram centrifugadas e ressuspensas em 2ml de PFA a 4% durante 20 minutos. Após a fixação as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em 5 ml de PBS a 1% estéril e mantidas em geladeira até a utilização.

Células em PBS a 1% foram centrifugadas por 5 minutos e seu sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 μ l de solução de bloqueio (PBS + 0,3% TRITON X-100) deixada por 10 minutos em geladeira. Após o bloqueio, o anticorpo primário, diluído em PBS + BSA 2%, (mesmos anticorpos utilizados na imunocitoquímica, exceto VEGF – Bioss bs-1665R 1:100) foi adicionado e incubado em geladeira por 1 hora. Tubos controle não tiveram adição de anticorpo, as células foram mantidas em PBS 1%. Após a incubação do anticorpo primário, as células foram centrifugadas (800rpm) por 5 minutos, seu sobrenadante foi descartado e estas foram lavadas em 500 μ l de PBS 1% por 5 minutos. Após a lavagem, as células foram centrifugadas novamente para retirada do PBS. Em seguida foi adicionado o anticorpo secundário (mesmos utilizados na imunocitoquímica), diluído em PBS + BSA 2% que foi mantido em incubação por 1 hora no escuro. Para retirada do anticorpo secundário, as células foram centrifugadas e lavadas em PBS 1%, em seguida foram centrifugadas novamente para remoção do PBS. As células foram ressuspensas em 350 μ l de PBS 1% e mantidas em geladeira no escuro até o momento de leitura em citômetro de fluxo (FACSAria II Cell Sorter – BD

Bioscience). Como controle negativo usaram-se as células não marcadas e células marcadas apenas com o anticorpo secundário. A análise dos dados foi realizada no Software BD FAC SDIVA e Flow-Jo v 7.6.5.

4.2.5. Teste de Resazurina

Sete mg de pó de Resazurina, sal sódico (Sigma-Aldrich –R7017-5G) foram diluídos em 50ml de PBS 1%. Foram testadas 5 medições: Meio de cultivo sem resazurina; somente resazurina; meio de cultivo + resazurina; *scaffold* + células + resazurina; células + resazurina. Para os testes, *scaffolds* foram colocados em placas de 24 poços (KASVI – K12-024) em cultivo com células e foram acrescentados 2ml de resazurina (50% de meio Alpha-MEM - LGC). Para análise, foram coletados 200µl de solução nos dias de cultivo 1, 3, 7, 10 e 14. Até o dia de leitura, no dia 14, as coletas foram mantidas em geladeira. Para leitura, as soluções mantidas em geladeira foram distribuídas em placa de cultivo de 96 poços (KASVI – K12-096) lidas em espectrofotômetro (µQuant – Bio-Tek Instruments, INC) a 540nm. Para a análise de células + resazurina o protocolo foi o mesmo. Após a obtenção dos dados, foram montados gráficos de proliferação.

4.2.6. Teste de PCR para detecção de *Mycoplasma*

O ensaio de PCR foi realizado utilizando um protocolo adaptado de (UEMORI et al., 1992), com um nested PCR, que é capaz de detectar 11 espécies diferentes de *Micoplasma* (*M.fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. neurolyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. capricolum*). Além das espécies de *Micoplasma*, uma espécie de *Ureaplasma* foi testada. Os testes tiveram o intuito de detectar a possível presença de *Micoplasma* no *scaffold* descelularizado (para a recelularização do mesmo) utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (passo PCR1), seguida pela técnica de Nested-PCR (PCR2) e análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose corado com brometo de etídeo, de acordo com o Protocolo Operacional Padrão estabelecido no NUCEL-USP. O experimento testou 2 controles negativos: um controle de reação negativo (sem amostra) e o meio Alpha-MEM utilizado para incubar músculos descelularizados. Um meio contendo *Micoplasma* foi usado como controle positivo. Os meios de incubação da matriz muscular descelularizada foram testados.

4.2.7. Avaliação Microbiológica

Para as avaliações microbiológicas foram utilizados 100uL do meio de cultivo celular (Alpha-MEM) do processo de recelularização. Os diferentes meios de cultura a serem analisados foram inoculados em Meio Líquido e Meio Sólido (ágar) de Luria-Bertani (LB) (Farmacopéia Brasileira), em meio Luria-Bertani (LB) líquido. As amostras foram incubadas em shaker orbital (Etica) a 250 rpm a 37°C por 9 dias para o teste em meio líquido, e para o teste em meio LB sólido, a temperatura ambiente (22-24°C) por 15 dias. As placas e tubos de cultivo foram analisados para a presença de contaminantes, quanto à turbidez e presença de possíveis colônias.

4.2.8. Quantificação de DNA de amostras recelularizadas

O gDNA (DNA genômico) de amostras recelularizadas 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 em Proteinase K e tampão de lise a partir do kit a 56°C durante 2 horas. As amostras de gDNA purificadas foram analisadas em espectrofotômetro a 260nm (Nanodrop, ThermoScientific). Para todas as quantificações foram analisadas duas repetições.

4.2.9. Imunofluorescência

Os *scaffolds* recelularizados foram fixados em paraformaldeído a 4%. Os *scaffolds* foram lavados com PBS + Tween a 0,5% e incubados com os anticorpos primários distrofina (BIOSS - 980809W – 0,5:100 Rb), MyoD (Invitrogen – MA1-41017 – 0,5:100 Ms), n-caderina (ABCAM - AB51034 – 1,5:100 Rb), PCNA (Invitrogen – X 1:100 Ms), vimentina (GENETEX - GTX35160 – 1:150 Ms), CD90 (Abcam - AB11155 – 1:100 FITC), CD73 (BIOSS - BS-4834R – 1:100 Rb), CD44 (GENETEX - GTX80086 – 1:100 Ms), TGFβ1 (Santa Cruz Biotechnology – SC-146 - 1:100 Rb), laminina (Invitrogen - PA1-16730 – 1:800 Rb) e fibronectina (Invitrogen - MA5-11981 – 1:100 Ms). Em seguida, foram lavados em PBS + 0,5% Tween e os anticorpos secundários Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen – A11059 – anti-mouse – 1:100), Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen – A11008 – anti-rabbit – 1:100), Alexa Fluor® 568 (Life Technologies – A11062 – anti-mouse – 1:100) e Alexa Fluor® 568 (Life Technologies – A11011 – anti-rabbit – 1:100) foi adicionado. As placas foram incubadas com DAPI para

marcação nuclear. As amostras foram analisadas no Microscópio Confocal (Olympus Fluoview™ 1000).

Tabela 2 – Anticorpos utilizados na Imunofluorescência da recelularização.

<i>Amostras</i>	<i>Anticorpos utilizados</i>
<i>Scaffolds + células musculares distróficas</i>	Distrofina, MyoD, N-Caderina, PCNA e Vimentina.
<i>Scaffolds + células musculares não distróficas</i>	Distrofina, MyoD, N-Caderina, PCNA e Vimentina.
<i>Scaffolds + Fibroblastos 3T3</i>	CD90, CD44, TGFβ1, PCNA e Vimentina.
<i>Scaffolds + células tronco Mesenquimais de gordura (CTMg)</i>	CD73, CD44, TGFβ1, PCNA e Vimentina.
MEC	Laminina e Fibronectina

4.2.10. *Microscopia Eletrônica de Varredura*

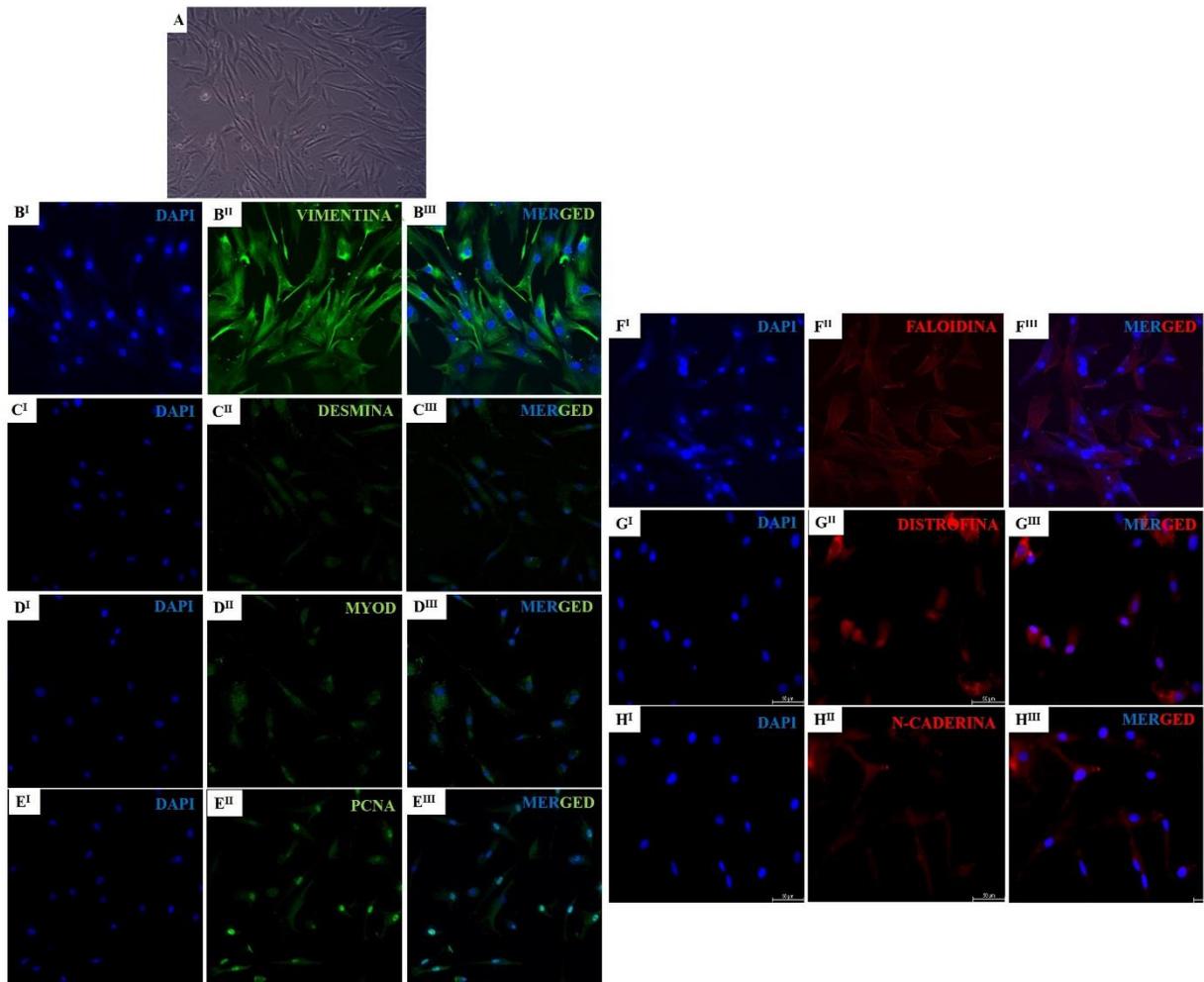
Os *scaffolds* recelularizados foram fixados em solução de Karnovsky durante 48 horas e armazenados em álcool 70% por 24h. As amostras foram secas em aparelho de ponto crítico automatizado (EM CPD300, Leica), transferidas para *stubs* e metalizadas com ouro (# K550, Emitech-Ashford, Reino Unido) possibilitando a formação da imagem através da reflexão de elétrons. As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435VP).

Todas as análises por imagem foram realizadas no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CADI – FMVZ USP), por técnica responsável.

4.3.RESULTADOS

Para recelularização dos *scaffolds* de cães distróficos e não distróficos foram utilizadas células musculares caninas distróficas, células musculares caninas não distróficas, fibroblastos de linhagem 3T3 e células tronco mesenquimais de gordura canina. Em cultivo, estas células apresentaram bom desenvolvimento, porém células tronco mesenquimais de gordura e células musculares não distróficas demonstraram crescimento mais lento (**Fig.2 – A; Fig.3 – A; Fig. 4 – A; Fig.5 – A**). Para caracterização dessas células foi realizada a imunocitoquímica das mesmas. Células musculares não distróficas e células musculares distróficas apresentaram marcação positiva para vimentina, desmina, proteína determinante de mioblastos 1 (MyoD), antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA), faloidina e n-caderina (**Fig. 2 e Fig.3**), porém somente células musculares não distróficas apresentaram marcação positiva para distrofina (**Figura 3**). Os anticorpos vimentina, como um marcador de filamentos intermediários, e faloidina, como marcador de actinas do citoesqueleto, são importantes para observação da morfologia celular. Células musculares não distróficas apresentam morfologia mais alongada em relação a células musculares distróficas. A marcação positiva do anticorpo PCNA em ambas as células (muscular distrófica e não distrófica) mostra que as células estão em proliferação, já que se trata de uma proteína auxiliar da DNA polimerase. Desmina, MyoD e distrofina funcionam como marcadores específicos de células musculares, porém a expressão diminuída de distrofina nas células musculares distróficas já era esperada, já que se tratam de células provenientes de músculos de animais distróficos.

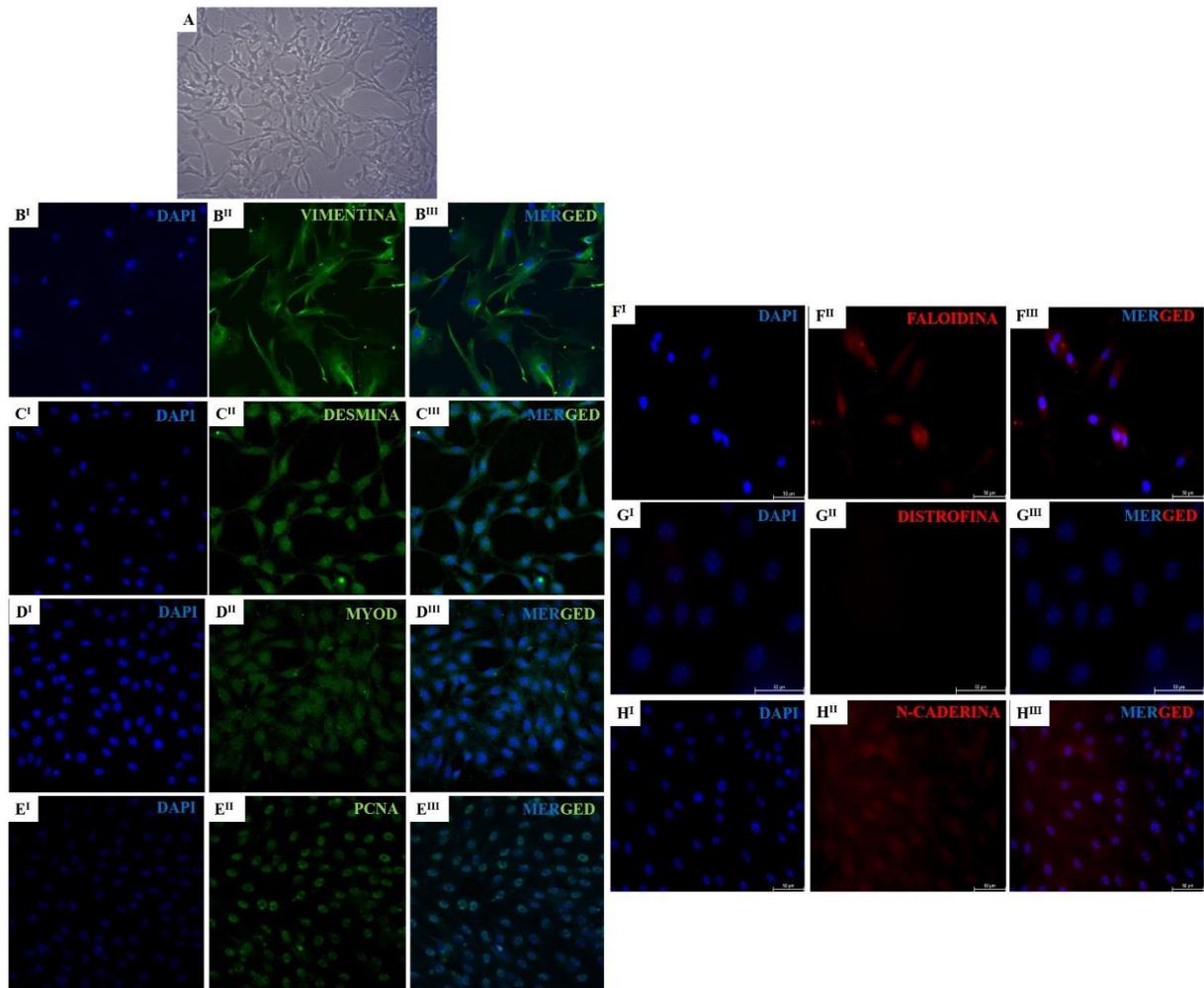
Figura 2. Imunocitoquímica de células musculares de cão não distrófico.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Em A, células em cultivo. DAPI possibilita a marcação de núcleos celulares (B^I, C^I, D^I, E^I, F^I, G^I e H^I). As células apresentaram marcação positiva para todos os anticorpos. Vimentina (B^{II}) e faloidina (F^{II}) possibilitam a observação da morfologia celular. PCNA (E^{II}), evidencia a proliferação celular e distrofina (G^{II}), MyoD (D^{II}) e desmina (D^{II}) como marcadores específicos de células musculares.

