

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Francisco Carlos da Guia

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO DE RATOS WISTAR PARA APLICAÇÕES EM BIOENGENHARIA  
TECIDUAL**

Juiz de Fora, MG

2016

FRANCISCO CARLOS DA GUIA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO DE RATOS WISTAR PARA APLICAÇÕES EM BIOENGENHARIA  
TECIDUAL**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador:

Dr. Carlos Magnos da Costa Maranduba

Co-orientador:

Dr. Fernando de Sá Silva

Juiz de Fora, MG

2016

da Guia, Francisco Carlos .

Desenvolvimento de biomateriais a partir de tecido muscular esquelético de ratos wistar para aplicações em bioengenharia tecidual / Francisco Carlos da Guia. -- 2016.

61 f. : il.

Orientador: Carlos Magnos da Costa Maranduba

Coorientador: Fernando de Sá Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Biomateriais. 2. Músculo esquelético. 3. Descelularização. I. Maranduba, Carlos Magnos da Costa, orient. II. Silva, Fernando de Sá, coorient. III. Título.

**DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO DE RATOS WISTAR PARA APLICAÇÕES EM BIOENGENHARIA  
TECIDUAL**

**Francisco Carlos da Guia**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas, área Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Magnos da Costa Maranduba  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Fernando de Sá Silva  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Co-orientador)

---

Profa. Dra. Michele Munk  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Membro interno)

---

Prof. Dr. Luiz Carlos de Caires Júnior  
Universidade de São Paulo  
(Membro Externo)

---

Profa. Dra. Cristiane Zorzatto  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Suplente)

---

Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Suplente)

**Dedico:** Aos meus pais, Antonia Maria dos Santos e João Carlos da Guia.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer inicialmente aos meus pais Antônia Maria dos Santos e João Carlos da Guia pelo apoio e amor incondicional, pelos conselhos diversos que sempre me guiaram para o caminho certo.

As minhas irmãs Janaina e Solange pelo companheirismo, amor e apoio.

Aos amigos Daniela Kafuri Monteiro, Solon Leite e Luana Carius Justus por terem me aturado por todos esses anos, apesar das diferenças gritantes, sendo os melhores amigos que alguém pode desejar. Como nosso lema diz o que o ódio uni o homem não separa.

Aos amigos Tales Rodrigues e Felipe Valente Fernandes pelo companheirismo, almoços vegetarianos, pela torcida, ombro amigo e pelas discussões políticas.

Aos amigos do Colégio Técnico Universitário pela torcida, amizade verdadeira e, claro, pelos memoráveis churrascos.

As professoras Fabiola Dutra Rocha e Sandra Neves por serem o modelo profissional a se seguir.

Ao pesquisador, professor e amigo Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba por simplesmente ser um educador no real sentido da palavra. Sem sua orientação a realização desse trabalho não seria possível. Agradeço pelas palavras de conforto, pela generosidade, pela paciência, pelos incentivos e acima de tudo por ter se tornado o modelo a se seguir.

Ao Dr. Fernando de Sá Silva pelas sugestões, experiência, generosidade e paciência.

A Doutora, e eterna professora, Leticia Sthephan Tavares e ao Dr. Marcelo de Oliveira Santos por me introduzirem no mundo da genética, sem vocês nada seria possível.

Aos amigos de laboratório, Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral, Rafaella de Souza Salomão Zanette, Gustavo Torres de Souza, Camila Maurmann de Souza, João Vitor Paes Rettore, Vinicius Carius de Souza e Leonardo Ramos Quellis, pelos momentos de descontração, ajuda no laboratório e acima de tudo pelas discussões filosóficas regradas com muito bom humor que partilhamos durante todos esses anos. Aprendi muito com vocês.

E sem mais delongas, pois a gratidão é tanta, mas o espaço pequeno, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. E saibam que seus ensinamentos e incentivos foram de extrema importância tanto para meu crescimento profissional quanto pessoal. Se hoje posso me orgulhar desta conquista devo imensamente a vocês.

## RESUMO

Lesões na musculatura esquelética podem ocorrer devido desordens genéticas ou trauma. Em lesões menos extensas nas quais vasos sanguíneos ou tecido conectivo não são atingidos o músculo consegue se regenerar sem intervenção médica. Contudo, lesões envolvendo porções maiores do tecido a regeneração não consegue ser completa sem intervenção. Desse modo, a engenharia tecidual aparece como uma alternativa para a regeneração completa do tecido. Dentre os biomateriais empregados na regeneração muscular, as matrizes extracelulares descelularizadas figuram como as classes de biomateriais mais empregadas. Contudo até o presente momento não foi desenvolvido uma metodologia de descelularização de tecido esquelético que preserve a arquitetura do tecido e sua composição química com uma taxa adequada de remoção de células. Desta forma, o presente trabalho almeja produzir um biomaterial composto da matriz extracelular de músculo esquelético de rato Wistar descelularizada. Para tanto, músculo esquelético de ratos Wistar machos foram extraídos e submetidos a lavagens sucessivas com soro fisiológico estéril. Posteriormente, os músculos foram congelados e fatiados, sendo então novamente lavado com soro fisiológico e submetido a irradiação com luz UV por 20 min em cada face do material. Após a irradiação, O tecido foi então digerido em uma solução de tripsina 0,05% contendo 0,2% de EDTA pH 7,6 por 2h a 37°C. Em seguida o tecido sofreu banhos, sob refrigeração, em solução de SDS 1% (p/v) por 4 a 5 dias com trocas diárias da solução. Finalmente o material foi submetido a um banho em água destilada por dois dias finalizando assim a descelularização. Após o procedimento foi obtido um biomaterial com aparência translúcida e com uma concentração de DNA de  $0,005 \pm 0,002$  ng de DNA por mg enquanto o controle não descelularizado apresentou uma concentração de  $0,800 \pm 0,107$  ng de DNA por mg de tecido. Além disso, a análise em microscopia de fluorescência comprovou a inexistência de estruturas nucleares e a preservação da arquitetura do tecido após a descelularização. A presente metodologia representa um avanço nos protocolos de descelularização, pois foi obtido um nível de descelularização 10 vezes menor que o preconizado na literatura como ideal além permitir um patamar bem superior de descelularização mantendo a estrutura tridimensional do tecido em comparação a trabalhos similares.

Palavras-chave: Biomateriais, Músculo esquelético. Descelularização.

## ABSTRACT

Injuries in skeletal muscle can occur genetic disorders or trauma. In less extensive injuries in which blood vessels or connective tissue are not affected muscle can regenerate without medical intervention. However, injuries involving major portions of the tissue regeneration can be complete without intervention. Thus, tissue engineering is an alternative to the complete tissue regeneration. Among the biomaterials used in muscle regeneration, the decellularized extracellular matrices appear as the most used biomaterials classes. However until now it has not developed a methodology of skeletal tissue decellularization that preserves the tissue architecture and chemical composition with an appropriate rate of removal of cells. Thus, the present study aims to produce a biomaterial composed of the extracellular matrix decellularized skeletal muscle of Wistar rats. To this end, the skeletal muscle of male Wistar rats were extracted and subjected to repeated washings with sterile saline. Subsequently, the muscles were frozen and sliced, and then washed again with saline and subjected to irradiation with UV light for 20 min on each face of the material. After irradiation, the tissue was then digested in a 0.05% trypsin solution containing 0.2% EDTA pH 7.6 for 2h at 37 ° C. Then the tissue baths experienced under refrigeration, in 1% SDS solution (w / v) for 4 to 5 days with daily exchanges of solution. Finally the material was subjected to a bath in distilled water for two days thus finishing the decellularization. After the procedure was obtained a biomaterial with a translucent appearance and a DNA concentration of  $0.005 \pm 0.002$  ng per mg of DNA while the control had not decellularized a concentration of  $0.800 \pm 0.107$  ng DNA per mg of tissue. Furthermore, fluorescence microscopy analysis confirmed the absence of nuclear facilities and the maintenance of tissue architecture after decellularization. This methodology represents an advance in decellularization protocols because it was obtained a level of decellularization 10 times lower than that recommended in the literature as ideal addition allow much higher level of decellularization keeping the three-dimensional structure of the tissue compared to similar works

Keywords: Biomaterials, Skeletal muscle. Decellularization.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura I      Modificações macroscópicas observadas no músculo após 44  
processo de descelularização. A. Aspecto do músculo após  
etapa de digestão enzimática com tripsina; B. Início do processo  
de perda da coloração decorrido um dia de exposição à ação do  
detergente SDS 1%; C. Progressão da descoloração no terceiro  
dia de exposição à SDS 1% e D. Descoloração total observada  
no quinto dia, e último, de exposição ao SDS 1%.
- Figura II      Quantificação de DNA antes e depois do processo de 45  
descelularização do músculo de ratos. Pode ser observado que  
em média de conteúdo de DNA do músculo in natura em  
relação a amostra descelularizada.
- Figura III     Histologia de fluorescência do músculo de rato não 46  
descelularizado. Corte transversal com ampliação de 200 vezes.  
A. Coloração com DAPI (446nm-476nm) indicando a presença  
de núcleos na periferia das fibras musculares, além disso, é  
perceptível uma auto-fluorescência da matriz na faixa de  
comprimento de onda observado; B. Campo observado por  
meio de luz transmitida; C. Auto-fluorescência da matriz na faixa  
de 500nm-557nm, podemos observar a inexistência de  
estruturas nucleares nessa imagem provando a existência de  
auto-fluorescência da matriz estudada quando submetida à luz  
ultravioleta e D. Sobreposição das imagens A, B e C.
- Figura IV     Histologia de fluorescência do músculo de rato descelularizado. 47  
Corte transversal com ampliação de 200 vezes. A. Coloração  
com DAPI (446nm-476nm) sem a presença de núcleos ou  
estrutura celulares, porém é perceptível apenas uma auto-  
fluorescência da matriz na faixa de comprimento de onda  
observado; B. Campo observado por meio de luz transmitida; C.  
Auto-fluorescência da matriz na faixa de 500nm-557nm,  
podemos observar a inexistência de estruturas nucleares nessa  
imagem provando a existência de auto-fluorescência da matriz

estudada quando submetida à luz ultravioleta e D.  
Sobreposição das imagens A, B e C.