Figura 3. Imunocitoquímica de células musculares de cão distrófico.

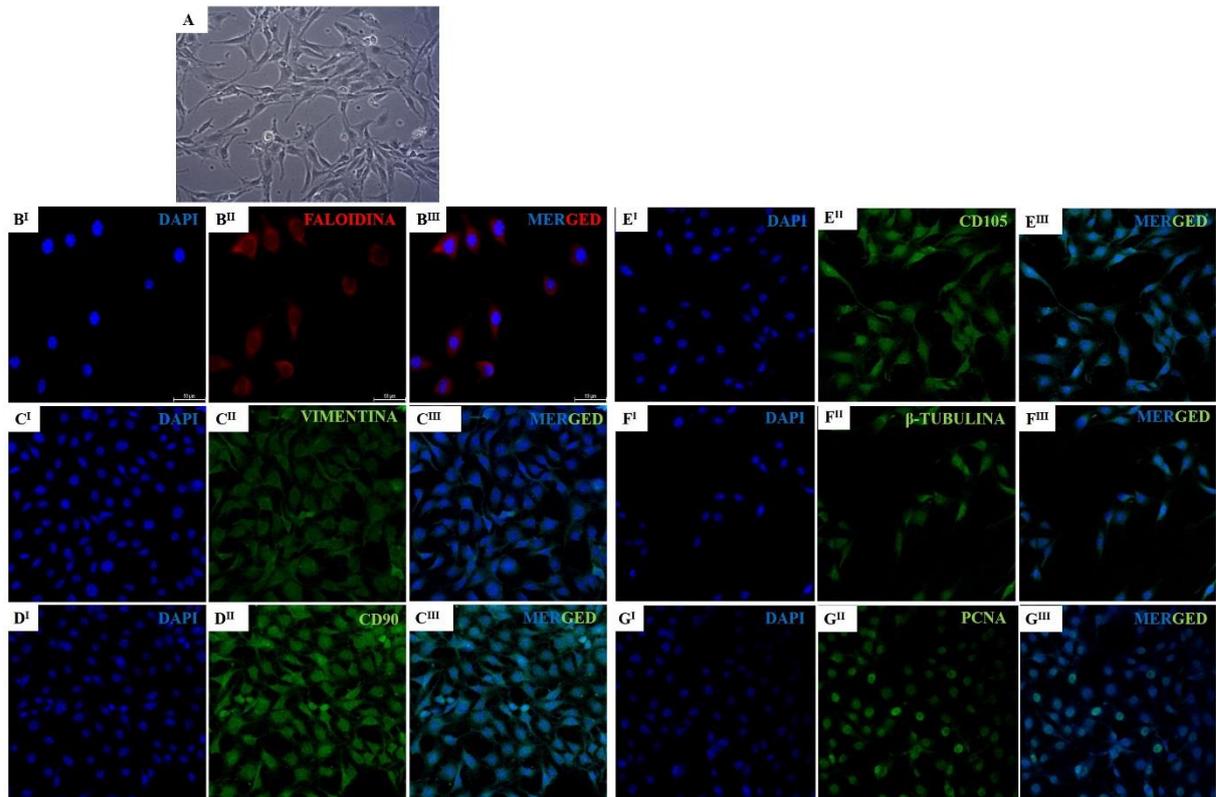


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Em A, células em cultivo. DAPI possibilita a marcação de núcleos celulares (B^I, C^I, D^I, E^I, F^I, G^I e H^I). As células apresentaram marcação positiva para todos os anticorpos, exceto para o anticorpo distrofina (G^{II}). Para observação da morfologia celular os marcadores vimentina (B^{II}) e faloidina (F^{II}). Com PCNA (E^{II}) é possível observar a proliferação celular e Distrofina (G^{II}), MyoD (D^{II}) e Desmina (C^{II}) como marcadores específicos de células musculares.

Na caracterização de fibroblastos, estes apresentaram expressão positiva para os anticorpos glicoproteína de membrana tipo I (CD105), *cluster* de diferenciação 90 (CD90), vimentina, faloidina, β -tubulina e PCNA. A expressão positiva de PCNA indica que as células possuem capacidade de proliferação. Pelos marcadores vimentina e faloidina é possível observar que estas células possuem núcleos bem arredondados com extensos filamentos laterais. A β -tubulina corresponde a um componente de microtúbulos do citoesqueleto, normalmente expresso em fibroblastos (Figura 4).

Figura 4. Imunocitoquímica de células fibroblásticas de linhagem 3T3.

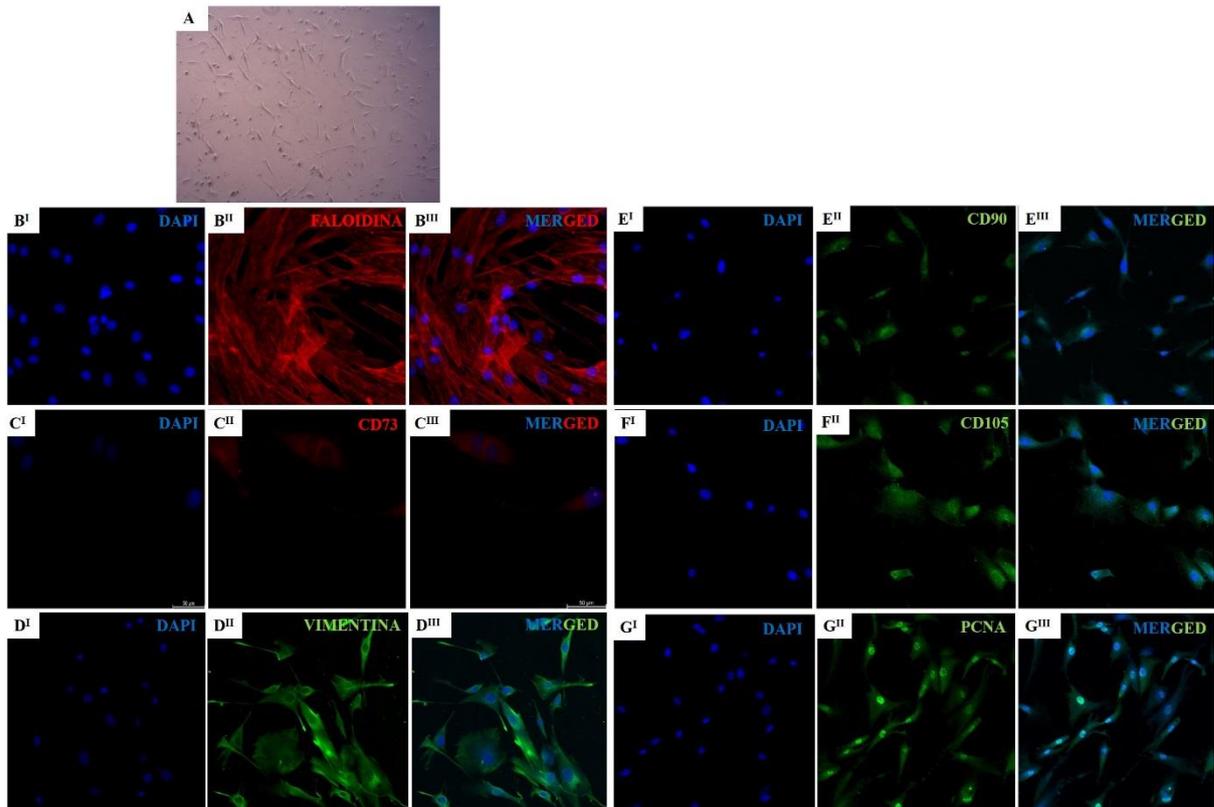


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Em A, células em cultivo. DAPI possibilita a marcação de núcleos celulares (B^I, C^I, D^I, E^I, F^I, G^I e H^I). As células apresentaram marcação positiva para todos os anticorpos. Com vimentina (C^{II}) e faloidina (B^{II}) é possível observar a morfologia celular. PCNA (G^{II}), evidenciando a proliferação celular.

Células tronco mesenquimais de gordura apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD90, CD105, *cluster* de diferenciação 73 (CD73), vimentina, faloidina e PCNA. Os marcadores CD90, CD105 e CD73 são considerados marcadores específicos de células tronco mesenquimais, possibilitando a sua identificação. O marcador PCNA evidencia o potencial de proliferações destas células. Através dos marcadores vimentina e faloidina pode-se dizer que as células apresentam morfologia fibroblastoide (Figura 5).

Figura 5. Imunocitoquímica de células tronco mesenquimais de gordura canina.

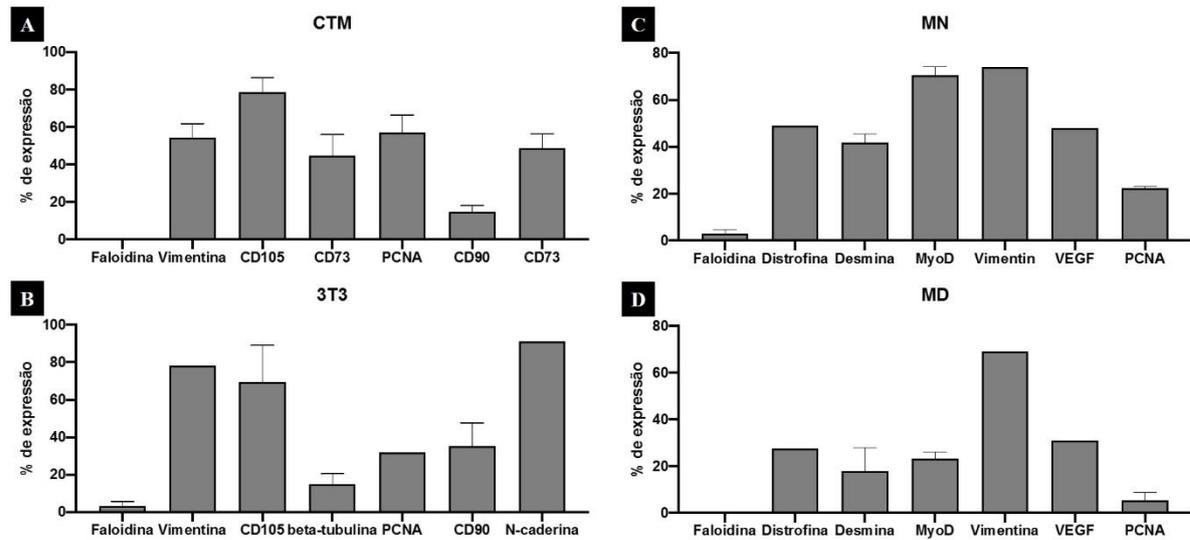


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Em A, células em cultivo. DAPI possibilita a marcação de núcleos celulares (B^I, C^I, D^I, E^I, F^I, G^I e H^I). As células apresentaram marcação positiva para todos os anticorpos. Dentre eles, vimentina (D^{II}) e faloidina (B^{II}) possibilitando a observação da morfologia celular. PCNA (G^{II}), evidenciando a proliferação celular e CD90 (E^{II}), CD73 (C^{II}) e CD105 (F^{II}) como marcadores específicos de células tronco mesenquimais.

Junto a imunocitoquímica, foi realizada a citometria de fluxo de células musculares distróficas e não distróficas, fibroblastos de linhagem 3T3 e células tronco mesenquimais de gordura. Foram utilizados os mesmos anticorpos da imunocitoquímica. A citometria de fluxo apresentou marcação semelhante a apresentada na imunocitoquímica para a maioria dos anticorpos, exceto a faloidina, que não apresentou marcação nas células tronco mesenquimais de gordura (Figura 6 – A) e nas células musculares distróficas e a distrofina que apresentou expressão demasiada em células musculares distróficas (Figura 6 – D). Estes resultados, em partes, confirmam o resultado obtido na imunocitoquímica para caracterização da células.

Figura 6. Citometria de células tronco mesenquimais de gordura e fibroblastos 3T3 e células musculares distróficas e não distróficas.

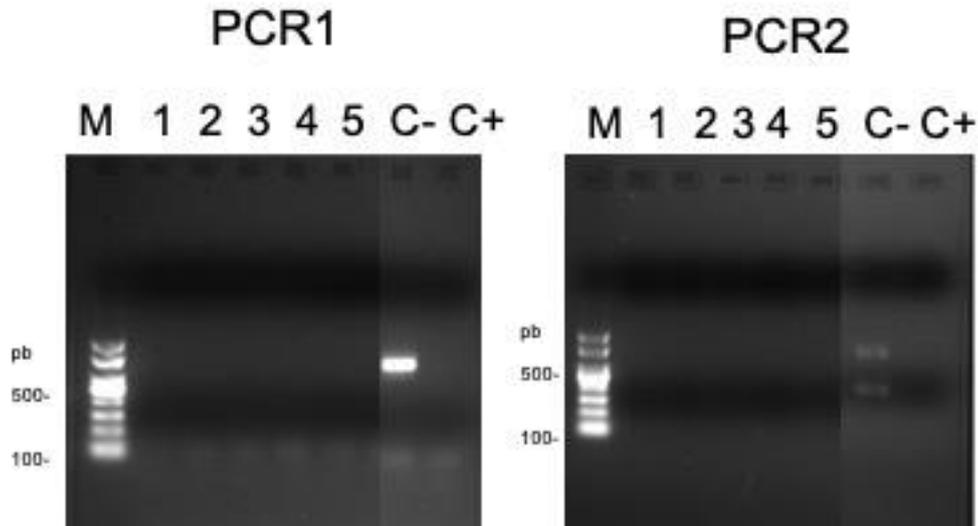


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Níveis da expressão proteica de diferentes marcadores para imunofenotipagem por citometria de fluxo para as células células tronco mesenquimais de gordura (CTM) (A), fibroblastos 3T3 (3T3) (B), células musculares não distróficas (MN) (C) e distróficas (MD) (D). A análise proteica foi realizada por citometria de fluxo. Células em suspensão foram marcadas com Faloidina (A-D), anti-Vimentina (A-D), anti-CD105 (A e B), anti-CD73 (A), anti-PCNA (A-D), anti-CD90 (A e B), anti-beta-Tubulina, anti-n-caderina (B), anti-desmina, anti-MyoD e anti-disrofina (C e D). O controle corresponde a células não marcadas com o anticorpo. As análises foram realizadas nos softwares BD FACSDIVA e Flow Jo, tendo como referência, as células não marcadas de cada célula primária (CTM, 3T3, MN e MD) ou linhagem celular. Dados apresentados como Média e Desvio Padrão.

Após o cultivo e caracterização de células, foi possível dar início a recelularização de *scaffolds* musculares. Para iniciar o processo é necessário esterilizar o material, e para isso, músculos descelularizados foram colocados em aparelho de ponto crítico para secagem e pré-esterilização. Após a pré-esterilização o material passou por lavagens em álcool 70%, PBS 1% e exposição a luz UV e foi mantido em estufa por 1 dia. O meio que estava em contato com os *scaffolds* foi coletado antes do plaqueamento de células e foi submetido a teste de PCR para detecção Micoplasma (Figura 7) e para avaliação microbiológica (Tabela 3). Todas as amostras testadas foram consideradas negativas para a presença das 11 diferentes espécies de Micoplasma e uma de Ureaplasma, conforme observado nos géis de agarose com as amostras resultantes dos PCR 1 e 2. No gel de agarose observou-se apenas a banda referente à amplificação do controle positivo. As amostras também foram consideradas estéreis e livres de contaminantes pelo teste microbiológico em crescimento em meio líquido e sólido. Estes resultados mostram que esterilização de *scaffolds* foi eficiente evitando contaminações ao longo do processo.

Figura 7. Teste de PCR para detecção de Micoplasma em meios de cultivo utilizados na recelularização de *scaffolds* musculares.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Teste de avaliação de contaminação por Micoplasma no meio controle de cultivo celular e meios das células MN na recelularização de MNJ (1), MNV (2), MDJ (3), MDV (4). A imagem mostra a realização do teste previamente descrito na literatura, para a detecção de contaminação por Micoplasma, por meio da técnica de Nested-PCR. C-: água deionizada; C+: Amostra referência contaminada com Micoplasma; M: marcador de peso molecular 100 pares de base.

Tabela 3. Avaliação microbiológica do meio de cultivo utilizado na recelularização de *scaffolds* musculares.

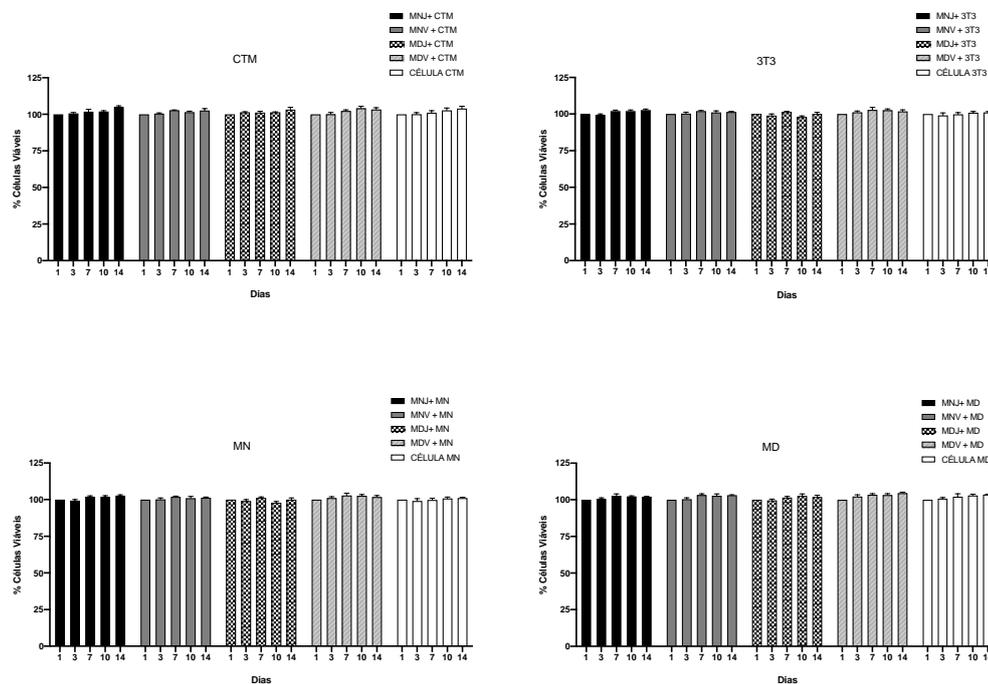
<i>Amostra</i>	<i>Crescimento em LB-líquido</i>	<i>Crescimento em LB-ágar</i>
<i>Meio Controle (Recel)</i>	Negativo	Negativo
<i>Cel MN- Recel.- Animal 1</i>	Negativo	Negativo
<i>Cel MN- Recel.- Animal 2</i>	Negativo	Negativo
<i>Cel MN- Recel.- Animal 3</i>	Negativo	Negativo
<i>Cel MN- Recel.- Animal 4</i>	Negativo	Negativo

Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Avaliação microbiológica feita em meios de cultivo utilizados para recelularização de *scaffolds* musculares dos 4 animais, apresentando resultados negativos para crescimento de microorganismos tanto em LB-líquido quando em LB-ágar.

Após 24h de incubação do meio de cultivo para evitar contaminações, as células foram postas em cultivo junto aos *scaffolds* musculares e mantidas em cultivo durante 7 e 14 dias. Em paralelo a recelularização, o teste de resazurina foi realizado, mostrando que as células proliferam tanto sozinhas quanto em contato com os *scaffolds*, porém o potencial de proliferação é maior quando as células estão em contato com os *scaffolds*. A partir dos gráficos obtidos é possível observar que as células se mantiveram viáveis ao longo de todo o processo de recelularização nos 4 tipos de *scaffolds* musculares. Além disso, células tronco mesenquimais e fibroblastos 3T3 apresentaram taxa de proliferação um pouco maior quando em contato com o *scaffold* do animal 3 (MNJ), enquanto células musculares não distróficas apresentaram maior proliferação no *scaffold* do animal 1 (MDJ) e células musculares distróficas apresentaram maior proliferação no *scaffold* do animal 2 (MDV). Em resumo, de acordo com a taxa de crescimento em relação ao dia 14, o *scaffold* do animal 3 (MNJ) aparentou ser um pouco melhor para o crescimento celular, exceto para as células musculares distróficas, que apresentaram melhor crescimento em *scaffolds* do animal 2 (MDV) (**Figura 8**).

Figura 8. Teste de Resazurina



Fonte: BATISTA (2021)

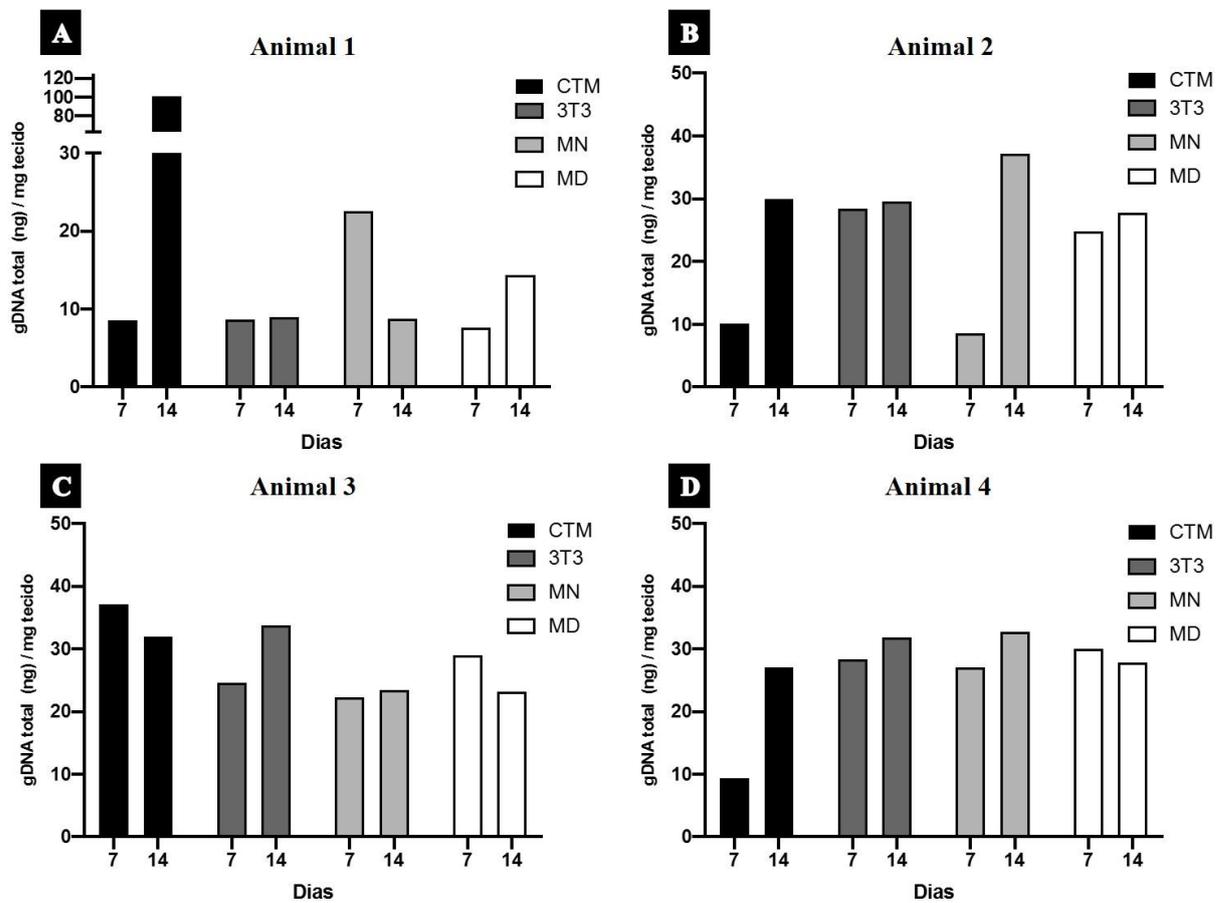
Legenda: Teste de viabilidade e proliferação por Resazurina em músculo não distrófico jovem (MNJ), músculo não distrófico idoso (MNV), músculo distrófico jovem (MDJ) e músculo distrófico idoso (MDV) recelularizados com células tronco mesenquimais de gordura (CTMg), fibroblastos 3T3 (3T3), células musculares não distróficas (MN) e distróficas (MD). A partir dos gráficos é possível observar que as células continuam viáveis ao longo dos dias de recelularização (1, 3, 7, 10 e 14 dias)

Ao final das recelularizações de 7 e 14 dias, os fragmentos foram coletados e uma parte foi utilizada para quantificação de DNA genômico (**Figura 9**), outra para Microscopia Eletrônica de Varredura (**Fig.10 e Fig.11**) e outra para imunofluorescência (**Figura 12-27**).

Através das análises de quantificação de DNA genômico após a recelularização (**Figura 9**), foi possível observar que os *scaffolds* dos 4 animais apresentaram presença dos 4 tipos celulares. Dentro os 4 tipos celulares, em uma visão geral, as células tronco mesenquimais de gordura foram as que apresentaram as maiores porcentagens nos *scaffolds* recelularizados. A maioria das células apresentou maior quantidade nas recelularizações de 14 dias, porém no animal 1 com células musculares não distróficas (**Figura 9 – A**), no animal 3 com células tronco mesenquimais de gordura e de músculo distrófico (**Figura 9 – C**) e no animal 4 com células musculares distróficas (**Figura 9 – D**), a porcentagem de células foi menor na recelularização de 14 dias.

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível observar se houve adesão de células ao *scaffolds*. Todos os *scaffolds* apresentaram a presença de células, porém em alguns materiais as células ainda estavam em formato esférico aderindo ao tecido (**Figura 10 – B, C e J**). Na maioria dos tecidos ocorreu a formação de uma camada de células sobre a matriz muscular, porém a recelularização dos músculos do animal 1 com células fibroblásticas 3T3 (7 dias) (**Figura 10 – M**), do animal 2 com células musculares distróficas (7 dias) (**Figura 10 – F**) e do animal 2 com células fibroblásticas 3T3 (14 dias) (**Figura 11 – N**) aparentaram não apresentar grande quantidade de células aderidas.

Figura 9. Quantificação de DNA genômico em *scaffolds* de músculos distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**) após a recelularização (7 e 14 dias) com células tronco mesenquimais de gordura, fibroblastos 3T3, células musculares distróficas e células musculares não distróficas.

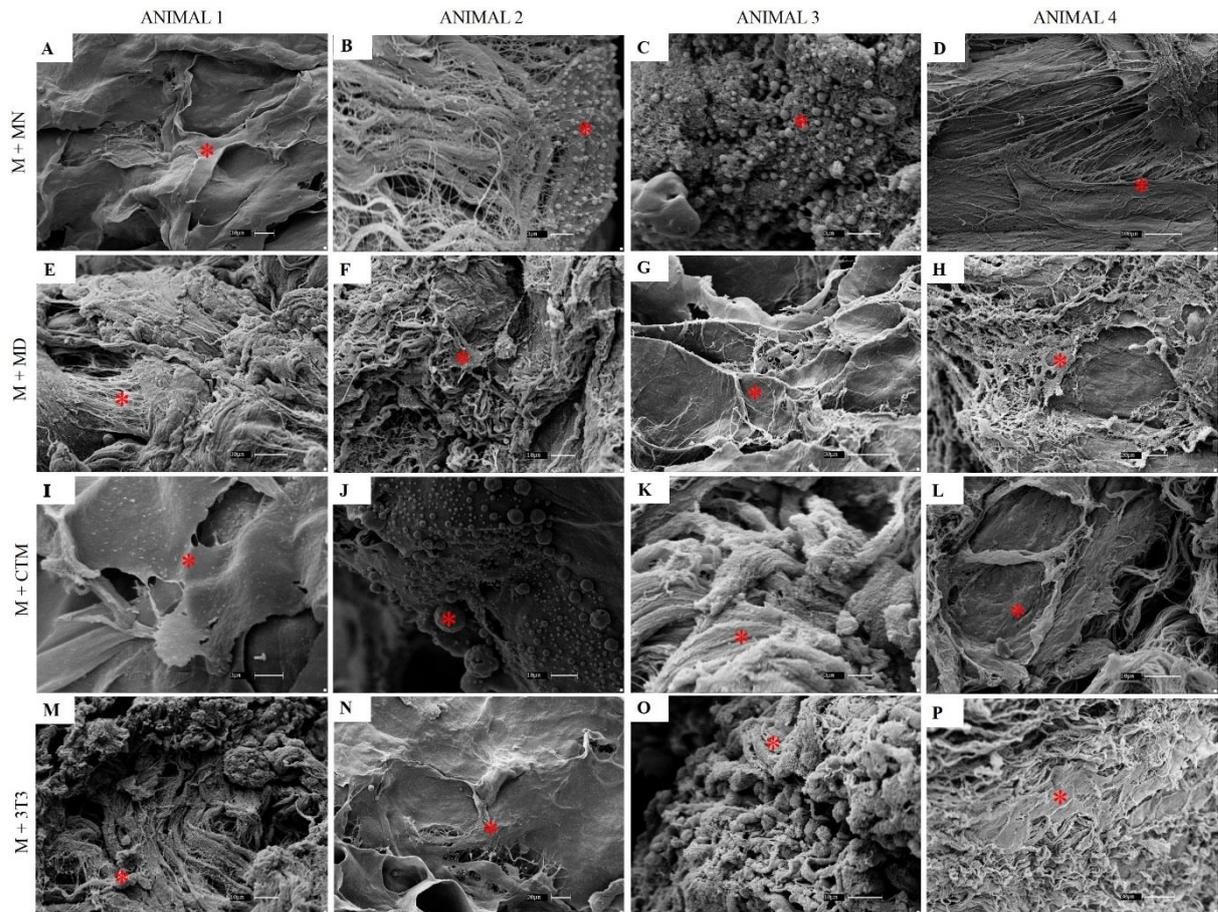


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Em (A), recelularização de músculo distrófico jovem (**Animal 1**), mostrando maior quantidade de células na recelularização com células tronco mesenquimais de gorduraa (**CTM**) após 14 dias de recelularização. Em (B), recelularização de músculos distrófico idoso (**Animal 2**), mostrando maior quantidade células no *scaffold* com células musculares não distróficas (**MN**) após 14 dias de recelularização. Em (C), recelularização de músculo não distrófico jovem (**Animal 3**), mostrando que a recelularização CTM apresentou maior quantidade de células em 7 dias de processo. Em (D), recelularização de músculo não distrófico (**Animal 4**), mostrando que as recelularizações com fibroblastos 3T3 (**3T3**) e com MN apresentaram maior quantidade de células.

CTM – Células Tronco Mesenquimais; **3T3** – Fibroblastos 3T3; **MN** – Células musculares não distróficas; **MD** – Células musculares distróficas.

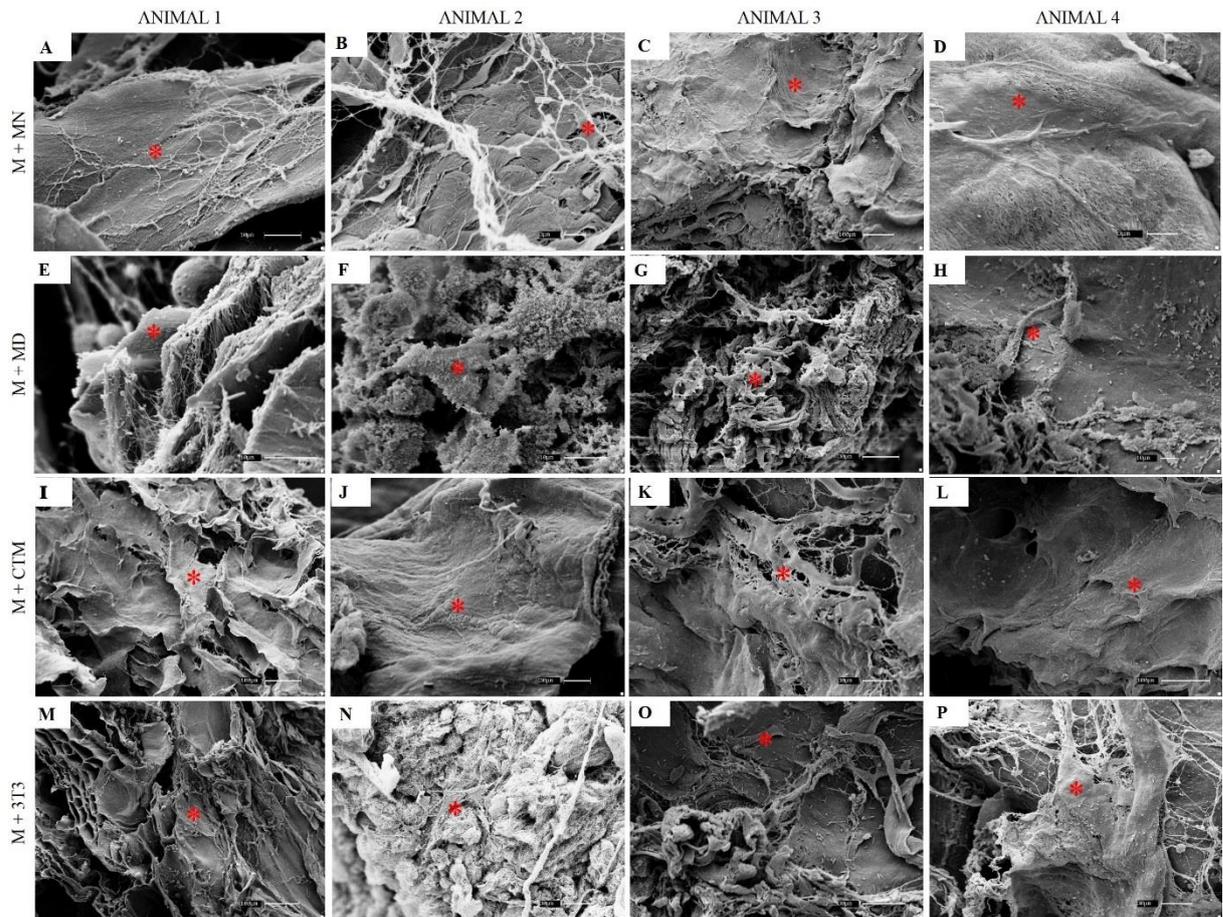
Figura 10. Microscopia Eletrônica de Varredura da recelularização de músculos distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**) por 7 dias.