## LISTA DE TABELAS

Tabela I	Biomateriais poliméricos para regeneração muscular.	19
Tabela II	Matriz extracelular derivada de músculo esquelético como biomaterial para regeneração muscular.	29

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
CT	Célula-tronco
BMSCs	“Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells”, células-tronco mesenquimais da medula óssea
DAPI	“4',6-diamidino-2-phenylindole”, 4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid”, ácido etilenodiamino tetraacético
GAGs	Glicosaminoglicanas
GFP	“Green fluorescent protein”, proteína verde brilhante
HE	Coloração hematoxilina eosina
hMSCs	“Human mesenchymal stem cells”, células-tronco mesenquimais humanas
IGF-1	“Insulin-like growth factor 1”, fator de crescimento semelhante a insulina 1
ME	Matriz extracelular
mSCs	“Murine satellite cells”, células satélites murinas
NaCl	Cloreto de sódio
NaN <sub>3</sub>	Azida de sódio
PANi	Polianilina
PBS	“Phosphate buffered saline”, tampão fosfato-salino
PCL	“Poly(ε-caprolactone)”, poli(ε-caprolactona)
PGA	“Poly(glycolic acid)”, ácido poli-glicólico
PLGA	“Poly(lactic-co-glycolic acid)”, ácido poli-lactico-co-glicólico
PLLA	“Poly(L-lactic acid)”, ácido poli-L-lático
RPM	Rotações Por Minuto
SDS	“Sodium dodecyl sulfate”, dodecil sulfato de sódio
VEGF	“Vascular endothelial growth factor”, fator de crescimento endotelial vascular
VML	“Volumetric muscle loss”, perdas musculares volumétricas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	Biomateriais para reconstrução muscular.....	17
1.2	Biomateriais baseados em tecidos descelularizados.....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
2.1	Objetivo geral .....	39
2.2	Objetivos específicos .....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
3.1	Modelos animais .....	40
3.2	Extração dos músculos .....	40
3.3	Descelularização .....	40
3.4	Determinação da descelularização .....	41
3.5	Estatística .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	Descelularização .....	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
5.1	Descelularização .....	48
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual pode ser definida como a junção dos conhecimentos da engenharia e das ciências dos materiais com a ciência da vida e saúde (CORREIA et al., 2014) com o intuito de desenvolver substitutos funcionais para restaurar, reparar ou substituir tecidos e órgãos danificados (CHUA, TAN e AN, 2013). Atualmente, a estratégia considerada como padrão ouro para a regeneração tecidual consiste no transplante de tecido autólogo ou alogênico para a área danificada. Contudo, essa abordagem possui uso limitado devido ao risco de falha relacionado à rejeição do enxerto por reações imunológica bem como falha de sua integração com o tecido do paciente (PORZIONATO et al., 2012), sem mencionar o elevado custo e invasividade do processo.

Outra abordagem comumente empregada consiste no uso de materiais exógenos que servem como arcabouço (do inglês, *scaffolds*) no qual células humanas ou animais podem ser cultivadas (SCHELLER, KREBSBACH E KOHN, 2009). Esse arcabouço fornece um substrato tridimensional (3D) no qual as células podem se fixar, proliferar, diferenciar e produzir uma nova Matriz Extracelular (ME) (STOCK e VACANTI, 2001; SCHELLER, KREBSBACH e KOHN, 2009; LE et al., 2013). Desse modo, o *scaffold* age como um análogo da ME (SCHELLER, KREBSBACH E KOHN, 2009) e deve ser constituído por materiais que sejam: (1) biocompatíveis; (2) biodegradáveis, (3) permitam difusão apropriada de substâncias pela estrutura; (4) possuam estabilidade mecânica ou estrutural; e (5) possuir semelhanças ao tecido que pretende substituir (ROSSI, POZZOBON e DECOPPI, 2010; LE et al., 2013; KASOJU et al., 2014).

Vale salientar que as propriedades dos biomateriais podem ter profunda influência no comportamento celular (SHAPIRA-SCHWEITZER e SELIKTAR, 2007; BREULS, JIYA e SMIT, 2008; PEYTON et al., 2008; GILBERT et al., 2010). Tendo isso em vista, desde o advento da engenharia tecidual existe a dúvida de como projetar e controlar as propriedades de um material com o intuito de gerar uma resposta biológica desejada (MITRAGOTRI e LAHANN, 2009).

Biomateriais podem ser divididos em três classes principais: (1) polímeros; (2) metais e; (3) cerâmicas (WILLIAMS, 2009; BHAT e KUMAR, 2012). Essa é apenas

uma classificação didática visto que cada classe pode ser subdividida em inúmeras subclasses. Por exemplo, os polímeros podem ser divididos em naturais e sintéticos; metais podem se apresentar como ligas ou metais puros; e no grupo cerâmicas estão incluídos vidros, vidros-cerâmicas, entre outros (WILLIAMS, 2009). A escolha da classe de biomaterial a ser empregado para fins reconstrutivos depende basicamente do tipo de tecido a ser regenerado, contudo deve-se sempre ter em mente que seu uso está diretamente relacionado ao risco de inflamações agudas e crônicas, formação de tecido fibroso, reação de corpo estranho e formação granulocitária (ANDERSON, RODRIGUEZ e CHANG, 2008).

Os *scaffolds* poliméricos podem ainda ser divididos de acordo com sua composição em *scaffolds* constituídos por polímeros naturais como colágeno, fibrina e ácido hialurônico, e em *scaffolds* compostos por polímeros inorgânicos ou sintéticos como ácido poli-L-lático (PLLA, do inglês, poly(L-lactic acid)), ácido poliglicólico (PGA, do inglês, poly(glycolic acid)), poliprolactona e ácido lático-co-ácido glicólico (KARP e LANGER, 2007; WILLIAMS, 2009; LE et al., 2013; ZHANG, GUPTE e MA, 2013; ZORLUTUNA, VRANA e KHADEMHOSEINI, 2013). Uma análise mais detalhada dos diferentes tipos de polímeros utilizados como biomateriais pode ser encontrada em Mano et al. (2007) e em Ulery, Nair e Laurencin (2011). Em resumo, compostos naturais possuem como vantagem sua biocompatibilidade (ZHANG, GUPTE e MA, 2013), contudo, em sua maioria, não possuem resistência mecânica (LE et al., 2013; ZHANG, GUPTE e MA, 2013). Além disso, acarretam potenciais problemas imunológicos e patológicos (ZHANG, GUPTE e MA, 2013) fazendo com que compostos sintéticos, com suas propriedades mais previsíveis, sejam uma melhor opção para a engenharia tecidual (ZHANG, GUPTE e MA, 2013). No entanto, os compostos sintéticos possuem como desvantagem a incapacidade de proporcionar uma interface complexa que forneça todas as interações e sinais presentes em uma ME natural, impedindo assim a formação de um tecido funcional. Esses *scaffolds* também são associados com um atraso no processo de remodelamento tecidual e podem prolongar reações imunológicas. Outro problema consiste na uniformidade estrutural de biomateriais compostos por apenas um tipo de polímero sintético, pois não conseguem recriar a hierarquia complexa dos tecidos (ZORLUTUNA, VRANA e KHADEMHOSEINI, 2013).

Lisi et al. (2012) desenvolveu um *scaffold* baseado em fibrina conjugada com poliéter-uretano-polidimetilsiloxano para o tratamento de lesões cardíacas. Como

resultado, o material foi capaz de manter, *in vitro*, uma melhor proliferação e diferenciação de células amnióticas mesenquimais do estroma humano que foram cultivadas no *scaffold* quando comparadas com células crescendo no fundo de placas de Petri, mostrando que de fato cultura de células em um substrato 3D possui uma influência profunda no comportamento celular.

Da mesma forma Wang et al. (2013) desenvolveram um filme polimérico constituído por poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL, do inglês poly( $\epsilon$ -caprolactone)), esse *scaffold* possuía topografia anisotrópica com o intuito de criar um material que pudesse guiar o alinhamento entre as células cultivadas em seu interior. Vale notar que o filme polimérico foi produzido por um método que dispensava o uso de solventes orgânicos, soluções essas que são responsáveis pela bioincompatibilidade em biomateriais, sendo que a estrutura anisotrópica foi produzida pelo emprego de esticamentos uniaxiais. Células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs, do inglês, *Human Mesenchymal Stem Cells*) foram cultivadas no filme e sua estrutura anisotrópica conseguiu aumentar o alinhamento e alongamento celular em comparação à um biomaterial sem anisotropia. Devido o fato de o tecido muscular esquelético ser altamente anisotrópico, essa estratégia foi voltada para a criação de substitutos musculares que possuíssem uma arquitetura e um grau de diferenciação celular apropriados. Foi observado que as células cultivadas no filme anisotrópico de PCL expressaram crescentes níveis de genes miogênicos provando que a interação das células com a estrutura tridimensional do *scaffold* não determinou apenas sua organização espacial, mas também foi capaz de induzir seu processo de diferenciação.

Outra classe de *scaffolds* que vem ganhando crescente atenção na engenharia tecidual são as matrizes extracelulares) descelularizadas de tecidos. Apesar de promissor, o uso de ME nativa, para propósitos regenerativos, é limitado pela falta de conhecimento das propriedades desse biomaterial (NAKAYAMA et al., 2013) mesmo estes tendo sido usados com sucesso em ensaios clínicos (MACCHIARINI et al., 2008; ELLIOTT et al., 2012). Não obstante, existe a necessidade de melhor entender as habilidades desse biomaterial.

Como os biomateriais são um aspecto vital da engenharia tecidual este trabalho irá inicialmente fazer uma revisão do uso desses materiais na reconstituição do tecido muscular esquelético. O uso de polímeros naturais e sintéticos será brevemente abordado seguido por uma descrição da evolução do uso de ME

descelularizada proveniente de tecido muscular para a reconstituição de tecido muscular. Cerâmicas e metais não serão levados em consideração nessa revisão devidos seu uso limitado na regeneração muscular. Ao final desse levantamento literário iremos apresentar nossos dados quanto o desenvolvimento de um *scaffold* baseado em músculo esquelético de rato descelularizado.

## 1.1 BIOMATERIAIS PARA RECONSTRUÇÃO MUSCULAR

O músculo é um tecido complexo formado por vasos sanguíneos, nervos, tecido conectivo e células contráteis denominadas fibras musculares (GILLIES e LIEBER, 2011). As fibras musculares por sua vez, são limitadas por uma lamina basal e uma membrana plasmática conhecida como sarcolema (MEREGALLI et al., 2014). Os tipos musculares diferem entre si quanto a função, propriedades bioquímica e composição celular (SCHIAFFINO e REGGIANI, 2011), porém as características básicas desse tecido são relacionadas a sua localização anatômica (BENTZINGER et al., 2013).

Dano muscular pode ocorrer por meio de desordens genéticas ou injúrias traumáticas, e estão relacionadas à função e localização anatômica do músculo (MILNER e CAMERON, 2013). Dentre elas, entorses, contusões e lacerações são exemplos bem conhecidos de lesões da musculatura esquelética que podem ser completamente regeneradas com o tempo sem qualquer tipo de intervenção (JÄRVINEN et al., 2005). Contudo, lesões envolvendo porções maiores de tecido muscular, nos quais tecido conectivo e vasos são danificados, a regeneração não é completa sem intervenção médica (MERRITT et al., 2010; MILNER e CAMERON, 2013). Em perdas musculares volumétricas (do inglês, *Volumetric Muscle Loss - VML*) os tratamentos atualmente disponíveis são (1) amputação, (2) órtese de membro e (3) transplante autólogo de massa muscular (MILNER e CAMERON, 2013). Além desse, a bioengenharia surge como uma alternativa promissora para a regeneração do tecido muscular esquelético (BACH et al., 2004; BORSCHEL, DENNIS e KUZONJR, 2004; BIAN e BURSAC, 2009).

A Terapia celular e a estratégia de entrega de fármaco, bem como a combinação dessas duas abordagens são métodos que vem sendo investigados na regeneração muscular. A terapia celular pode ser realizada pela injeção direta das células na região afetada. Contudo esse método é limitado devido a elevada

mortalidade de células e sua ineficiente integração com o tecido do paciente. Por outro lado, sistemas de entrega de fármaco não conseguiram até o momento produzir resultados satisfatórios (BORSELLI et al., 2010).

Como forças mecânicas possuem uma profunda influência no comportamento celular e na organização tecidual esse componente deve ser levado em consideração no desenvolvimento de substitutos musculares. Mimetizar o ambiente celular e as forças responsáveis pela arquitetura muscular *in vitro* não é uma empreitada fácil. Outro problema decore da necessidade de incorporação do substituto muscular ao tecido do paciente permitindo uma acoplagem mecânica perfeita com o tecido adjacente, logo o biomaterial deve ser capaz de se automodelar *in vitro* e essa característica deve ser preservada quando o material for aplicado no organismo. Para esse tipo de tecido uma estratégia mais viável consiste na promoção da regeneração *in situ* (SPECTOR, 2006). A Tabela I sumariza alguns estudos que utilizam diferentes polímeros como *scaffolds* para reconstrução muscular dando destaque para alguns de seus achados.

Tabela I Biomateriais poliméricos para regeneração muscular

Polímero	Célula	Estratégia	Resultados	
Ácido poli-L-lático (PLLA) e ácido polilactico-co-glicólico (PLGA).	Mioblasto de camundongo e células embrionárias endoteliais humanas.	Implante do biomaterial <i>in vivo</i> para avaliação da formação de miotubos e vasos sanguíneos.	Observação de neovascularização dos implantes que determinou uma melhor repovoação celular e sobrevivência dos miotubos.	LEVENBERG et al., 2005
Pó de alginato conjugado covalentemente com oligopeptídeos com uma sequência de G4RGDSP.	Mioblasto de camundongo.	Avaliação <i>in vivo</i> da proliferação e comportamento dos mioblastos quando cultivados na matriz de alginato.	Trinta dias após o tratamento das lesões musculares com o conjugado de alginato, carregando células e fatores de crescimento, foi possível observar uma redução significativa da lesão.	HILL, BOONTHEEKUL, e MOONEY, 2006
Membrana polimerica de PLGA com micro-padrão produzida usando técnica de litografia.	Células satélites murinas (mSCs do inglês, Murine Satellite Cells).	Avaliação <i>in vivo</i> do potencial de regeneração de mSCs carregada por meio de uma matriz biodegradável ao local da lesão muscular.	Quatro semanas após o transplante, o número de fibras musculares foi significativamente maior nos músculos onde a matriz contendo mioblastos do que naqueles onde os mioblastos foram injetados diretamente.	BOLDRIN et al., 2007
Conjugado de poli(3-caprolactona) (PCL) e colágeno.	Células da musculature esquelética de humanos.	Avaliação <i>in vitro</i> da adesão, proliferação e organização das células musculares quando cultivadas no conjugado.	Conjugado com nanofibras unidirecionalmente alinhadas induziu significativamente o alinhamento das células musculares e formação de miotubos quando comparado à um conjugado com nanofibras randomicamente alinhadas.	CHOI et al., 2008
<i>Scaffold</i> com microfibras altamente orientadas composto por poliéster uretano.	Linhagens C2C12 e L6 de mioblastos.	Avaliação <i>in vitro</i> de proliferação e comportamento celular quando submetido a cultivo em biomaterial altamente orientado.	Produção de uma matriz altamente orientada por meio da técnica de electrospun; Alta proliferação de células mio gênicas na matriz orientada em comparação com matriz desprovida de orientação; Observação de formação de miofibras paralelas à orientação da matriz.	RIBOLDI et al., 2008
Géis de colágeno tipo I e fibrina	Mioblastos de rato	Avaliação <i>in vitro</i> de proliferação e comportamento celular quando submetido a cultivo em biomaterial.	Observação de que a consistência da matriz tem uma importante influência na proliferação e diferenciação celular.	Beier et al., 2009
Matrizes de PLGA orientadas e com orientação randômica.	Linhagem C2C12 de mioblastos murinos.	Avaliação <i>in vitro</i> de proliferação e comportamento celular quando submetido a cultivo em	As células crescendo na matriz orientada se alinharam a topografia do material apresentando uma morfologia mais alongada com organização de	AVISS, GOUGH e DOWNES, 2010

		biomaterial orientado.	fibras de F-actina, em comparação as células cultivadas na matriz sem organização definida possuíam aparência mais poligonal com pouca organização de fibras de F-actina.	
Matriz de poli(dimetilsiloxano) com padrão de microranhuradas.	Linhagem C2C12 de mioblastos murinos.	Avaliação <i>in vitro</i> da organização e do processo de fusão celular.	Após dois dias em meio de diferenciação, as fibras de F-actina apareceram desorganizadas na matriz não organizada. Em contraste, as fibras de F-actina apresentaram orientação que seguia a topografia dos canais no substrato possuindo micro-padrão.	HUANG, LEE e LI, 2010
Hidrogel fotopolimerizável baseado em ácido hialurônico.	Células satélites, progenitores muscular e miofibras.	Biomaterial para entrega de células <i>in vivo</i> .	Remoção cirúrgica de porção do músculo de um modelo murino com subsequente tratamento com polímero contendo células miogênicas; Após seis semanas o grupo tratado com o polímero carregado com células mostrou regeneração muscular, em contraste ao grupo controle que apresentou infiltração de tecido conjuntivo na área lesionada; Recuperação significativa da força muscular no grupo tratado com células satélites em associação com o hidrogel.	ROSSI et al., 2011
Biomaterial eletrocondutivo composto por nanotubos de carbono com poliuretano.	Linhagem C2C12 de mioblastos murinos.	Investigação <i>in vitro</i> do efeito sinérgico de estímulos topológicos e elétricos usando o biomaterial de fibras de carbon nano estruturado pela técnica de eletrospun na diferenciação de mioblastos.	Aumento da diferenciação miogênica das células progenitoras quando cultivadas no nano material na presença ou ausência de estímulo elétrico; A diferenciação celular parece estar relacionada a condutividade do material quando estímulos elétricos são utilizados, contudo na ausência desse estímulo a diferenciação parece ser dependente da morfologia do biomaterial. Contudo, nos dois casos, o <i>scaffold</i> de poliuretano com fibras de carbon apresentou maior número de miotubos que o biomaterial usado como controle.	SIRIVISOOT e HARRISON, 2011
Hidrogel fotopolimerizável de polietilenoglicol-fibrinogênio.	Mesoglioblastoma.	Biomaterial para entrega de células <i>in vivo</i> .	Injeção intramuscular do hidrogel carregado com células miogênicas em um modelo murino de lesão muscular aguda e crônica; Entrega bem sucedida de células à área lesionada; Fusão aumentada dos mesoglioblastomas com os miofibras gerando regeneração no grupo tratado com o polímero conjugado com células quando comparado com o controle negativo;	FUOCO et al., 2012