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Recelularização dos músculos dos 4 animais pelos 4 tipos celulares utilizados, mostrando a ancoragem de células ao tecido após a recelularização. Aparente menor quantidade de células no Animal 2 + MD (**F**) e Animal 1 + 3T3 (**M**). Músculo não distrófico (**MN**); Músculo distrófico (**MD**); Células tronco mesenquimais de gordura (**CTM**); Fibroblastos de linhagem 3T3 (**3T3**).

Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura da recelularização de músculos distróficos (**Animais 1 e 2**) e não distróficos (**Animais 3 e 4**) por 14 dias.



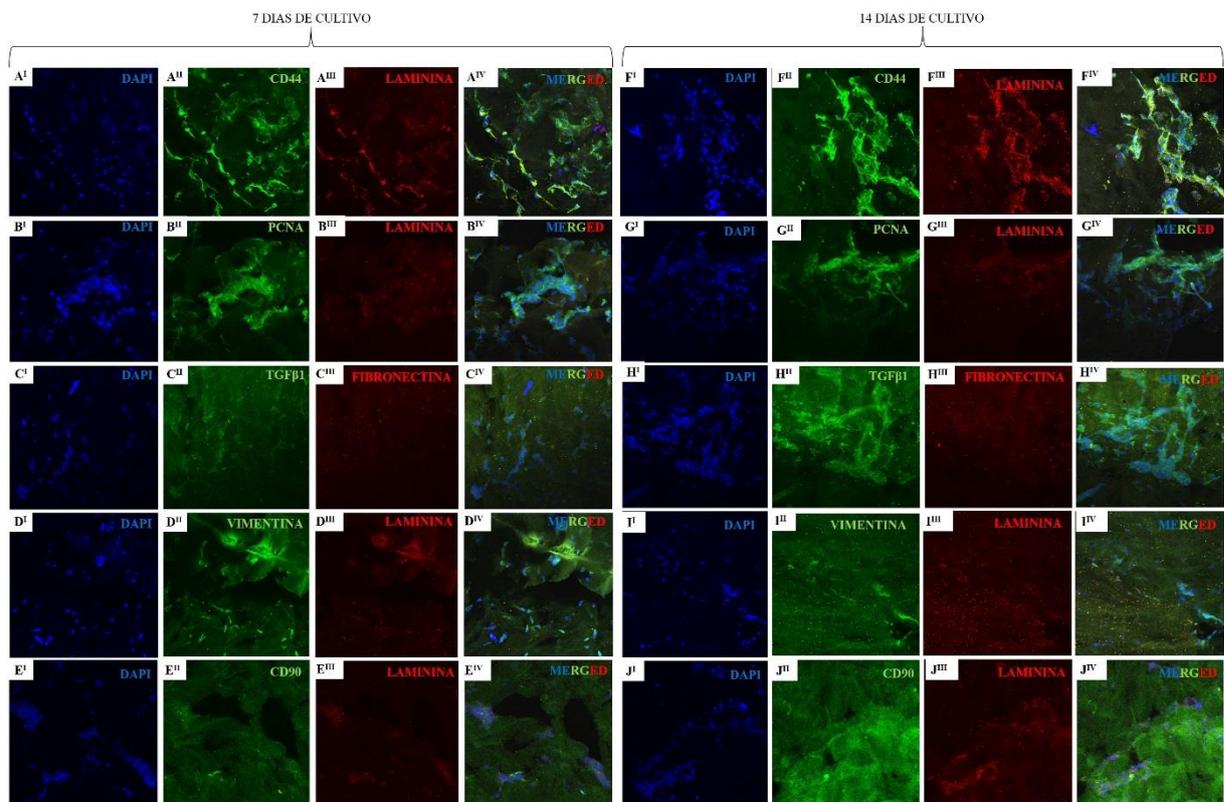
Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Recelularização dos músculos dos 4 animais pelos 4 tipos celulares utilizados, mostrando a ancoragem de células ao tecido após a recelularização. Aparente menor quantidade de células no Animal 2 + 3T3 (**F**). Músculos não distrófico (**MN**); Músculo distrófico (**MD**); Células tronco mesenquimais de gordura (**CTM**); Fibroblastos de linhagem 3T3 (**3T3**).

Nas imunofluorescências das recelularizações, para marcação de células fibroblásticas de linhagem 3T3 nos tecidos recelularizados, foram utilizados os anticorpos para molécula de adesão celular teleguiada (CD44), PCNA, fator de crescimento transformador beta 1 (TGF β 1), vimentina e CD90. Para marcação da MEC foi utilizado o anticorpo para laminina. Na recelularização de fragmentos musculares dos animais 1, 2, 3 e 4 com células fibroblásticas de linhagem 3T3 (**Fig.12**; **Fig.13**; **Fig.14**; **Fig.15**), a marcação foi positiva para o anticorpo marcador de MEC (laminina – molécula presente na MEC muscular), tanto para 7 quanto para 14 dias de recelularização em todos os animais. Recelularizações de 14 dias apresentam aparente maior quantidade de células no tecido. A marcação de CD44 foi positiva nas células presentes nos 4 animais, mostrando que estas células estão aderindo ao tecido, já que se trata de uma molécula relacionada a adesão celular. O PCNA positivo nas células em todos os

animais, mostra que as células estão em proliferação no tecido. A marcação de TGF β 1 foi positiva nas células presentes nos animais 1, 2 e 3, porém não apresentou marcação expressiva nas células presentes no músculo do animal 4 (**Figura 15**). As células que apresentaram marcação positiva para TGF β 1 podem estar se diferenciando no tecido. A marcação de vimentina foi positiva para todos os animais, possibilitando a visualização da morfologia celular. A marcação para CD90 foi positiva células presentes em todos os animais.

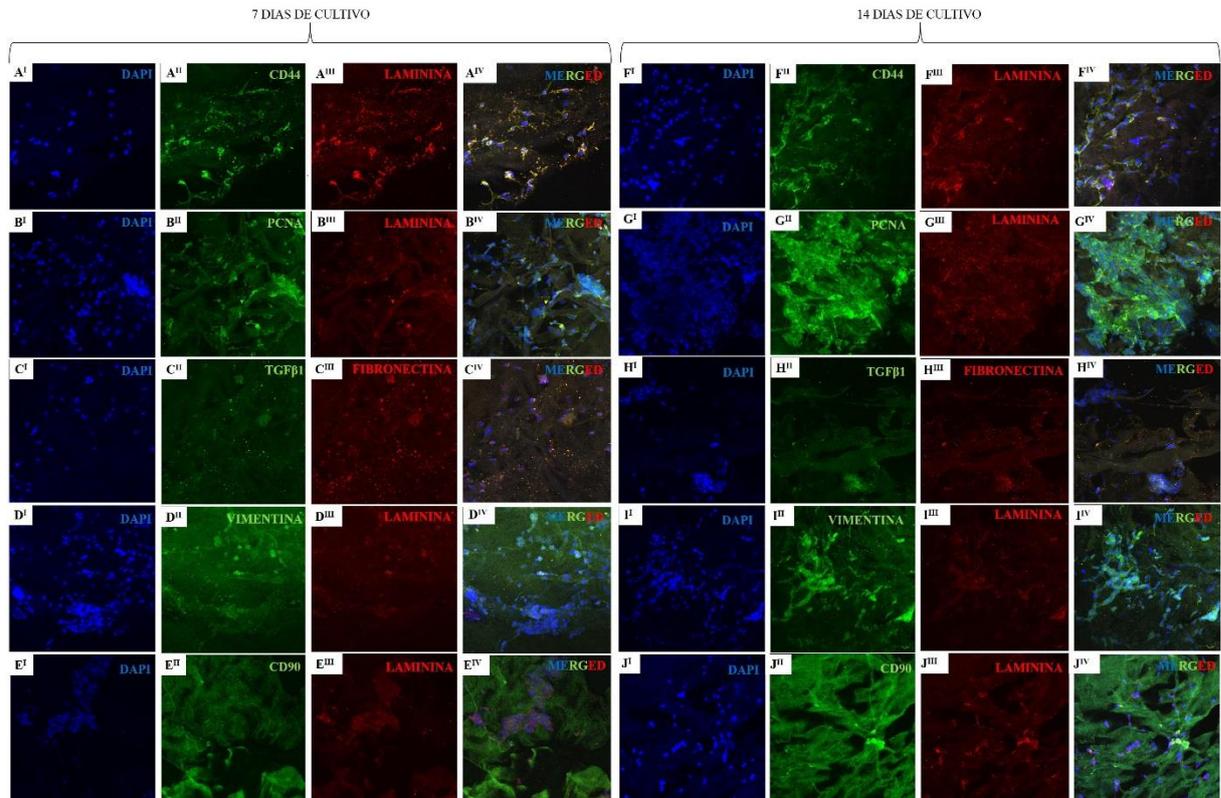
Figura 12. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 1** com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), TGF β 1 (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e CD90 (**E^{II}** e **J^{II}**).

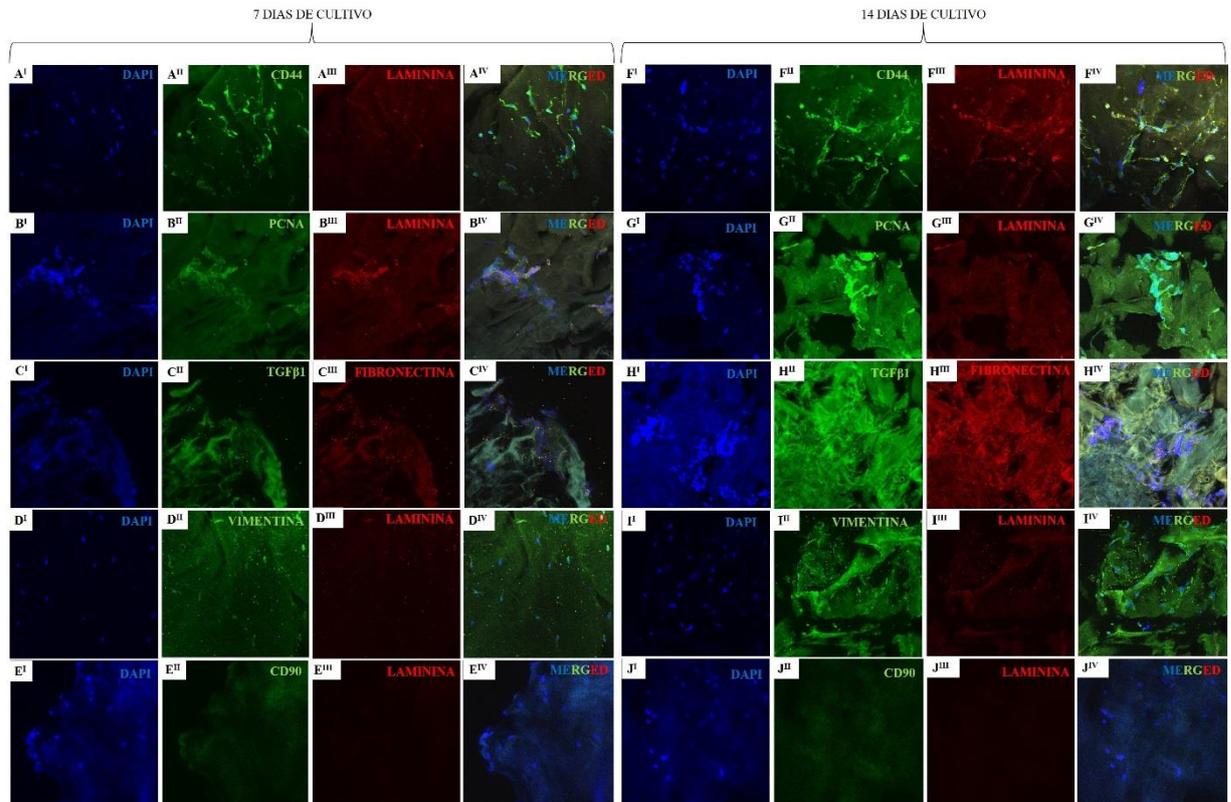
Figura 13. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 2** com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), TGFβ1 (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e CD90 (**E^{II}** e **J^{II}**).

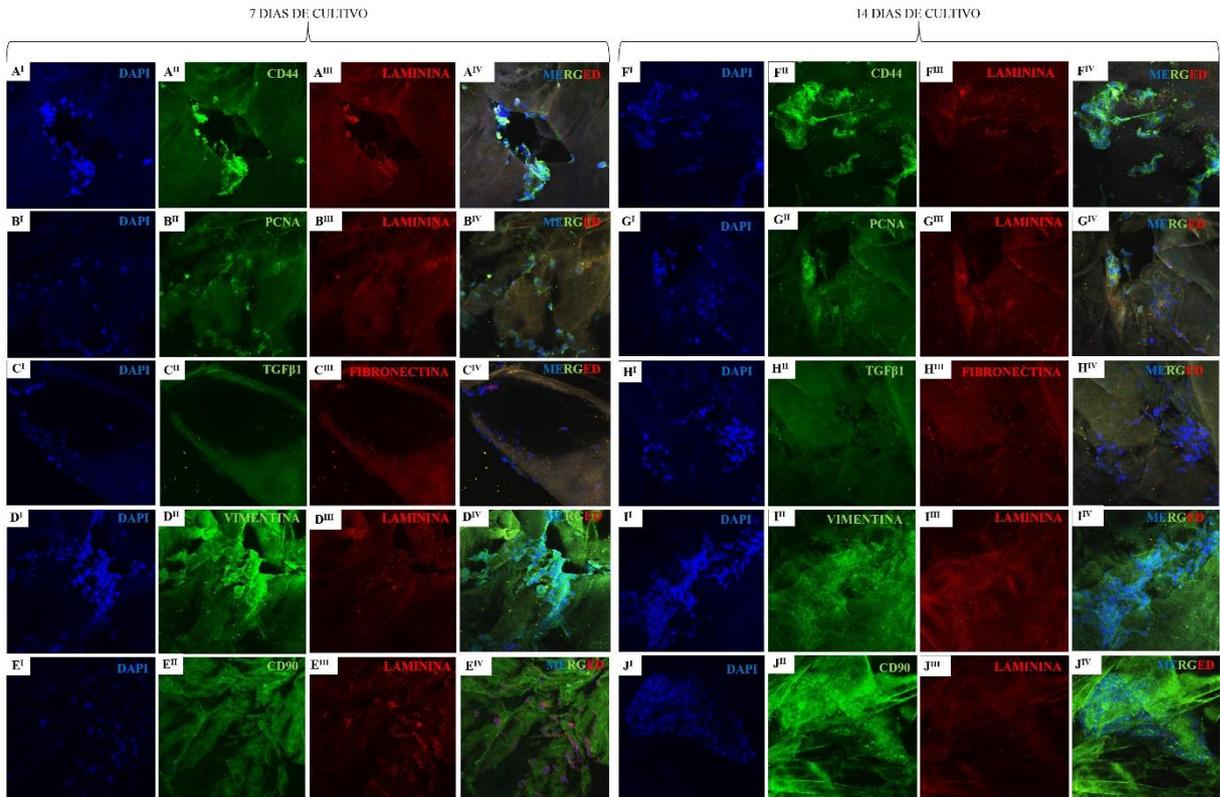
Figura 14. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 3** com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), TGFβ1 (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e CD90 (**E^{II}** e **J^{II}**).