			Elevado nível de integração ao tecido do paciente foi relacionado com a ação anti-apoptótica mediado pelo biomaterial.	
Polianilina (PANI) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)	Linhagem C2C12 de mioblastos murinos.	Investigação <i>in vitro</i> do efeito sinérgico de estímulos topológicos e elétricos na diferenciação de mioblastos usando um biomaterial produzido por electrospun.	Os mioblastos cresceram em alinhamento com as nanofibras do material apresentando diferenciação mais eficiente quando comparada com uma matriz de PCL com organização randômica.	CHEN, SUN e CHEN, 2013
Ácido poli-L-lático (PLLA) e ácido poli-lactico-co-glicólico (PLGA do inglês, Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)).	Mioblastos, fibroblastos e células endoteliais.	Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da neovascularização, no biomaterial e na musculatura abdominal do modelo animal, bem como, do processo de regeneração da lesão.	Após uma semana o biomaterial sintético de PLLA e PLGA conjugado com os três tipos celulares demonstrou neovascularização mais pronunciada que biomateriais que receberam apenas um tipo celular. O material foi posteriormente transplantado em camundongos com lesão abdominal e uma semana após o procedimento as células se mantiveram viáveis e capazes de gerar vasos sanguíneos.	SHANDALOV et al., 2014

Kroehne et al. (2008) desenvolveram um *scaffold* baseado em colágeno tipo I com estrutura ordenada que, *in vitro*, permitiu a proliferação de miotubos em uma disposição organizada dentro dos poros do material. Além disso, as células cultivadas se diferenciaram, fato este perceptível pelo aparecimento da expressão de miosina sarcomérica. Também foi observado que as células secretaram laminina indicativo de um processo de neoformação da ME. Quando o *scaffold* pré cultivado com células miogênicas foi transplantado para um camundongo transgênico, cujas células musculares expressavam a proteína GFP (proteína verde fluorescente do inglês, Green Fluorescent Protein), foi observado que o biomaterial continha mais células diferenciadas em comparação com o teste *in vitro*. Também foi observado que as células do *scaffold* não expressaram a proteína GFP sugerindo que o processo de repopulação do biomaterial se deu por meio da proliferação das células miogênicas pré-cultivadas e, além disso, também foi verificada uma melhoria na produção de força pelo músculo após o transplante. Desse modo, esses achados suportam a ideia do uso de biomaterial para a regeneração de VML.

Awiss, Gough e Downes (2010) desenvolveram um biomaterial composto por polímeros de PLGA cujas fibras foram alinhadas pelo processo de *electrospin* usando diferentes tipos de rotação, desse modo foram produzidos *scaffolds* com disposição randômica de suas fibras além de *scaffolds* com fibras alinhadas. Os biomateriais assim produzidos foram usados para o cultivo de mioblastos da linhagem celular C2C12. O biomaterial com disposição orientada de fibras aparentemente gerou um processo de agregação celular determinando um estado de diferenciação incipiente com sete dias de cultura em comparação com células cultivadas em placa de Petri. Contrariamente as células cultivadas na matriz com organização randômica assumiram uma disposição menos organizada devido à falta de paralelismo conferida pelas fibras orientadas e, além disso, o estado de diferenciação celular observado nesse material foi menos pronunciado que no biomaterial com fibras orientadas.

Uma característica importante em um biomaterial para regeneração muscular é sua habilidade em gerar neovascularização. Com o intuito de suprir essa necessidade, Levenberg et al. (2005) produziram um *scaffold* baseado em PLLA e PLGA em proporção idêntica de cada polímero o que conferiu alta porosidade a estrutura. O biomaterial foi co-cultivado com mioblastos de camundongo e células embrionárias endoteliais humanas ou com células endoteliais da veia umbilical de

humanos. O biomaterial, *in vitro*, foi capaz de gerar a formação de miotubos, os quais se encontravam parcialmente alinhados. Quando co-cultivado com células endoteliais o biomaterial determinou a formação de uma estrutura semelhante a vasos sanguíneos que se encontravam perfeitamente integrados com os miotubos presentes. Em um segundo momento, o constructo foi transplantado para um modelo murino de três maneiras: (1) implante subcutâneo; (2) implante intramuscular; (3) e substituição de um segmento muscular. O biomaterial pré-cultivado continuou promovendo diferenciação celular *in vivo* e os vasos presentes na estrutura eram funcionais produzindo maiores índices de sobrevivência celular e de perfusão sanguínea.

Ma et al. (2011) usaram um *scaffold* cilíndrico 3D feito a partir de colágeno bovino comercial que foi pré-cultivado com mioblastos C2C12 para tratar VML em um modelo murino. O constructo foi gerado pelo cultivo *in vitro* de células miogênicas por 3 semanas antes do seu transplante. Na primeira semana de cultivo, foi observada migração celular para o centro do *scaffold* 3D. Na segunda semana, foi notada uma progressiva expressão de marcadores endoteliais que se estendeu até a terceira semana sugerindo que as células cultivadas entraram em processo de diferenciação endotelial *in vitro* e se mantiveram viáveis e capazes de proliferar. Posteriormente, o *scaffold* pré-cultivado foi transplantado para camundongos imunodeficientes. Após 20 dias foi observado que as células pré-cultivadas se mantiveram presentes no biomaterial assim como haviam se integrado ao tecido circundante demonstrando o processo de integração do biomaterial com seu hospedeiro, além disso, o processo de vascularização se manteve ativo no interior do biomaterial. Resultados semelhantes não foram observados quando o biomaterial desprovido de células miogênicas foi transplantado para o mesmo modelo, pois poucas células do hospedeiro foram capazes de colonizar o biomaterial.

Thorrez et al. (2008) usaram um *scaffold* poroso de PLGA para avaliar a proliferação, adesão e diferenciação de mioblastos humanos *in vitro*. As células foram cultivadas na superfície do material e após quatro dias essas células se diferenciaram em fibras musculares expressando tropomiosina sarcomérica sem orientação específica na superfície do material, além disso, foi observado um gradiente de densidade de fibras musculares que decrescia da superfície do material até o centro do constructo. Posteriormente, o biomaterial contendo fibras musculares foi transplantado subcutaneamente em um camundongo imunodeficiente para

observar seu comportamento *in vivo*. As fibras musculares mantiveram sua morfologia 30 dias após o procedimento cirúrgico sobrevivendo em diferentes profundidades no *scaffold*, mas não ultrapassando a marca de 150µm de profundidade.

Um protocolo para a manufatura de constructos musculares artificiais que permite controle da sua geometria e do alinhamento de fibras foi reportado por Bian et al. (2009). Um molde de poli(dimetilsiloxano) o qual continha a arquitetura desejada esculpida em sua superfície foi usado para direcionar o processo gelificação de uma mistura de gel de fibrina com células miogênicas para gerar os análogos musculares com estrutura 3D controlada. Esse método representa um protocolo reprodutível para gerar *in vitro* constructos musculares planares com arquitetura precisa. Com o auxílio de outras técnicas de captura de imagem, essa técnica poderia reproduzir topografias mais realísticas presentes na estrutura nativa do músculo.

Borselli et al. (2011), tentaram melhorar os resultados obtidos pelo use de *scaffolds* para o transplante de células ou drogas para áreas musculares danificadas usando uma matriz de alginato modificada contendo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês Vascular Endothelial Growth Factor) humano recombinante e fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1, do inglês *insulin-like growth factor 1*) carregado com mioblastos. Uma elevada melhora na vascularização foi alcançada com esse biomaterial carregando os dois fatores de crescimento e as células miogênicas em comparação com a mesma matriz contendo apenas os fatores de crescimento. Esse dado sugere que a combinação do transplante de células miogênicas com fatores de crescimento induz uma regeneração muscular de maior qualidade se comparando com o transplante contendo cada constituinte sepradamente. Com o intuito de superar a demanda celular por oxigenação durante o processo de regeneração em biomateriais que produzam baixo índice de vascularização Ward et al (2013) utilizaram um *scaffold* constituído por percarbonato de sódio, material esse capaz de gerar oxigênio de forma controlada, para determinar *in vivo* e *in vitro* a capacidade desse biomaterial de manter a homeostasia muscular durante períodos de hipóxia. O biomaterial foi administrado por injeção intramuscular em todo o músculo que havia sido removido cirurgicamente do modelo animal. A concentração de 1mg/mL ou menor de percarbonato de sódio foi biocompatível, pois na presença de antioxidante não

determinou a redução da força contrátil e viabilidade celular no músculo. Quando o constructo foi submetido a uma avaliação de força contrátil sob condições de hipóxia e de oxigenação o biomaterial conseguiu sustentar a atividade contrátil do músculo. Sugerindo que sua degradação produziu uma quantidade suficiente de oxigênio capaz de sustentar atividade muscular. Esse biomaterial também foi capaz de manter parcialmente o metabolismo muscular basal *in vivo* em condições de isquemia parcial. Desse modo, esse estudo representa um avanço nos estudos do uso de biomateriais na regeneração muscular, pois fornece uma solução para o grave problema do baixo aporte de oxigênio nas regiões mais profundas de biomateriais que bloqueiam o repovoamento e sobrevivência celular em constructos 3D mais robustos permitindo assim a produção de biomateriais para a substituição de grandes partes de tecido muscular.

Pela análise detalhada dos artigos supracitados podemos apreender aspectos determinantes para o uso de biomateriais na regeneração de lesões musculares. Nota-se uma elevada preocupação com a arquitetura 3D do material, visto que sem o paralelismo ordenado das fibras musculares em crescimento o tecido regenerado não possibilitaria contração funcional. Outra preocupação recai sobre a ineficiência da perfusão de nutrientes, especialmente oxigênio, que colabora para o insucesso do processo de recelularização do biomaterial. Logo, o controle da porosidade do biomaterial aumentando assim sua taxa de difusão e o uso de biomateriais que durante seu processo de degradação liberem moléculas de oxigênio aparece como estratégias para contornar esse problema. Além dessa abordagem, podemos citar a buscar pelo aumento da taxa de formação de vasos sanguíneos pelo co-cultivo com células progenitoras endoteliais e progenitores miogênicos, bem como o emprego de fatores de crescimentos relacionados ao processo de neovascularização além da abordagem celular na reconstituição do tecidual. Outra preocupação consiste na tentativa de garantir a biocompatibilidade do material ao racionalizar o processo de produção dos polímeros ao reduzir o uso de solventes orgânicos. E finalmente, a tentativa de mimetizar não só os estímulos químicos e espaciais encontrados no músculo *in natura*, mas também do componente elétrico e tensional para dirigir a diferenciação miogênica perfeita das células cultivadas no biomaterial garantindo mais uma vez a produção de um substituto muscular funcional.

Tendo isso em vista, uma das tendências na área consiste no uso da ME descelularizada de músculos como biomaterial para a regeneração muscular. Visto

que, ao usar essa classe de biomateriais muitos dos problemas supracitados são perfeitamente contornados, pois tais biomateriais preservam grande parte da estrutura nativa do músculo, assim como são por definição biocompatíveis. Desse modo, a próxima seção fará uma revisão da literatura concernente aos biomateriais derivados de ME descelularizada de músculo.

## 1.2 BIOMATERIAIS BASEADOS EM TECIDOS DESCCELULARIZADOS

A ME é o melhor biomaterial na natureza devido o fato de ser produzido pelas próprias células que o habita, desse modo tal biomaterial possui extraordinária biocompatibilidade (PERNICONI et al., 2011). Biomateriais baseados em ME são uma subclasse de *scaffolds* usados na medicina regenerativa que pode ser obtido de várias origens e por meio de diversos protocolos de descelularização tecidual (HE e CALLANAN, 2012). Dentre os órgãos/tecidos possíveis de serem reconstituídos com essa técnica podemos citar: (1) osso (FRÖHLICH et al., 2009; HASHIMOTO et al. 2011; MARCOS-CAMPOS et al., 2012); (2) cartilagem (YANG et al., 2008; ZANG et al., 2013); (3) coração (CARVALHO et al., 2012; LU et al., 2013); (4) córnea (GONZALEZ-ANDRADES et al., 2011); (5) válvulas cardíacas (ZHOU et al., 2013); (6) pele (CHOI et al., 2012); (7) laringe (FISHMAN et al., 2012); (8) tendões (VAVKEN, JOSHI e MURRAY, 2009); (9) e pulmão (PETERSEN et al., 2010).

Como revisado por Crapo, Gilbert e Badylak (2011) e por Gilbert (2012) o processo de descelularização pode ser alcançado pelo tratamento do tecido com agentes químicos, físicos ou enzimáticos que tem por objetivo a remoção das células com reduzida degradação e perda dos componentes da ME (GILBERT, 2012), levando a preservação da estrutura 3D do tecido nativo bem como de suas moléculas bioativas (LE et al., 2013).

Biomateriais baseados em ME são associados com processos como proliferação, migração e diferenciação celular fazendo com que essa classe de biomateriais seja uma boa opção para a regeneração tecidual (CRAPO, GILBERT e BADYLAK, 2011). Os mecanismos de regeneração tecidual mediado pelos *scaffolds* derivados de ME estão relacionados a angiogênese local, aumento da taxa de proliferação celular, recrutamento de células-tronco e células progenitoras no biomaterial e a uma resposta imune mediada predominantemente por macrófagos M2 que ocorre após o processo de transplante (WOLF et al., 2012).

Contudo, um dos principais problemas com relação a descelularização de tecidos consiste no risco de resposta imunológica desencadeada por remanescentes celulares que possam se manter retidos na ME (CRAPO, GILBERT e BADYLAK, 2011). Após estudos na área da descelularização celular alguns critérios foram estabelecidos para considerar um tecido descelularizado, logo para tanto (1) o conteúdo de DNA dupla fita do tecido tem que está abaixo de 50 ng por 100 mg de tecido; (2) presença de fragmentos de DNA menores que 200 pb; e (3) ausência de estruturas nucleares por meio de técnicas histológicas diversas, mais comumente hematoxilina e eosina e coloração por 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, do inglês, 4',6-diamidino-2-phenylindole) (CRAPO, GILBERT e BADYLAK, 2011; GILBERT, 2012; SAWKINS et al., 2013).

Quando a regeneração do tecido muscular é levada em consideração, outros desafios são adicionados a necessidade de preservação química e estrutural supracitada (PERNICONI et al., 2011). Dentre eles está a alta complexidade do tecido muscular, que possui elevada compactação celular, alinhamento uniforme de suas fibras musculares e uma fina ME que permeia o tecido (SATO et al., 2012). Desse modo, o *scaffold* para ser funcional precisa permitir que tais peculiaridades do tecido muscular sejam restabelecidas. Outro fator dificultador consiste no fato do tecido muscular ser composto por mais de um tipo celular, portanto o biomaterial deve ser capaz de promover a proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares como células endoteliais e neurais (BACH et al., 2004).

Essas questões vêm sendo o centro das investigações das pesquisas com biomateriais derivados de ME desde o primeiro estudo com ME derivada de músculo por Carlson e Carlson (1991) que isolaram a ME de músculos com o intuito de estudar sua morfologia e os componentes dessa matriz. Os autores coletaram o músculo extensor *digitorum longus* de ratos Wistar e o processo de descelularização foi alcançado pela exposição do tecido a raio-X seguida por tratamentos químicos com uma série de detergentes e enzimas (para mais detalhes do protocolo consultar Tabela II). Após o tratamento com detergentes o tecido adquiriu progressivamente um aspecto translúcido e sob microscopia as proteínas extracelulares se mantiveram intactas assim como sua organização 3D. De maneira geral, esse estudo mostrou que um biomaterial derivado de ME descelularizada de músculo pode ser produzida com um protocolo relativamente simples e possuindo uma alta preservação de sua organização 3D. A Tabela II faz um sumário de alguns estudos com ME

descelularizada de músculo enfatizando os protocolos utilizados para alcançar a descelularização e seus resultados mais relevantes.

Tabela II Matriz extracelular derivada de músculo esquelético como biomaterial para regeneração muscular

Modelo animal	Músculo	Descelularização	Recelularização	Resultados	
Ratos Wistar linhagem F-445.	Extensor digital longo.	2500 rad de irradiação com raios-X; 0,75% de bupivocaina (10 min); Choque osmótico com em solução gelada de 10mM EDTA e 0,05% de azida; 3% Triton X-100 com 0,05% azida (24h a 4°C); 0,025% DNase com 1M NaCl e 0,05% azida (4-8h, 4°C); 4% desoxicolato de sódio com 0,05% azida (24-48h, temperatura ambiente).		O tecido adquiriu um aspecto translúcido; Análise microscópica indicou a preservação das fibras do tecido conectivo e de componentes da ME, enquanto fibras musculares não foram observadas; Organização 3D conservada.	CARLSON e CARLSON, 1991
Ratos brancos neozelandeses.	Diafragma.	Água destilada (por 72h a 4°C); Desoxicolato de sódio 4% (por 4h); 2000K unidades de DNase I (por 3h); Todo o procedimento foi repetido três vezes.	Recelularização <i>in vivo</i> por transplante do <i>scaffold</i> acelular para um modelo murino de defeito da parede abdominal.	Neovascularização observada desde o quadragésimo dia até o nonagésimo após o transplante; Substituição do biomaterial por tecido de cicatrização no nonagésimo dia após o transplante; Não foi observado infiltração de células musculares no biomaterial.	GAMBA et al., 2002
Camundongos C57-BL6;	Extensor digital longo.	Glicerol 80%/ 0.9% NaCl/ 0.05% NaN <sub>3</sub> / 25 mM EDTA (por 3 dias); Desoxicolato de sódio 4.2%/ 0.05% NaN <sub>3</sub> (por 3 dias); Glicerol 80%/ 0.9% NaCl/ 0.05% NaN <sub>3</sub> / 25 mM EDTA (por 2 dias); 1% SDS/ 0.05% NaN <sub>3</sub> (por 2 dias) 3% Triton X-100/ 0.05%	Recelularização <i>in vitro</i> com mioblastos C2C12.	Foi observada fusão celular; Limitada recuperação da força contrátil.	BORSCHEL, DENNIS e KUZONJR, 2004