Figura 15. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 4** com células fibroblásticas de linhagem 3T3 por 7 dias (A^I-E^{IV}) e 14 dias (F^I-J^{IV}).

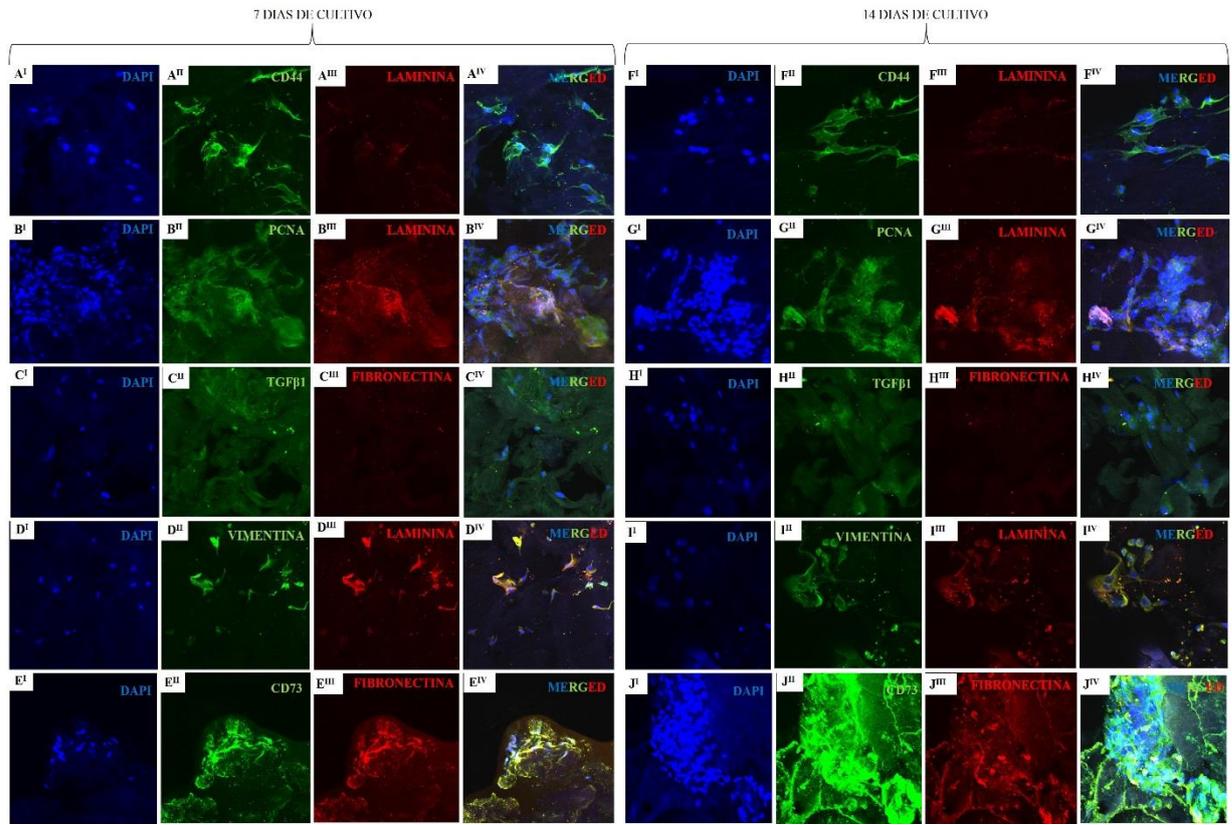


Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (A^{II} e F^{II}), PCNA (B^{II} e G^{II}), TGFβ1 (C^{II} e H^{II}), vimentina (D^{II} e I^{II}) e CD90 (E^{II} e J^{II}), porém não houve marcação de TGFβ1 (C^{II} e H^{II}).

Para marcação de células tronco mesenquimais de gordura nos tecidos recelularizados, foram utilizados os anticorpos para CD44, PCNA, TGFβ1, vimentina e CD73. Na recelularização de fragmentos musculares dos animais 1, 2, 3 e 4 com células tronco mesenquimais de gordura (Fig.16; Fig.17; Fig.18; Fig.19) todos apresentaram marcação positiva para laminina na MEC. O número de células nos fragmentos com 14 dias de recelularização aparenta ser maior. O anticorpo para CD44 apresentou marcação positiva nas células dos 4 animais, evidenciando a adesão de células ao tecido. A marcação do anticorpo PCNA também se apresentou positiva em todos os animais, mostrando a proliferação das células presentes no tecido. O TGFβ1 foi positivo em todos os animais, porém nas células presentes no animal 1 a expressão parece ser menor (Figura 16). A vimentina permite a visualização da morfologia celular, enquanto positiva em todos os animais. CD73, sendo um marcado específico de células tronco mesenquimais de gordura, apresentou marcação positiva em todas as células dos 4 animais.

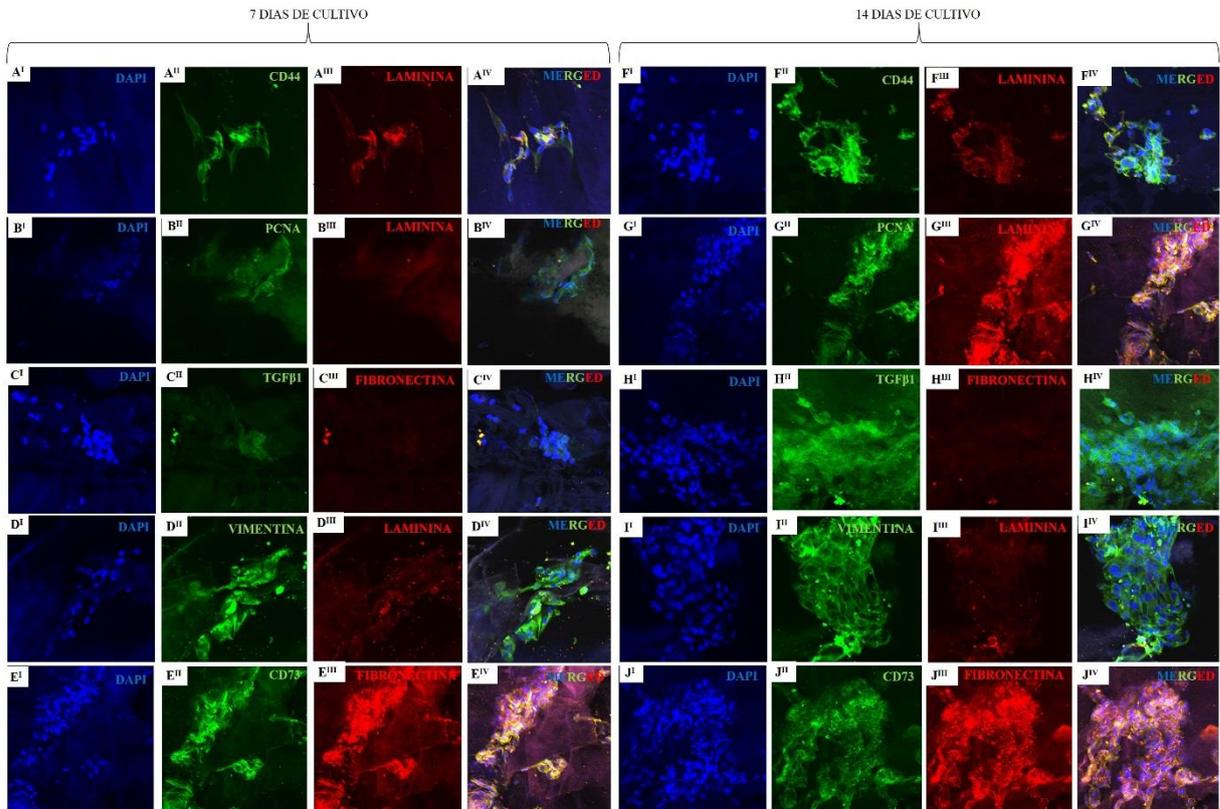
Figura 16. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 1** com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (A^I-E^{IV}) e 14 dias (F^I-J^{IV}).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (A^{II} e F^{II}), PCNA (B^{II} e G^{II}), TGFβ1 (C^{II} e H^{II}), vimentina (D^{II} e I^{II}) e CD73 (E^{II} e J^{II}).

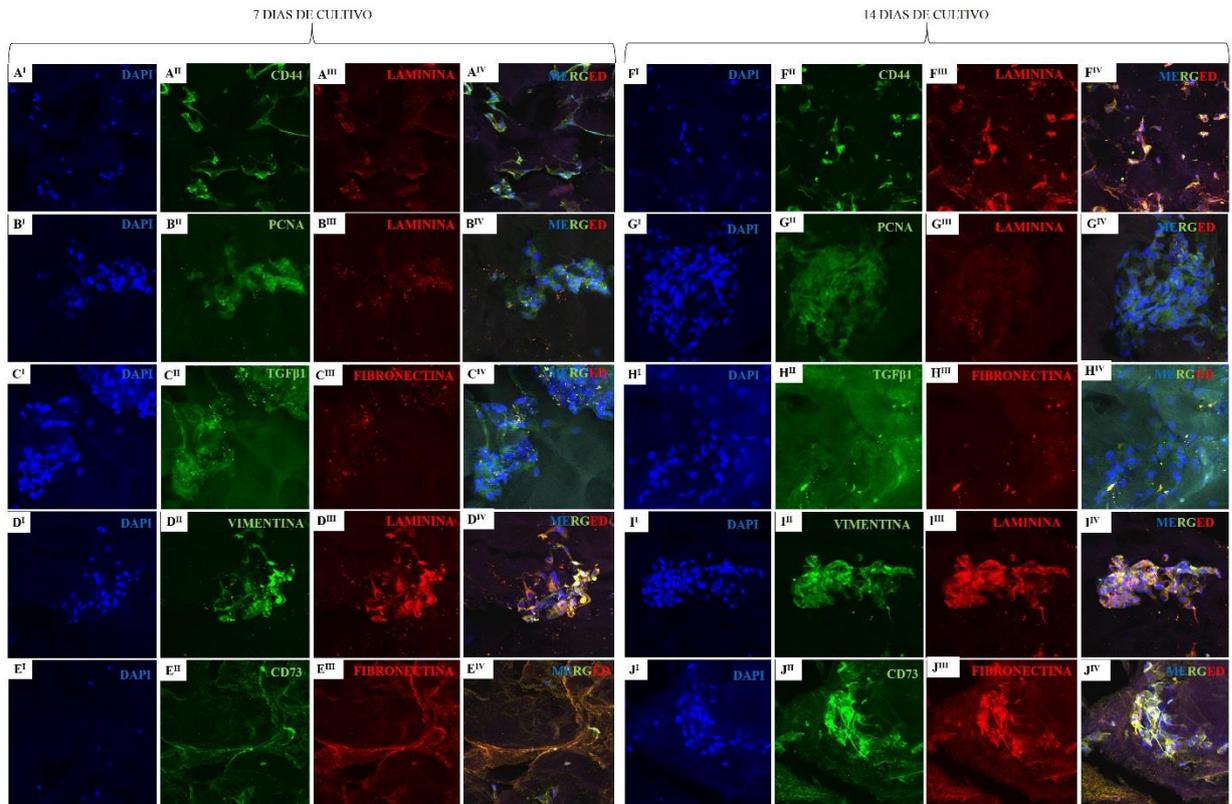
Figura 17. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 2** com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), TGFβ1 (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e CD73 (**E^{II}** e **J^{II}**).

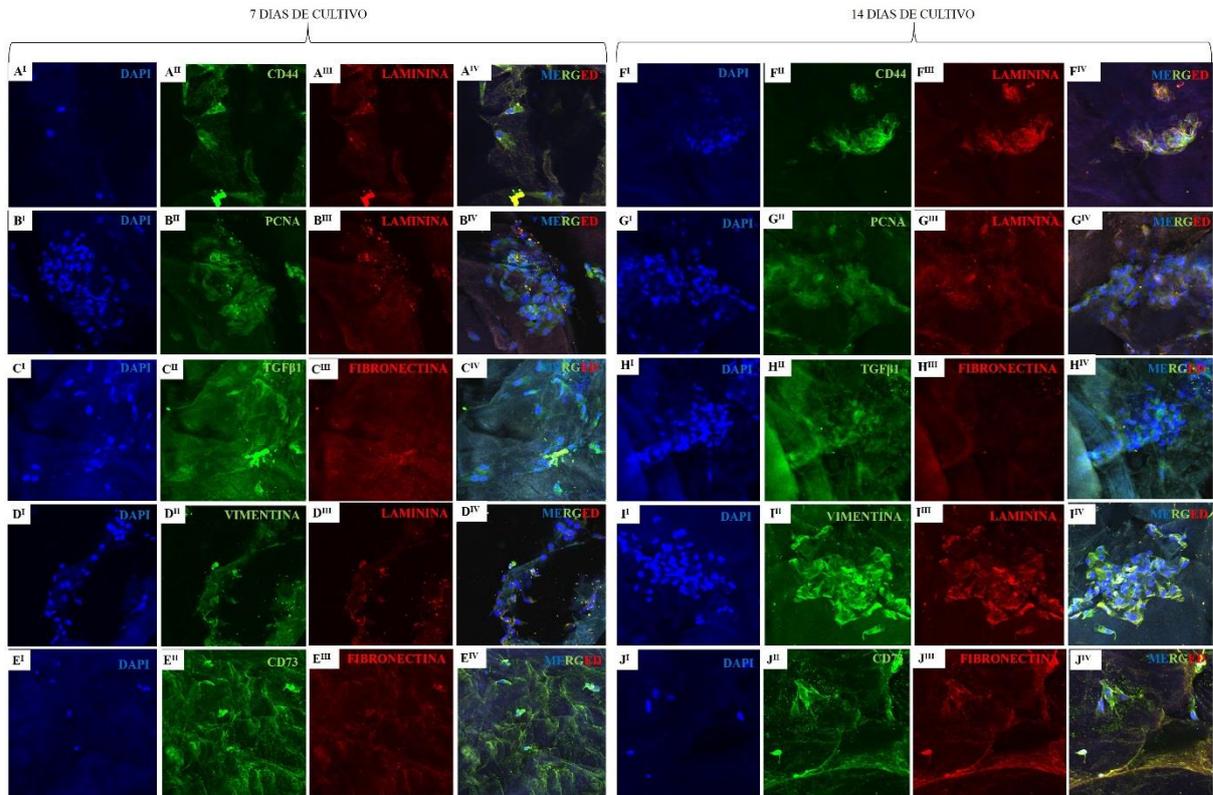
Figura 18. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 3** com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), TGFβ1 (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e CD73 (**E^{II}** e **J^{II}**).

Figura 19. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 4** com células tronco mesenquimais de gordura por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



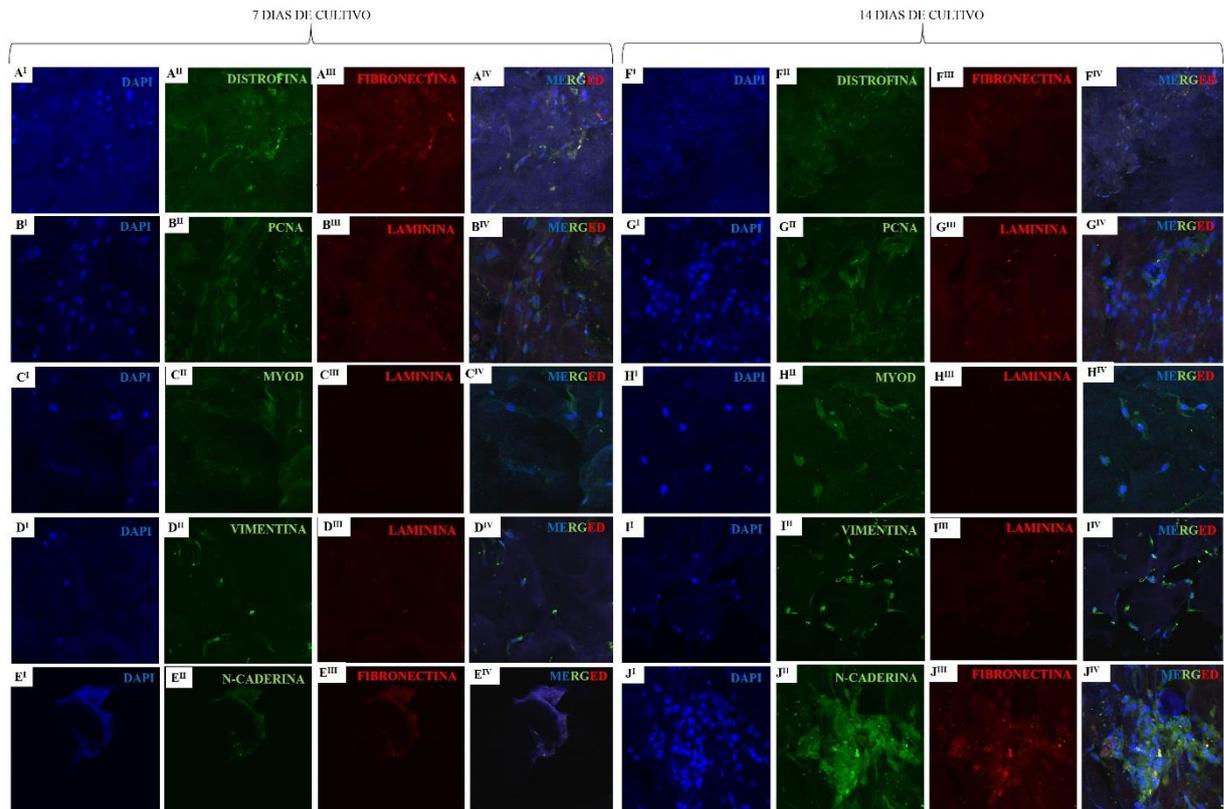
Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos CD44 (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), TGFβ1 (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e CD73 (**E^{II}** e **J^{II}**).