		NaN <sub>3</sub> (por 2 dias); 1% SDS/ 0.05% NaN <sub>3</sub> (por 2 dias); 0.05% NaN <sub>3</sub> (por 2 dias).			
Ratos Sprague– Dawley.	Músculo abdominal.	Água destilada (por 72h a 4°C); 4% de desoxicolato de sódio (por 4h); 2000kU DNase I em 1M NaCl (por 3h); Todos os passos foram repetidos.	Os <i>scaffolds</i> foram pré-cultivados com mioblastos isolados de ratos e então transplantados para um modelo de defeito da parede abdominal.	Integração do <i>scaffold</i> ao tecido do animal submetido ao transplante com presença de neovascularização, atividade elétrica e fusão celular até o segundo mês decorrido o transplante; Substituição do biomaterial por tecido de cicatrização e tecido adiposo por volta do terceiro mês após o transplante.	CONCONI et al., 2005
Ratos Lewis.	Músculo abdominal.	Água destilada (por 72h a 4°C); 4% de desoxicolato de sódio (por 4h); 2000kU DNase I em 1M NaCl (por 3h); Todos os passos foram repetidos.	Os <i>scaffolds</i> foram pré-cultivados com mioblastos isolados de ratos e então transplantados para um modelo de defeito da parede abdominal.	Integração do biomaterial ao tecido do animal submetido ao transplante com neovascularização e fusão celular; O <i>scaffold</i> se manteve íntegro até o nono mês após o transplante; Os mioblastos pré-cultivados foram os maiores responsáveis pela regeneração muscular.	COPPI et al., 2006
Ratos Fisher 344/ Brown Norway F1.	Quadríceps e músculo do tendão do jarrete fatiado em fatias com espessura menor que 500µm.	Água ultra pura (por 48h a 4°C); 0,05% tripsina com EDTA (por 1h a 4°C); 1% Triton X-100 (por 120h a 4°C); Água ultra pura (por 48h a 4°C); PBS (por 24h a 4°C).	Recelularização <i>in vitro</i> de superfícies revestidas com extratos de ME com células satélites de ratos e humanos e com mioblastos C2C12.	Ausência de núcleos e células pela coloração de DAPI e HE; Presença de colágeno na ME e outras proteínas de alto e baixo peso molecular; Perda de glicosaminoglicanas (GAGs); Elevada proliferação e diferenciação de células miogênicas na ME.	STERN et al., 2009
Ratos Lewis	Músculo gastrocnêmio (pedaços de aproximadamente 1cm x 1cm)	Água deionizada (por 24h a 4°C); Clorofórmio (96-120h); 2% SDS (por vários dias); Água deionizada (por	A matriz descelularizada foi transplantada para ratos Lewis com grande remoção cirúrgica de segmentos do músculo gastrocnêmico.	A matriz acelular suportou o processo de neovascularização e o crescimento de miofibras, mas todos esses efeitos foram restritos à periferia do biomaterial; Não foi observada recuperação	MERRITT et al., 2010

		vários dias); 0.1M tampão Tris pH 9.0 (4h); PBS + 1% penicilina/estreptomicina; Irradiação com luz UV por 12h.		funcional.	
Ratos Lewis	Músculo gastrocnêmioi (pedaços de aproximadamente 1cm x 1cm)	Água deionizada (por 24h a 4°C); Clorofórmio (96-120h); 2% SDS (por vários dias); Água deionizada (por vários dias); 0.1M tampão Tris pH 9.0 (4h); PBS + 1% penicilina/estreptomicina; Irradiação com luz UV por 12h.	Defeitos musculares foram tratados como no trabalho anterior, porém após uma semana após o procedimento células-tronco mesenquimais da medula óssea foram injetadas no biomaterial.	Neovascularização e crescimento de miofibras foram observados, contudo restritos à periferia do biomaterial; Foi observada recuperação funcional do músculo após 48 dias do transplante.	MERRITT et al., 2010
Porco	Músculo intercostal (pedaços de aproximadamente 1cm <sup>3</sup> ).	Água deionizada; 1% SDS em PBS (por 4–5 dias); Água deionizada.	Recelularização <i>in vitro</i> com mioblastos C2C12.	Prematura diferenciação com miofibras possuindo grande diâmetro e elevado índice de fusão.	DEQUACH et al., 2010
Camundongo C57BL/6	Músculo tibial anterior.	Incubação em 50nM latrunculina B (por 2h a 37°C); Incubação em 0.6M cloreto de potássio (por 2h) seguido por exposição a 1.0M iodeto de potássio (por 2 h); Água destilada; Incubação em 0.6M cloreto de potássio (por 2h) seguida por exposição a 1.0M iodeto de potássio (por 2 h);	Recelularização <i>in vitro</i> com mioblastos C2C12.	Repovoamento da superfície do <i>scaffold</i> pelas células cultivadas após 4 dias de cultura.	GILLIES et al., 2010

		Incubação em DNase I (1kU/mL por 2h) Água destilada (por 2 dias).			
Camundongo BALB/C	Músculo tibial anterior e extensor digital longo	1% SDS por 24 à 48h; Três lavagens com PDS.	O biomaterial descelularizado foi transplantado para o modelo animal.	Após o transplante o biomaterial foi repovoado por células miogênicas que sofreram diferenciação gerando fibras musculares; Infiltração do biomaterial por macrocitária e de outras células imunológicas foi impedida por meio de terapia imunossupressiva gerando um aumento no processo de formação de miofibras.	PERNICONI et al., 2011
Porcos Yorkshire	Músculo esquelético da pata traseira (pedaços de aproximadamente 1cm <sup>3</sup> ).	Protocolo de descelularização como o anterior; Formação de hidrogel derivado da matriz descelularizado por meio de tratamento com pepsina.	Cultura <i>in vitro</i> de mioblastos e células do músculo esquelético liso; Infiltração por progenitores musculares e células endoteliais após injeção <i>in vivo</i> do hidrogel.	O hidrogel sob injeção <i>in vivo</i> sofreu processo de gelificação gerando uma matriz fibrosa; Quando aplicado a um modelo murino de lesão por isquemia da pata traseira foi capaz de aumentar a densidade arteriolar assim com da densidade de células endoteliais e aumentou a infiltração por células musculares proliferativas.	DEQUACH, LIN e CAM, 2012
Ratos Lewis	Músculo tibial anterior.	Procedimento de congelamento e degelo seguido por banho em água deionizada (por 72h); 0.15% tripsina (temperatura ambiente por 1h); 0.3% Triton X-100 com 2% hidróxido de amônia; Lavagem com PBS.	Reparo <i>in vivo</i> de modelo de perda muscular volumosa com a matriz acelular.	Integração do biomaterial ao tecido do animal transplantado com presença de neovascularização.	WU et al., 2012
Como o anterior	Latissimo do dorso	Como o anterior	Como o anterior	Completa integração do <i>scaffold</i> com o tecido do animal transplantado em 8 semanas após o procedimento com presença de	CHEN e WALTERS, 2013

				<p>neovascularização em toda a extensão do biomaterial com células provenientes do músculo circundante;</p> <p>Infiltração limitada de fibras musculares no <i>scaffold</i> na oitava semana;</p> <p>Recuperação funcional devido o preenchimento da lesão.</p>	
Como o anterior	Músculo tibial anterior.	Como o anterior.	<p>Ensaio de proliferação <i>in vitro</i> com células satélite de ratos;</p> <p>Reparo <i>in vivo</i> de modelo de perda muscular volumosa com a matriz acelular seguido por injeção de células-tronco da medula óssea <i>in situ</i> após 7 dias do procedimento de implante da matriz.</p>	<p>Pequenas fibras musculares observadas no biomaterial após dois meses do procedimento;</p> <p>Regeneração miogênica não foi observada até seis meses pós-transplante, contudo foi observado estabelecimento de infiltração adipogênica nesse período;</p> <p>Tecíduo fibrotico foi observado no grupo tratado com biomaterial assim como naqueles que além do biomaterial receberam a injeção de células-tronco. O tecido fibroso foi responsável pela recuperação funcional prematuramente observada que não se sustentou após seis meses após o tratamento.</p>	CORONA et al., 2013

Gamba et al (2002) desenvolveram um biomaterial acelular derivado de diafragmas de ratos que foram utilizados para o tratamento de modelos de defeito da parede abdominal. Após 40 dias, o biomaterial implantado mostrou sinais de neovascularização que persistiu até 90 dias após o transplante. Contudo, a infiltração de células musculares não foi observada e a matriz descelularizada foi substituída por tecido fibroso. Esse trabalho respondeu a questão se biomateriais proveniente de músculo descelularizado possuem a capacidade de gerar *in vivo* a formação de novos vasos sanguíneos. Contudo mais perguntas emergiram tais como por que não foi observada infiltração de células musculares e como a substituição do biomaterial por tecido fibroso poderia ser evitada.

Com o intuito de melhorar os resultados do trabalho supracitado Conconi et al (2005) utilizaram uma matriz acelular de músculo pré-cultivada com mioblastos autólogos para o tratamento de modelos de defeitos da parede abdominal. Os animais que tiveram seu defeito muscular tratados apenas com a matriz descelularizada tiveram o biomaterial completamente substituído por tecido fibroso dentro do primeiro mês pós-tratamento. Contudo nos animais tratados com a matriz pré-cultivada com mioblastos foi observada uma integração entre o tecido do hospedeiro e o biomaterial, assim como, neovascularização, atividade elétrica e presença de fusão celular até o segundo mês após o transplante. Vale salientar que o implante manteve sua integridade até o segundo mês após o transplante apresentando decréscimo em sua atividade elétrica e substituição por tecido adiposo no terceiro mês provavelmente devido a um desequilíbrio entre a necessidade celular por oxigênio e o processo de surgimento de novos vasos.

A incapacidade de avaliar a origem das células presentes no biomaterial no trabalho anterior levou esse grupo a desenvolver novos estudos (COPPI et al., 2006). Como no trabalho anterior uma matriz muscular acelular pré-cultivada com mioblastos foi usada para tratar defeitos da musculatura da parede abdominal. Os mioblastos foram coletados de ratos machos e todo o processo de reparo do defeito muscular foi desenvolvido em ratos do sexo feminino, desse modo os autores foram capazes de discernir a origem das células por meio da expressão do gene SrY (do inglês, *sex-determining region Y*). Os dois estudos mostraram que a metodologia empregada foi capaz de gerar uma completa integração do tecido do hospedeiro com o biomaterial ao garantir o crescimento de vasos sanguíneos e fibras musculares. Contudo o último trabalho apresentou uma manutenção da integridade

do biomaterial por um maior período de tempo (até o nono mês após o transplante) e apresentou uma disposição longitudinal das fibras musculares. A análise da expressão do gene SrY mostrou que as células pré-cultivadas contribuíram no processo de regeneração muscular visto que sua expressão foi observada desde o primeiro até o nono mês após o transplante. Esses dados mostram que o uso apenas da matriz muscular acelular para a regeneração de lesões não é uma metodologia eficiente e que o uso desse biomaterial pré-cultivado com células isoladas é mais efetivo sendo capaz de regenerar a atividade elétrica do tecido danificado.

Enquanto isso, Borschel, Dennis e Kuzon (2004) foram capazes de prever algum dos resultados dos trabalhos anteriores avaliando o processo de recelularização *in vitro* de uma matriz acelular de músculo com mioblastos C2C12. O biomaterial recuperou de forma parcial a capacidade contrátil observada em músculos *in natura* após ser recelularizado com mioblastos essa recuperação não foi completa possivelmente devido à incompletude do processo de recelularização. Essa recuperação foi acompanhada de fusão celular fornecendo suporte a ideia de que a matriz foi capaz de determinar o processo de diferenciação celular.

Com o intuito de avaliar se a matriz descelularizada de músculo poderia ser aplicada na regeneração de perdas musculares volumétricas (VML, do inglês, *Volumetric Muscle Loss*), Merritt et al. (2010b) transplantaram ME descelularizada do músculo gastrocnêmico de ratos Lewis para contrapartes com grandes defeitos musculares cirurgicamente gerados nesse músculo. Foi observada uma crescente infiltração de miofibras e células endoteliais após 14 e 42 dias após o transplante, embora esse processo tenha sido restrito a área adjacente as suturas do biomaterial ao tecido do hospedeiro. Enquanto uma recuperação estética foi observada no músculo tratado está não foi correlacionada a uma recuperação funcional, pois não foi observada uma melhora significativa da força contrátil do constructo. Nesse trabalho, em contraste com os anteriores, os autores foram capazes de desenvolver uma metodologia de reparo de lesão muscular baseada em matriz descelularizada de músculo, sem o pré-cultivo de células nesse *scaffold*, que foi capaz de sustentar infiltração de células musculares apesar de esta ter sido restrita as áreas periféricas do biomaterial. Uma explicação para esse resultado diferente pode ser contabilizada uma maior preservação das características da ME nesse trabalho, devido a uma técnica de descelularização presumivelmente mais branda que a empregada em

trabalhos anteriores. Para melhorar a recuperação de VML. Merritt et al. (2010a), em um outro trabalho, injetaram células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs, do inglês, *bone-marrow-derived mesenchymal stem cells*) na matriz descelularizada de músculo após uma semana do processo de transplante em um modelo murino. Enquanto o trabalho anterior desse grupo não mostrou uma recuperação funcional significativa, a injeção de BMSCs de fato melhorou a força contrátil máxima do músculo tratado após 42 dias. Como anteriormente observado, o repovoamento celular ocorreu no grupo que recebeu apenas a matriz já o grupo que recebeu a injeção de BMSCs teve um maior número de células musculares e endoteliais em comparação com o grupo anterior. De forma semelhante ao trabalho anterior desse grupo a região medial do biomaterial possuía uma menor presença de células quando comparada com a região periférica, mesmo esses números sendo maiores que no grupo tratado apenas com a matriz sem receber as CTs. Essa diferente densidade celular com relação a área analisada do biomaterial decorre presumivelmente pela dificuldade de difusão de oxigênio e nutrientes para a região medial do *scaffold*, visto que o processo de neovascularização ainda não se mostra completo. Em resumo, esses dados indicam que o tratamento de VML com ME descelularizada oriunda de tecido muscular em associação com a terapia celular é uma metodologia factível para a recuperação funcional de lesões desse tecido. Outros estudos analisaram a aplicabilidade dessa metodologia com diferentes músculos como latíssimo do dorso (CHEN e WALTERS, 2013) e tibial anterior (WU et al., 2012; CORONA et al., 2013).

Comumente os protocolos para descelularização de tecidos são baseados no uso de detergentes e enzimas proteolíticas. Contudo, o emprego desses agentes está relacionado a perda de constituintes da ME desse modo uma metodologia menos drástica é desejável. Objetivando solucionar esse problema, Gillies et al. (2010) desenvolveram um protocolo de descelularização de tecido muscular sem o emprego de detergentes ou enzimas. Esse protocolo se valia do uso de toxinas que agiam de forma específica na desestruturação do citoesqueleto, e como esperado, o protocolo foi minimamente agressivo a ME, visto que seus maiores constituintes como colágeno e glicosaminoglicanas foram preservados. Além disso, o biomaterial assim obtido foi capaz de suportar, *in vitro*, proliferação celular demonstrando sua biocompatibilidade.

Perniconi et al. (2011) tentaram uma metodologia arrojada para a regeneração celular. Esse grupo usou um protocolo para a descelularização de um músculo inteiro, enquanto os estudos até o momento haviam lidado apenas com porções desse tecido. O biomaterial obtido foi transplantado em camundongos sendo observada infiltração celular após duas semanas do procedimento. A infiltração celular não foi restrita a periferia do biomaterial e eram compostas por células imunogênicas e miogênicas, estas sendo capazes de gerar miofibras. Para melhorar a recuperação pós-cirúrgica do modelo foi administrado um tratamento imunossupressivo. Como resultado, a sobrevivência das miofibras foi estendida para quatro semanas após o transplante contrastando com as duas semanas de sobrevivência observada sem a administração do fármaco. Além disso, a infiltração de células imunogênicas foi diminuída acompanhada pela formação de novas miofibras nas regiões proximal e distal do músculo. Esses dados reafirmam a validade da aplicação de biomateriais derivados da descelularização de tecido muscular na regeneração desse tecido.

Outra estratégia para o uso de tecidos descelularizados como biomateriais consiste na transformação desse material em um hidrogel que pode ser diretamente aplicado na área danificada (FREYTES et al., 2008; SINGELYN et al., 2009; SEIF-NARAGHI et al., 2010; YOUNG et al., 2011; WOLF et al., 2012; SAWKINS et al., 2013). DeQuach et al. (2012) desenvolveram um hidrogel derivado de tecido muscular esquelético descelularizado, que era capaz de sustentar e favorecer a proliferação de mioblastos e células da musculatura lisa *in vitro*. Quando o hidrogel foi aplicado *in vivo* por meio de injeção ele sofria um processo de gelificação originando uma matriz fibrosa. Esse material foi aplicado em um modelo murino de isquemia da pata traseira e foi observado um aumento na densidade arteriolar bem como da densidade das células endoteliais na área de aplicação. Também foi observado que a matriz era capaz de recrutar células musculares proliferativas, contudo apenas uma pequena fração delas eram progenitores de músculo esquelético. Esse trabalho provou que a ME muscular retém sua bem documentada capacidade de regeneração endotelial e muscular quando apresentada na forma de hidrogel e que pode ser usada no tratamento tanto na perda muscular e vascular observada em processo isquêmico.

A ME descelularizada de músculo é um biomaterial que possui todos os pré-requisitos para regeneração muscular. Primeiramente ele pode sustentar a

proliferação de células musculares e endoteliais sendo capaz de recrutar progenitores imunológicos para o local da regeneração enquanto fornece sinais químicos e espaciais para essas células entrarem em processo de diferenciação. É importante frisar que a ME descelularizada de músculo é um material biodegradável e não tóxico que mantém a organização 3D nativa do músculo levando as células a se organizarem em uma disposição funcional adequada. Contudo apesar dos resultados empolgantes encontrados pelos trabalhos anteriores com matriz descelularizada de músculo um grande problema a ser resolvido consiste na incapacidade de manutenção do enxerto de ME *in vivo* por um longo período de tempo sem a necessidade de terapia imunossupressora que possui elevado risco para o paciente.

Logo, o presente trabalho visa estabelecer um protocolo de descelularização de tecido muscular esquelético de ratos Wistar que seja eficaz visto que como visto na tabela II os trabalhos na área até o presente momento não conseguiu desenvolver um protocolo capaz de produzir um biomaterial que de fato consiga sustentar a regeneração muscular. Grande parte dessa incapacidade está relacionada à rejeição do enxerto por resquícios celulares no *scaffold*. Dessa forma, almeja-se desenvolver um protocolo de descelularização que elimine as células do músculo esquelético preservando sua estrutura química e estrutural. Portanto, o protocolo aqui desenvolvido será uma base para o desenvolvimento de novas pesquisas.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer um protocolo de descelularização de tecido muscular esquelético de ratos Wistar gerando um biomaterial adequado para estudos de engenharia tecidual.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Produzir um scaffold baseado em descelularização de tecido muscular esquelético de ratos mantendo a composição química e estrutural do tecido in natura, porém com a eliminação de células.
- Padronizar a técnica de descelularização pela avaliação da quantidade de DNA da amostra e da presença de células utilizando técnicas histológicas;

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MODELOS ANIMAIS**

Os animais utilizados nos experimentos foram fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e todos os procedimentos utilizados estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) como foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF segundo o protocolo n°033/2014.