Para marcação de células musculares distróficas e não distróficas nos tecidos recelularizados (**Fig.20; Fig.21; Fig.22; Fig.23; Fig.24; Fig.25; Fig.26; Fig.27**), foram utilizados os anticorpos para distrofina, PCNA, MyoD, n-caderina e vimentina. Tanto em recelularizações com células musculares distróficas quanto em recelularizações com células musculares não distróficas, o número de células nas recelularizações de 14 dias aparenta ser maior. Células não distróficas apresentaram marcação positiva para distrofina em todos os tecidos (**animais 1, 2, 3 e 4**). Células musculares distróficas apresentaram baixíssima expressão quando em contato com músculos dos animais 1 e 2 (**Fig. 24 – A^{II} e F^{II}**; **Fig. 25 – A^{II} e F^{II}**), porém a distrofina foi expressa nessas células quando em contato com músculos dos animais 3 e 4 (**Fig. 26 - A^{II} e F^{II}**; **Fig. 27 – A^{II} e F^{II}**). O anticorpo para PCNA apresentou expressão positiva em células musculares distróficas e em células musculares não distróficas, revelando a proliferação dessas células. O MyoD também foi expresso em todas as células, distróficas e não distróficas. O anticorpo vimentina foi positivo para células distróficas e não distróficas, possibilitando a visualização de sua morfologia na MEC. A marcação de n-caderina foi positiva

em todos os animais, porém a expressão parece baixa no animal 1 recelularizado com células musculares não distróficas de 7 dias (**Figura 20 – E^{II}**) e no animal 3 recelularizado com células musculares distróficas de 7 dias (**Figura 26 - E^{II}**).

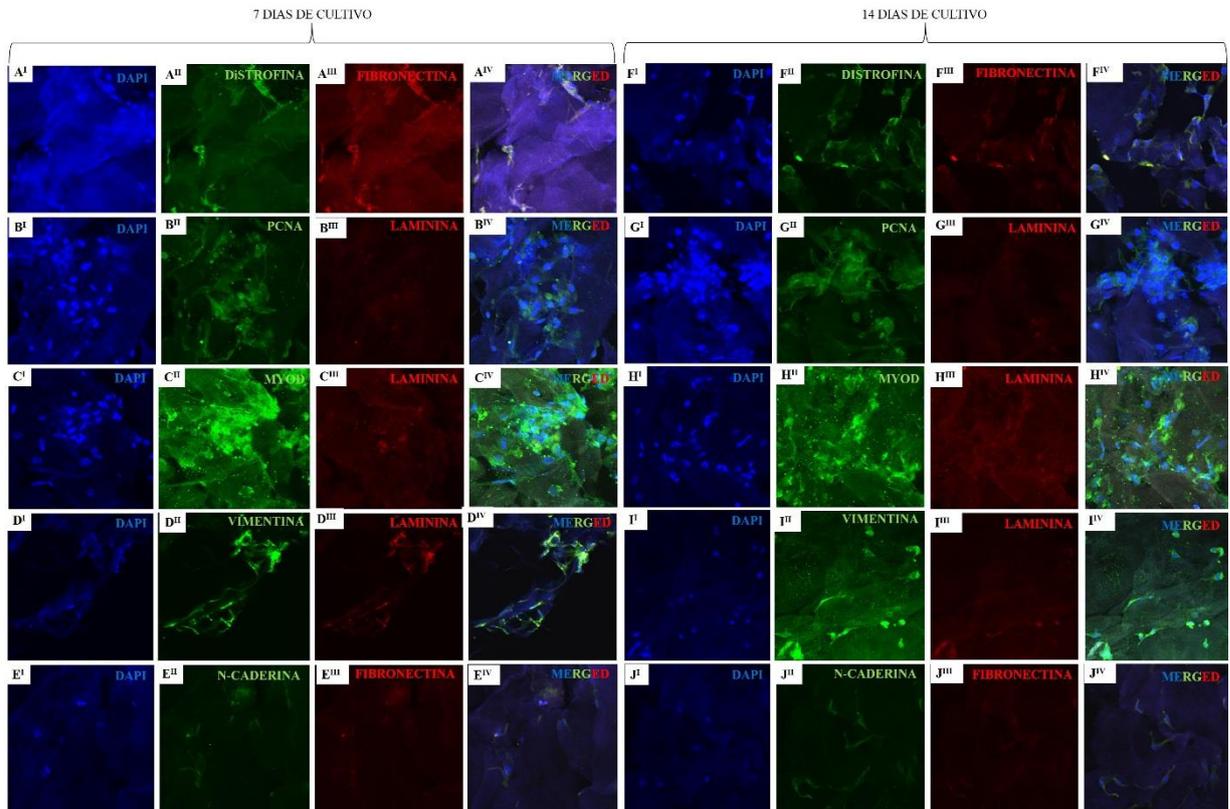
Figura 20. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 1** com células musculares não distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I- J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

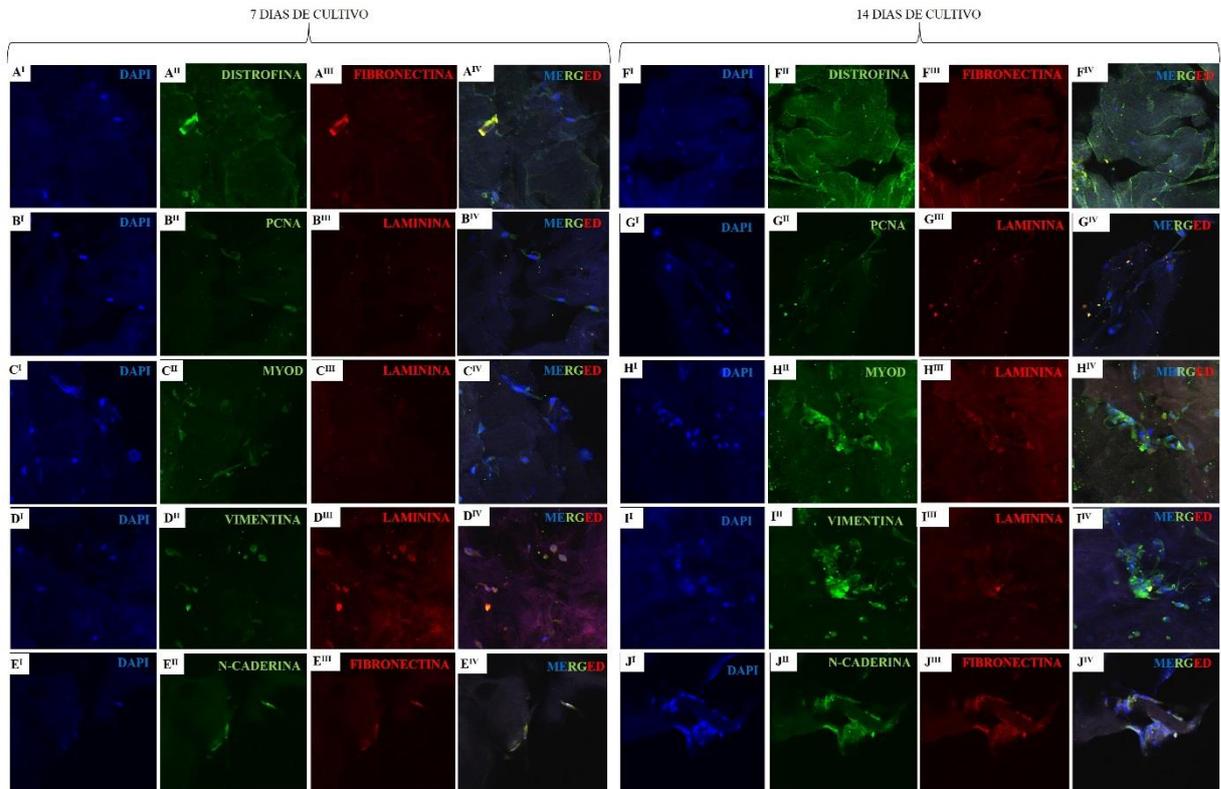
Figura 21. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 2** com células musculares não distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

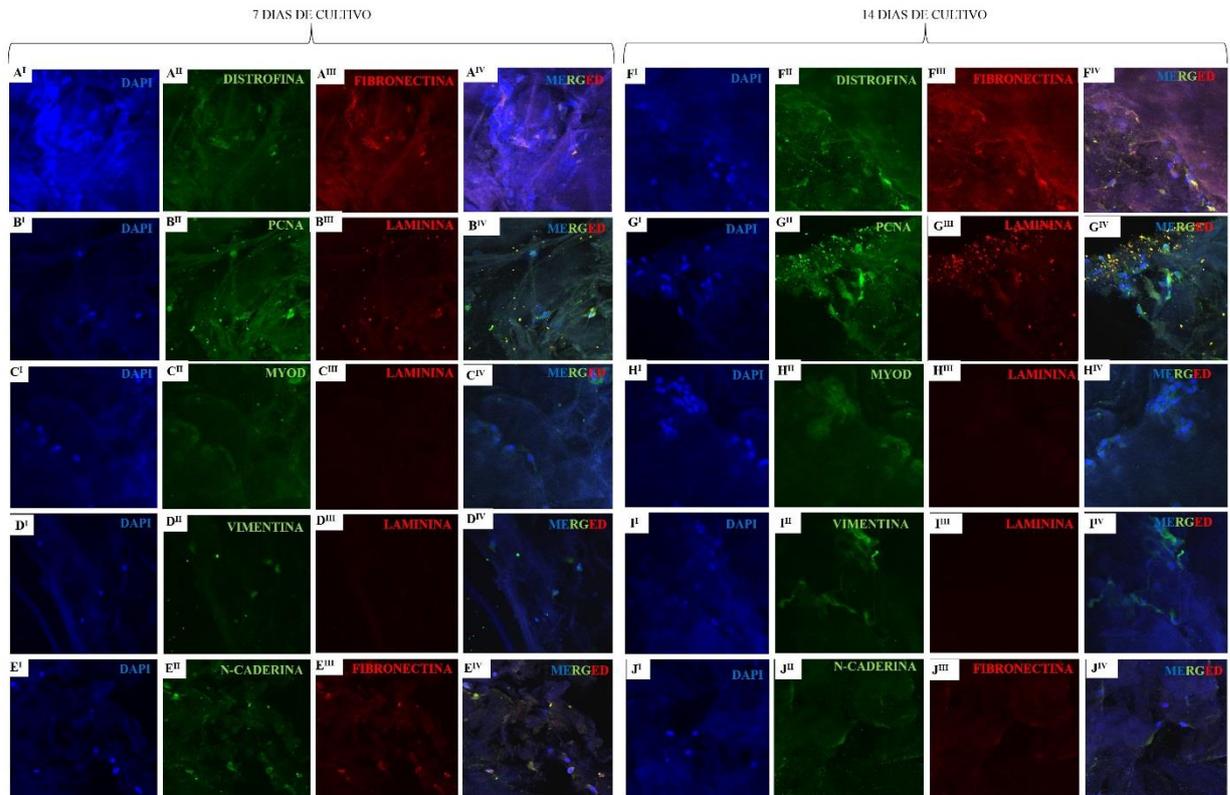
Figura 22. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 3** com células musculares não distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

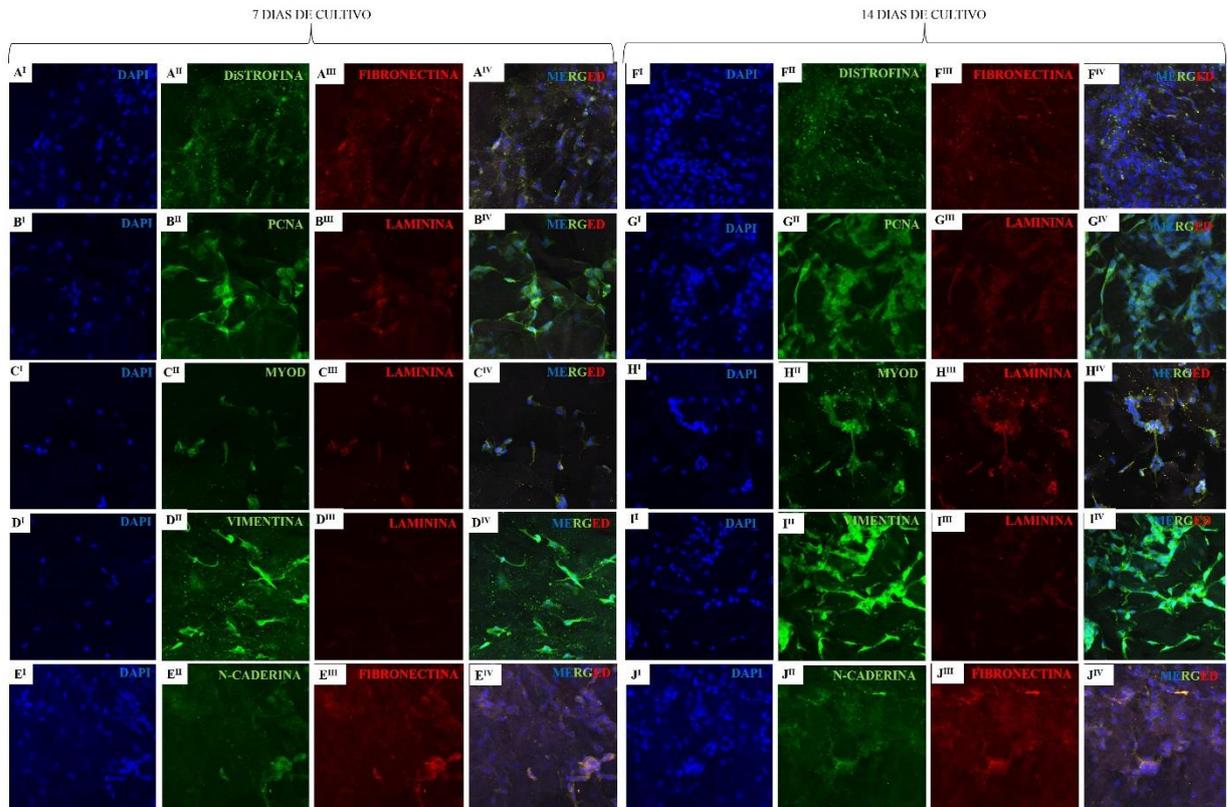
Figura 23. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 4** com células musculares não distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

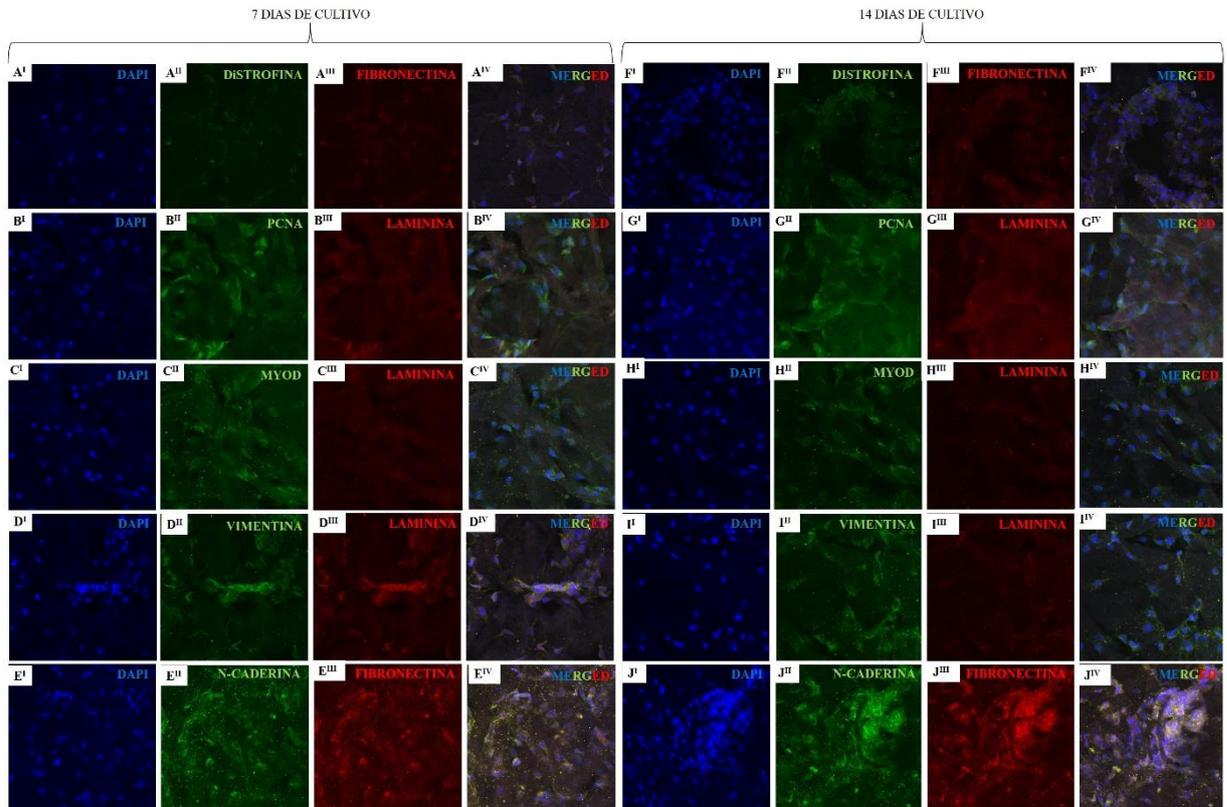
Figura 24. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 1** com células musculares distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

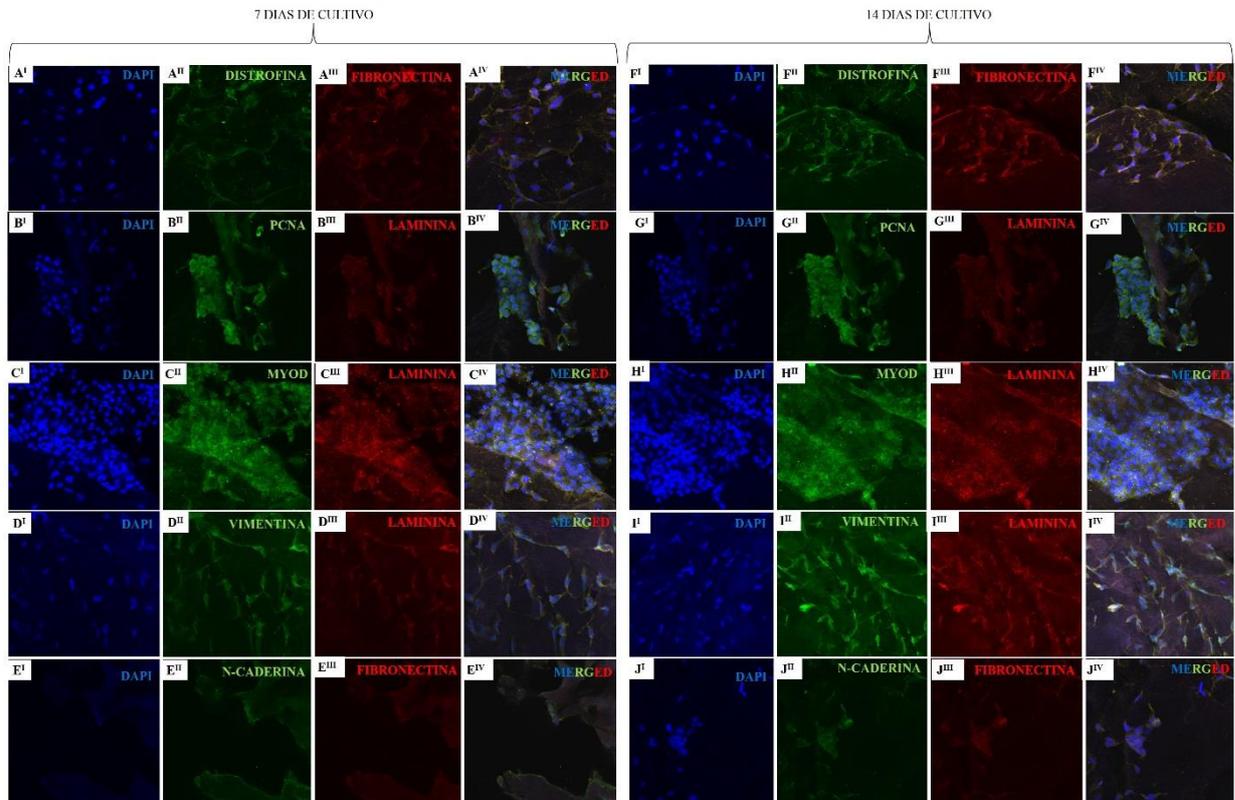
Figura 25. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 2** com células musculares distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

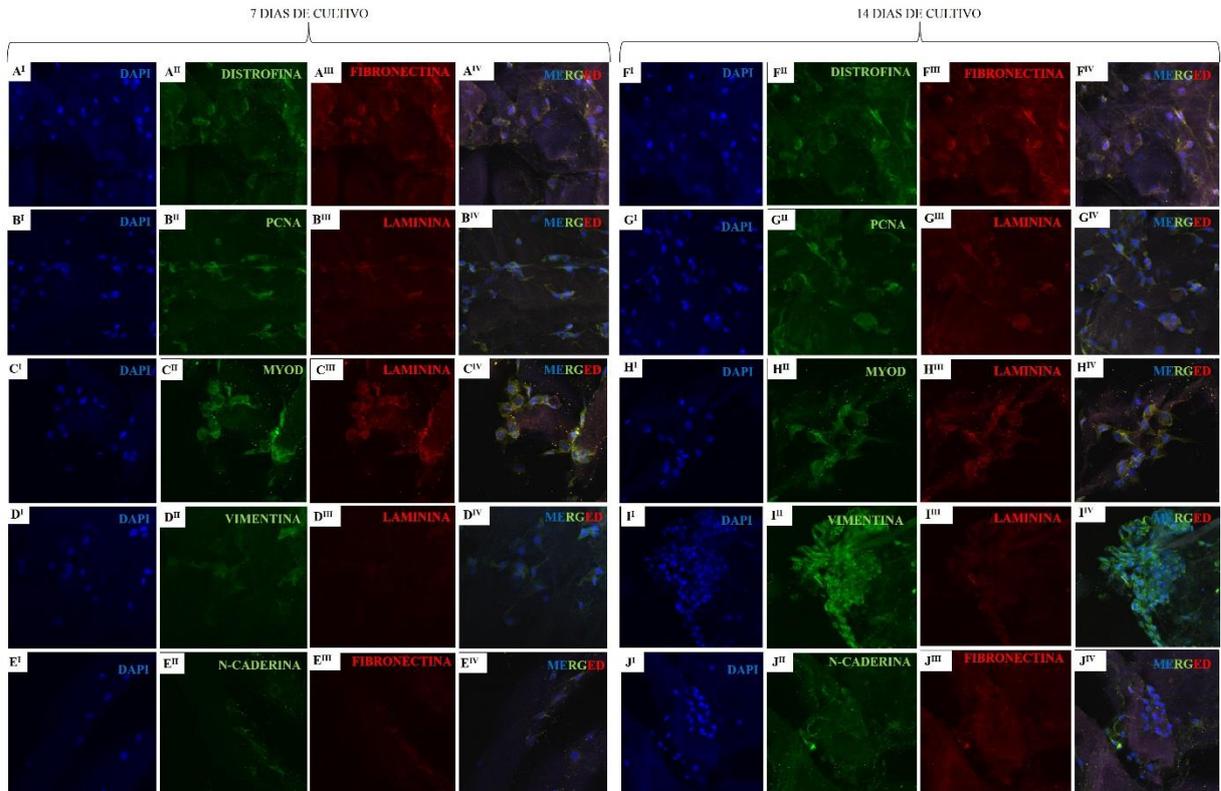
Figura 26. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 3** com células musculares distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

Figura 27. Imunofluorescência da recelularização de *scaffolds* do **Animal 4** com células musculares distróficas por 7 dias (**A^I-E^{IV}**) e 14 dias (**F^I-J^{IV}**).



Fonte: BATISTA (2021)

Legenda: Células apresentaram marcação positiva para os anticorpos distrofina (**A^{II}** e **F^{II}**), PCNA (**B^{II}** e **G^{II}**), MyoD (**C^{II}** e **H^{II}**), vimentina (**D^{II}** e **I^{II}**) e n-caderina (**E^{II}** e **J^{II}**).

Comparando todas as células utilizadas, as células musculares não distróficas aparentaram apresentar menor quantidade de células nos músculos no geral, semelhante ao observado nas mesmas células em cultivo, já que em cultivo as células musculares não distróficas apresentam crescimento na população mais demorado do que as outras células utilizadas. Em contrapartida, células tronco mesenquimais e células musculares distróficas foram as que aparentaram apresentar maior quantidade de células nos tecidos recelularizados.

4.4.DISCUSSÃO

Na literatura é possível encontrar trabalhos que abordam o papel e os componentes da MEC distrófica (M ROIG , A FARGAS, M GRATACÓS, 1998); (FUKUSHIMA et al., 2007); (SCHESSL; ZOU; BÖNNEMANN, 2006), porém não são encontrados trabalhos utilizando MEC distróficas descelularizadas. A utilização de matrizes descelularizadas permite a implantação de novas células (recelularização) ao tecido possibilitando a análise da interação da MEC com as células.

A escolha de células para a recelularização é de suma importância (BILODEAU et al., 2019). Foram utilizadas para recelularização de músculos distróficos e não distróficos células tronco mesenquimais de gordura, fibroblastos de linhagem 3T3, células musculares distróficas e células musculares não distróficas.

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes, ou seja, somente se diferenciação em alguns tipos celulares (ALMALKI; AGRAWAL, 2016). As CTMs podem ser derivadas de diversos tecidos, porém as derivadas de medula óssea e tecido adiposo, como utilizada neste trabalho, são as mais empregadas (ZHOU et al., 2019). Por sua multipotência, estas células tem a capacidade de se diferenciar em células da linhagem mesodermal (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008), como osteócitos, condrócitos, adipócitos e miócitos (ALMALKI; AGRAWAL, 2016). Na imunocitoquímica realizada neste trabalho, para caracterização de células tronco mesenquimais de gordura foram utilizados os anticorpos para CD73, CD90 e CD105, pois de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) estes marcadores são utilizados como marcadores específicos de células tronco mesenquimais (JUNQUEIRA; CARLO, 2009). O anticorpo para vimentina marcou estes filamentos intermediários, normalmente presentes em células tronco mesenquimais normais mantendo a integridade celular e protegendo contra *stress* mecânico (SATELLI; LI, 2011), mas na imunocitoquímica também permite a visualização da morfologia celular, como foi observado nos resultados. O anticorpo de faloidina, toxina derivada do fungo *Amanita phalloides*, é capaz de marcar a F-actina no citoesqueleto celular (CHAZOTTE; CHAZOTTE, 2014), permitindo também a visualização da morfologia da CTM. O anticorpo PCNA permitiu a constatação de que as CTM estavam em proliferação através da imunocitoquímica, pois o PCNA é expresso em células que estão em proliferação, já que se trata de uma proteína auxiliar da DNA polimerase, estando envolvida nos processos de replicação (ABCAM, 2021a).

Os fibroblastos são células de origem mesenquimal que tem como principal função a produção de componentes da MEC do tecido conjuntivo (NEILSON, 2020). Neste trabalho foram utilizados os fibroblastos de de linhagem 3T3. Para sua caracterização na imunocitoquímica foram utilizados os anticorpos para CD90, que corresponde a uma molécula de adesão celular encontrada principalmente em células tronco, porém também pode ser encontrada em fibroblastos (BOSSIE; BOYD, 2009). O anticorpo para CD105, marcador também de CTMs apresenta marcação positiva em fibroblastos. Muitas vezes fibroblastos são chamado CTMs por apresentarem semelhanças fenotípicas com CTMs, porém são muito diferentes no seu potencial de diferenciação e de formação de colônias (ALT et al., 2011). O anticorpo para faloidina permitiu a observação da morfologia celular. A vimentina, além de evidenciar a morfologia celular possui importante papel nas mudanças na organização e montagem do citoesqueleto em fibroblastos (SLIOGERYTE; GAVARA, 2019). O anticorpo para β -tubulina, um dos componentes dos microtúbulos, apresentou marcação positiva, já que a mesma é expressa em fibroblastos (JOUHILAHTI; PELTONEN; PELTONEN, 2008).

Para marcação das células musculares distróficas e não distróficas foram utilizados os anticorpos distrofina, que é a proteína alvo nas distrofias musculares (CARTER et al., 2018), apresentando marcação positiva em células musculares não distróficas e baixa expressão em células musculares distróficas. O anticorpo para desmina apresentou expressão positiva em células musculares distróficas e não distróficas. A desmina possui a função de ligar todo o aparelho contrátil ao sarcolema e a outras organelas, como o núcleo, mitocôndrias, lisossomos e, potencialmente, o retículo sarcoplasmático (HENDERSON et al., 2017) e é encontrada em todas as células musculares esqueléticas. O MyoD (gene determinante miogênico) é um fator de transcrição que pertence a uma grande família de fatores reguladores da miogênese (MRFs), que juntos controlam a determinação e diferenciação de todas as células musculares. No desenvolvimento embrionário as expressões de MyoD diminuem após o nascimento, porém não param completamente sua expressão pode aumentar caso seja necessária a regeneração muscular (WARDLE, 2019). O MyoD apresentou expressão semelhante em células distróficas e não distróficas. As caderinas são proteínas de adesão celular cálcio dependentes, dentre elas a n-caderina (ABCAM, 2021b), utilizada neste trabalho para caracterização de células musculares distróficas e não distróficas. Esta proteína de adesão celular é expressa em células musculares esqueléticas em desenvolvimento ou maduras (SOARES, 2009), por isso sua expressão positiva nas células musculares utilizadas. A faloidina evidenciou os filamentos de actina nas células musculares, principalmente células musculares não distróficas. Para complementação dos resultados obtidos na imunocitoquímica, foi realizada a citometria de

fluxo das células. Os anticorpos utilizados foram os mesmos da imunocitoquímica, apresentando marcação semelhante a observada na imunocitoquímica, exceto pelo anticorpo de faloidina, que por citometria de fluxo apresentou marcação baixa ou nula nas células analisadas, podendo ser causada por alguma particularidade do anticorpo. Diferente dos anticorpos utilizados na imunocitoquímica, na citometria de fluxo também foi utilizado o anticorpo para fator de crescimento vaso endotelial (VEGF) nas células musculares distróficas e não distróficas. O VEGF pode influenciar na diferenciação, migração e modulação celular (FRATINI et al., 2016) e esta família de glicoproteínas possui papel importante na estrutura e função do músculo esquelético, sendo expressa também em células musculares (CANNON, DANIEL T, LUKAS RODEWOHL; BREEN; BOWEN, 2019), como apresentado nas células musculares utilizadas neste trabalho.

Após a caracterização das células para utilização na recelularização de músculos distróficos e não distróficos os *scaffolds* musculares passara por esterilização para início do cultivo celular. O protocolo utilizado para esterilização (FRATINI P, RIGOGGIO NN, MATIAS GSS; RICI REG, 2018) se apresentou eficiente, já que não houve contaminação nos cultivos de recelularização nem de 7 e nem de 14 dias, além de que o teste de PCR para detecção de Micoplasma (UEMORI et al., 1992) e a avaliação microbiológica dos meios de cultivo utilizados na recelularização apresentaram resultados negativos para todas as espécies (Micoplasma) avaliadas e para o crescimento de microrganismos em meio líquido e ágar.

Junto a recelularização foi possível executar o teste de proliferação celular por resazurina, que é um indicador da capacidade metabólica celular que tem sido utilizado desde o final dos anos 1920 para estimar a infestação bacteriana do leite. Desde então, este corante redox é usado como um indicador do metabolismo ativo em culturas de células (COLORIMETRIC et al., 2017). A resazurina é considerada um corante de baixa toxicidade que quando metabolizada por células viáveis é reduzida a resorufina, mudando sua coloração. Esta correlação entre a redução da resazurina e a quantidade de células viáveis é comumente utilizada para avaliar o crescimento ativo de células. Recentemente, os testes de resazurina começaram a ser utilizados como ensaios para monitorar a proliferação celular nos *scaffolds* durante o processo de recelularização (GONG et al., 2020). Nos testes feitos com CTMg, fibroblastos 3T3, células musculares distróficas e não distróficas em cultivo com músculos descelularizados (animais 1, 2, 3 e 4), foi possível observar que as células cultivadas sem a presença dos músculos descelularizados apresentaram taxa de proliferação menor que as células cultivadas em contato com o *scaffold* muscular, mostrando que o contato célula-matriz estimulou a proliferação destas células. A partir dos valores obtidos nos gráficos de resazurina, foi possível observar que os

quatro tipos celulares mantiveram sua viabilidade ao longo do processo de recelularização nos 4 tipos de *scaffolds* musculares, mostrando que sendo um músculo distrófico ou não, não há diminuição da viabilidade celular. Quanto a proliferação de células, o *scaffold* muscular do animal 3 se mostrou um pouco melhor para proliferação de células, exceto para célula de músculo distrófico, porém os *scaffolds* de animais distróficos (animais 1 e 2) apresentaram boa proliferação para células musculares e células musculares distróficas, mostrando que possivelmente a condição de distrófico não seja determinante na proliferação celular no *scaffold*.

Após as recelularizações de 7 e 14 dias, o material foi separado para quantificação de DNA genômico, para Microscopia Eletrônica de Varredura e Imunofluorescência.

Por MEV foi possível observar uma camada de células recobrando o tecido nos 4 animais, com todos os 4 tipos celulares, mostrando que houve adesão de células ao tecido. Este resultado foi reforçado pela quantificação de DNA de amostras recelularizadas. . Estudos semelhantes com descelularização e recelularização de *scaffolds* já foram realizados por nosso grupo também com resultados satisfatórios (FRATINI P, RIGOGGIO NN, MATIAS GSS; RICI REG, 2018).

A partir da quantificação de DNA, conseguimos mostrar aumento na quantidade de DNA presente nos tecidos, mostrando que os tecidos recelularizados possuem células. Dentro todas as células utilizadas, as células tronco mesenquimais de gordura, de forma geral, apresentaram maior quantidade de células após a recelularização. Em alguns animais houve diminuição da quantidade de células nas recelularizações de 14 dias, dentre elas as células de músculo distrófico no *scaffold* do animal 3 (não distrófico). Em se tratando de um animal não distrófico, pode-se sugerir que a adesão de células a MEC não necessariamente será melhor em músculos não distróficos. Apesar de todas as células terem apresentado presença de células após a recelularização, somente os animais 2, 3 e 4 apresentaram quantidade de DNA maior do que o valor apresentado no momento 0 (DNAg só do *scaffold*) para todas as células. Em uma comparação entre os 4 *scaffolds* musculares, o músculo do animal 1 apresentou os melhores resultados de quantidade de DNA para todas as células.

Pela imunofluorescência, os 4 tipos celulares em 7 e 14 dias de cultivo apresentaram marcação positiva de PCNA tanto em músculos distróficos quanto não distróficos, mostrando sua capacidade de proliferação em ambos. Para marcação da diferenciação de fibroblastos 3T3 e de CTMg foi utilizado o anticorpo para TGF β 1. A expressão de TGF β 1 foi positiva nos animais 1, 2 e 3 com fibroblastos 3T3 em 7 e 14 dias de cultivo, porém no animal 4 não houve expressão. Em CTMg a expressão foi positiva nos 4 animais em 7 e 14 dias de cultivo. Estes

resultados sugerem que a diferenciação de células pode ocorrer também na MEC distrófica. Para marcação da adesão celular, foi utilizado o anticorpo para CD44. Sua expressão foi positiva em todas as CTMg e fibroblastos 3T3 em 7 e 14 dias de cultivo nos 4 animais, mostrando que o músculo distrófico também permite a adesão de células ao tecido. Nas células musculares distróficas e não distróficas a expressão de distrofina foi positiva em todas as células musculares não distróficas nos 4 animais, como já era esperado, levando em conta que a expressão foi positiva nestas células por imunocitoquímica. Em células musculares distróficas a expressão de distrofina foi positiva em células cultivadas nos animais 3 e 4 (não distróficos), demonstrando que de alguma forma estas matrizes estimularam produção de distrofina em células distróficas. Mais estudos precisam ser realizados para validar esta estimulação de produção de distrofina por células distróficas.

4.5.CONCLUSÕES

Apesar de serem derivadas de animais portadores de distrofia muscular, as MEC distróficas não apresentaram grande diferença significativas no potencial de adesão e diferenciação de células. Apesar de não apresentarem diferença na adesão e na diferenciação, somente em contato com MEC não distróficas, as células musculares distróficas foram aparentemente estimuladas a expressar distrofina. Este resultado necessita de outras análises para sua confirmação. Dentre todas as células utilizadas, a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que as células tronco mesenquimais de gordura apresentaram melhor potencial de adesão e diferenciação, tanto em *scaffolds* musculares distróficos quanto não distróficos.

REFERÊNCIAS

- ABCAM. **Anti-PCNA antibody [PC10]**. Disponível em: <<https://www.abcam.com/pcna-antibody-pc10-ab29.html>>. Acesso em: 14 jan. 2021a.
- ABCAM. **Recombinant Anti-N Cadherin antibody**. Disponível em: <<https://www.abcam.com/n-cadherin-antibody-epr1791-4-ab76011.html>>. Acesso em: 14 jan. 2021b.
- ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. **Differentiation**, v. 92, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>>.
- ALT, E. et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells , but lack their differentiation and colony-forming potential. **Biol. Cell**, v. 103, p. 197–208, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21332447/>>.
- BILODEAU, C. et al. Limitations of recellularized biological scaffolds for human transplantation. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 0–3, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31826325>>.
- BOSSIE, A.; BOYD, Æ. A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. **Cytotechnology**, v. 59, p. 31–44, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2677147/#:~:text=CD90 functions in inflammation and,mediators of the immune response.>>.
- CANNON, DANIEL T, LUKAS RODEWOHL, V. A.; BREEN, E. C.; BOWEN, T. S. Skeletal myofiber VEGF deficiency leads to mitochondrial , structural , and contractile alterations in mouse diaphragm. **Journal of applied physiology**, v. 127, n. 5, p. 1360–1369, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31487223/>>.
- CARTER, J. C. et al. Muscular Dystrophies. **Clinics in Chest Medicine**, v. 39, n. 2, p. 377–389, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.01.004>>.
- CHAZOTTE, B.; CHAZOTTE, B. Labeling Cytoskeletal F-Actin with Rhodamine Phalloidin or Fluorescein Phalloidin for Imaging Labeling Cytoskeletal F-Actin with Rhodamine Phalloidin or Fluorescein Phalloidin for Imaging. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 5, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637948/>>.
- COLORIMETRIC, B. et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. **Methods in Molecular Biology**, v. 1601, p. 1–17, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28470513/>>.
- DIAS, C. M. et al. Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy . Part 2 : rehabilitation and systemic care. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 76, n. 7, p. 481–489, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30066800/>>.
- EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **THE LANCET**, v. 359, p. 687–695, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11879882/>>.
- FRATINI P, RIGOGGIO NN, MATIAS GSS, C. A.; RICI REG, M. M. Canine Placenta Recellularized Using Yolk Sac Cells with Vascular Endothelial Growth Factor. **BioResearch**, v. 7, n. 1, p. 101–106, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30065855/>>.
- FRATINI, P. et al. Endothelial differentiation of canine yolk sac cells transduced with VEGF. **Research in Veterinary Science**, 2016.

- FUKUSHIMA, K. et al. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMD J). **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 11, p. 1–11, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17598883/>>.
- GONG, X. et al. A resazurin-based , nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold- based 3D culture process. **Regenerative Biomaterials**, v. 7, n. 3, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32523729/>>.
- HENDERSON, C. A. et al. Overview of the Muscle Cytoskeleton. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. July, p. 891–944, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890934/>>.
- JAFARI, M. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 2, p. 431–459, 2017.
- JOUHILAHTI, E.; PELTONEN, S.; PELTONEN, J. Class III b -Tubulin Is a Component of the Mitotic Spindle in Multiple Cell Types The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 56, n. 12, p. 1113–1119, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583904/>>.
- JUNQUEIRA, R.; CARLO, D. Mesenchymal Stem Cell. **Ciência Rural**, p. 1–8, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a409cr1878.pdf>>.
- KOGA, B. A. A. **Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes (PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele.** 2020. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2020.
- KORNEGAY, J. N. et al. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. **Mamm Genome**, v. 23, p. 85–108, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218699>>.
- KORNEGAY, J. N. **The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophySkeletal Muscle**, 2017. . Disponível em: <file:///C:/Users/airot/Downloads/kornegay 2017 grmd duchenne (1).pdf>.
- M ROIG , A FARGAS, M GRATACÓS, J. R. Role of the extracellular matrix in X-chromosome-linked muscular dystrophy: immunohistochemical study. **Revista de Neurologia**, v. 26, n. 154, p. 895–904, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9658456/>>.
- NEILSON, V. S. L. E. G. Origin and Functional Heterogeneity of Fibroblasts. **Federation of American Societies for Experimental Biology - FASEB**, v. 34, n. 3, p. 3519–3536, 2020. Disponível em: <<https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.201903188R>>.
- NOWAK, K. J.; DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **EMBO reports**, v. 5, n. 9, p. 872–876, 2004.
- SALMANINEJAD, A. et al. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): An updated review of common available therapies. **International Journal of Neuroscience**, v. 7454, n. Dmd, p. 1543–5245, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1430694>>.
- SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 5, p. 3033–3046, 2011. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637948/>>.

SCHESSEL, J.; ZOU, Y.; BÖNNEMANN, C. G. Congenital Muscular Dystrophies and the Extracellular Matrix. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 7, 2006. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/MED/17027857>>.

SLIOGERYTE, K.; GAVARA, N. Vimentin Plays a Crucial Role in Fibroblast Ageing by Regulating Biophysical Properties and Cell Migration. **Cells**, v. 8, p. 1164–1181, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31569795/>>.

SOARES, C. P. **Efeitos da retirada de colesterol membranar sobre cardiomiócitos crescidos in vitro**. 2009. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://periodicos.uniron.edu.br/files/arquivos_uniron/arquivo_5059.pdf>.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews, Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–736, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19172693/>>.

UEMORI, T. et al. Amplification of the 16S-23S Spacer Region in rRNA Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain Reaction. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 181–186, maio 1992.

WARDLE, F. C. Master control : transcriptional regulation of mammalian Myod. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, n. May, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09538-6>>.

ZHOU, W. et al. Single-Cell Profiles and Clinically Useful Properties of Human Mesenchymal Stem Cells of Adipose and Bone Marrow Origin. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 47, n. 7, p. 1722–1733, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31100005/>>.

5. CONCLUSÃO FINAL

As distrofias musculares são amplamente estudadas em diferentes aspectos, porém não são encontrados na literatura trabalhos que utilizam técnicas de bioengenharia de tecidos para estudar a MEC em casos de distrofias musculares.

Este trabalho utilizou músculos bíceps femorais caninos para obtenção de *scaffolds* descelularizados. O protocolo de descelularização de 25 dias em SDS a 1% apresentou bons resultados. As proteínas de matriz fibronectina, laminina e elastina foram preservadas após o processo de descelularização em músculos distróficos e não distróficos, apresentando expressão relativamente maior em MEC de músculos distróficos e núcleos celulares não são localizados através da técnica de fluorescência por DAPI em músculos descelularizados.

Após a descelularização é possível dar início ao processo de recelularização. Demonstramos que o processo de esterilização foi eficiente e que células cultivadas em contato com o *scaffold* apresentam maior taxa de proliferação.

Por meio das análises de imunofluorescência e Microscopia Eletrônica de Varredura, evidenciamos que as células utilizadas para o processo de recelularização, cultivadas por 7 e 14 dias, tiveram interação célula/matriz com a formação de camadas de células sobre o tecido em todos os animais utilizados. Com análises de quantificação de DNA após a recelularização a recelularização, células tronco mesenquimais de gordura apresentaram maior quantidade de células no tecido. Com o teste de resazurina foi possível concluir que o *scaffold* muscular do animal não distrófico jovem se mostrou um pouco melhor para proliferação celular.

Por fim, concluímos que os processos de descelularização e recelularização de *scaffolds* musculares distróficos e não distróficos foram eficazes evidenciando que a MEC distrófica não apresenta grande diferença na composição de suas proteínas fibrosas e que *scaffolds* musculares distróficos não influenciam negativamente na adesão e diferenciação celular.

6. REFERÊNCIAS

- ASGHARI, F. et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 185–192, 2017.
- BARRETO, R. S. N. et al. Mouse placental scaffolds : a three -dimensional environment model for recellularization. **Jornal of Tissue Engineering**, v. 10, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31448074>>.
- BILODEAU, C. et al. Limitations of recellularized biological scaffolds for human transplantation. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 0–3, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31826325>>.
- BIOARRAY, C. **3T3-Swiss Albino**. Disponível em: <<https://www.creative-bioarray.com/3T3-Swiss-Albino-3T3-CSC-C2039-item-1599.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- BUSHBY, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy , part 1 : diagnosis , and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 1, p. 77–93, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29395989/>>.
- CHAL, J.; POURQUIE, O. Making muscle : skeletal myogenesis in vivo and in vitro. **The Company of Biologists**, v. 144, p. 2104–2122, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28634270/>>.
- COSTA, A. et al. Biologic scaffolds. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1–24, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28320826/>>.
- CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>>.
- CSAPO, R.; GUMPENBERGER, M.; WESSNER, B. Skeletal muscle extracellular matrix - What do we know about its composition, regulation and physiological roles ? A narrative review. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 253, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32265741/>>.
- DUEWEKE, AWAN, M. Regeneration of skeletal muscle following eccentric injury. **Journal of Sport Rehabilitation**, v. 26, n. 2, p. 171–179, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27992284/>>.
- ECHEVERRY-MARÍN, P. C.; BUSTAMANTE-VEGA, Á. M. Anesthetic implications of muscular dystrophies. **Colombian Journal of Anesthesiology**, v. 46, n. 17, p. 228–239, 2018.
- FALZARANO, M. S. et al. Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18168–18184, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457695>>.
- FERRANCE, J. P. et al. Developments toward a complete micro-total analysis system for Duchenne muscular dystrophy diagnosis. In: Analytica Chimica Acta, **Anais...2003**. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0003267003011565/1-s2.0-S0003267003011565-main.pdf?_tid=d8496d80-3e77-4611-a090-874b9a0165ee&acdnat=1538586644_1fbd8a0aec1720da494a1e7a4ba27f28>.
- FRANÇOISE BARRÉ-SINOUSSE; MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to

biological research : issues and perspectives. **Future Science**, v. 1, n. 4, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5137861/>>.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle : A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, p. 183–195, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25294644/>>.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle & Nerve**, v. 44, n. 3, p. 318–331, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mus.22094>>.

HASLETT, J. N. et al. Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. Dmd, p. 15000–15005, 2002.

JAFARI, M. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 2, p. 431–459, 2017.

KORNEGAY, J. N. et al. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. **Mamm Genome**, v. 23, p. 85–108, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218699>>.

KORNEGAY, J. N. **The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophySkeletal Muscle**, 2017. . Disponível em: <file:///C:/Users/airot/Downloads/kornegay 2017 grmd duchenne (1).pdf>.

MCGREEVY, J. W. et al. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Disease Models & Mechanisms**, p. 18, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4348559/>>.

NGHIEM, P. P. et al. Changes in Muscle Metabolism are Associated with Phenotypic Variability in Golden Retriever Muscular Dystrophy . **The Yale journal of biology and medicine**, p. 9, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28955176>>.

NOWAK, K. J.; DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **EMBO reports**, v. 5, n. 9, p. 872–876, 2004.

REED, U. C. Congenital Muscular Dystrophy Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 1, p. 144–168, 2009.

REZENDE, J. et al. **Distrofia muscular de Duchenne**ViçosaFacisa, , 2010. . Disponível em: <<https://academico.univicoso.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/268/430>>.

SHADJOU, N.; HASANZADEH, M.; KHALILZADEH, B. Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. **Bioengineered**, v. 9, n. 1, p. 38–47, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2017.1373539>>.

SHIMIZU-MOTOHASHI, Y. et al. Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy : Current Status of Therapeutic Approaches. **Journal of Personalized Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30621068/>>.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>>.

VIEIRA, N. M. et al. Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype. **Cell**,

p. 11, 2015. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2815%2901405-1>>.

WANG, J. et al. Engineered skeletal muscles for disease modeling and drug discovery. **Biomaterials**, v. 221, n. August, p. 119416, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119416>>.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Paediatrics and Child Health**, p. 1–6, 2015.