### **3.2 EXTRAÇÃO DOS MÚSCULOS**

A eutanásia dos ratos Wistar para a extração dos músculos foi realizada imediatamente após a sua chegada ao laboratório, não sendo mantido, portanto, em biotério sob nossa responsabilidade.

Ratos Wistar machos com 60 dias de vida pesando aproximadamente 200 g foram divididos em 3 grupos (n=5) e eutanasiados por meio da aplicação de injeção intra-peritoneal de 90 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina (BUITRAGO et al., 2008) seguida por perfuração do diafragma. Posteriormente à constatação da eutanásia os ratos tiveram seus músculos quadríceps femoral, de ambas as patas, removidos cirurgicamente para posterior realização do protocolo de descclularização das amostras biológicas.

O primeiro grupo de músculos dos 5 ratos não foi submetido ao processo de descclularização servindo como grupo controle negativo para as comparações histológicas e de quantificação de DNA.

Os outros grupos de músculos dos 10 ratos restantes passaram pelo processo de descclularização. Sendo que um dos grupos de músculos de 5 ratos foi destinado a caracterização histológica e quantificação de DNA.

### **3.3 DESCCLULARIZAÇÃO**

Com o intuito de desenvolver um protocolo de descelularização eficiente do tecido muscular esquelético a metodologia aplicada foi baseada nas metodologias de Stern et al. (2009), DeQuach et al. (2012) e Wolf et al. (2012).

Resumidamente, após extração os músculos foram lavados quatro vezes em solução de soro fisiológico estéril com 1% (v/v) de solução comercial de antibióticos (penicilina + estreptomicina 10000 U/mL) ficando o tecido em contato com a solução por 15 min durante cada lavagem. Em seguida os músculos foram congelados a -80°C para posterior corte em fatias de aproximadamente 2,25 mm de espessura. O material foi então lavado de 3 a 4 vezes em água destilada com 1% (v/v) de solução comercial de antibióticos (penicilina + estreptomicina 10000 U/mL) ficando o tecido em contato com a solução por 15 min durante cada lavagem. Após essa etapa o tecido foi irradiado com luz UV por 20 min em cada face do material. Após a irradiação todo o protocolo foi realizado em fluxo laminar Termo 1300 Série A2 com o uso de soluções estéreis. O tecido foi então digerido em uma solução de tripsina 0,05% contendo 0,2% de EDTA pH 7,6 por 2h a 37°C. Em seguida o tecido sofreu banhos, sob refrigeração, em solução de SDS 1% (p/v) por 4 a 5 dias com trocas diárias da solução. O material foi submetido a uma lavagem de 2 dias, com trocas diárias da solução, em água destilada com 1% (v/v) de solução comercial de antibióticos (penicilina + estreptomicina 10000 U/mL) sob refrigeração. Finalmente, o biomaterial assim obtido foi utilizado imediatamente para as subseqüentes análises.

### **3.4 DETERMINAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO**

Os critérios para descelularização foram definidos conforme Wolf et al. (2012): conteúdo de DNA menor que 0.05 ng de DNA dupla fita por mg da matriz; resíduos de DNA devem ser constituídos de fragmentos menores que 200 pares de base; e ausência de estruturas nucleares após coloração com 4,6 diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Para detecção dos núcleos as amostras foram fixadas em 10% (v/v) formalina tamponada. As amostras fixadas foram então inclusas em parafina e seccionadas com micrótomo e posteriormente coradas com DAPI para análise microscópica em microscópio confocal Leica TCS SP5 II.

Matrizes não fixadas foram usadas para a quantificação de DNA. Para tanto as amostras de tecidos foram maceradas, com o auxílio de cadinho e pistilo, em nitrogênio líquido obtendo um pó fino. O pó foi então pesado e 0,05 g dele foi adicionado a 500 µL de tampão de lise [10mM Tris-HCl + 0,1M EDTA + 0,5% SDS, pH 8,0] sendo incubado em banho-maria a 37°C por 1h. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de proteinase K (10mg/mL) à suspensão de tecido a qual foi incubada a 55°C por 3h até a completa digestão do tecido. O lisado foi submetido a extração de DNA por meio da adição de 1 volume de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (proporção 25:24:1) e subsequente centrifugação a 1300 RPM por 5 min. O sobrenadante foi recolhido e submetido a uma nova extração com 1 volume de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (proporção 25:24:1) e subsequente centrifugação a 13000 RPM por 5 min. O sobrenadante da segunda extração foi recolhido e a ele foi adicionado 1 volume de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (proporção 24:1) com posterior centrifugação a 13000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi recolhido e adicionado a ele 0,2 volumes de solução de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol puro gelado que foi incubado em freezer -80°C por 5min para a precipitação do DNA. Em um segundo momento, o material foi centrifugado a 13000 RPM por 15 min sendo que o sobrenadante foi descartado ao final do processo. Ao precipitado foi adicionado 700 µL de etanol 70% gelado. A amostra foi então centrifugada a 13000 RPM por 5 min sendo que ao final o sobrenadante foi descartado. O precipitado obtido foi lavado com 700 µL de etanol 90% gelado sendo novamente centrifugado a 13000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado de DNA foi seco a temperatura ambiente *overnight*. As amostras de DNA foram diluídas em 50 µL de água ultrapura e incubadas em banho-maria a 37°C por 30 min. Finalmente as amostras foram estocadas em freezer até o uso para análises posteriores.

As amostras de DNA foram submetidas a quantificação por espectrometria com o uso do NanoDrop 2000 no comprimento de onda de 260 nm. Além disso, para observar a integridade do DNA extraído, uma eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) das amostras foi realizada.

### 3.5 ESTATÍSTICA

Para a avaliação estatística dos dados gerados e para a confecção dos gráficos o programa GraphPad Prism versão 5. O teste ANOVA seguido pelo teste t de Student paramétrico foram utilizados para a discriminação da diferença entre os dados gerados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DESCELULARIZAÇÃO

Após a execução do processo de descelularização foi possível observar uma progressiva modificação do tecido muscular que com o passar dos dias foi perdendo sua tonalidade vermelha característica da mioglobina e adquiriu um aspecto translúcido. Esse processo de perda de coloração ocorreu inicialmente na periferia do tecido e foi progredindo lentamente até as partes mais centrais do material como pode ser observado na Figura I.

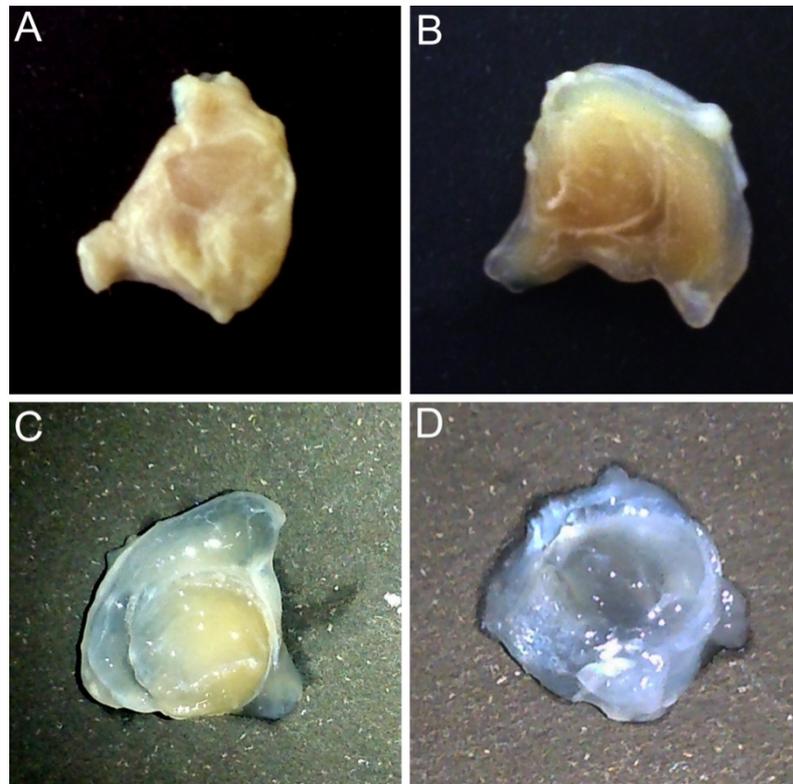


Figura I: Modificações macroscópicas observadas no músculo após processo de descelularização. A. Aspecto do músculo após etapa de digestão enzimática com tripsina; B. Início do processo de perda da coloração decorrido um dia de exposição à ação do detergente SDS 1% (v/v); C. Progressão da descoloração no terceiro dia de exposição à SDS 1% (v/v) e D. Descoloração total observada no quinto dia, e último, de exposição ao SDS 1% (v/v).

Para a confirmação da descelularização do músculo foi realizada a extração e quantificação do DNA tecidual. Como pode ser observado na Figura II a quantidade de DNA presente no controle, ou seja, no músculo *in natura*, encontra-se em média

a  $0,8 \pm 0,107$  ng de DNA por mg de material. Já após o processo de descelularização esse valor caiu para em média  $0,005 \pm 0,002$  ng de DNA por mg de tecido.

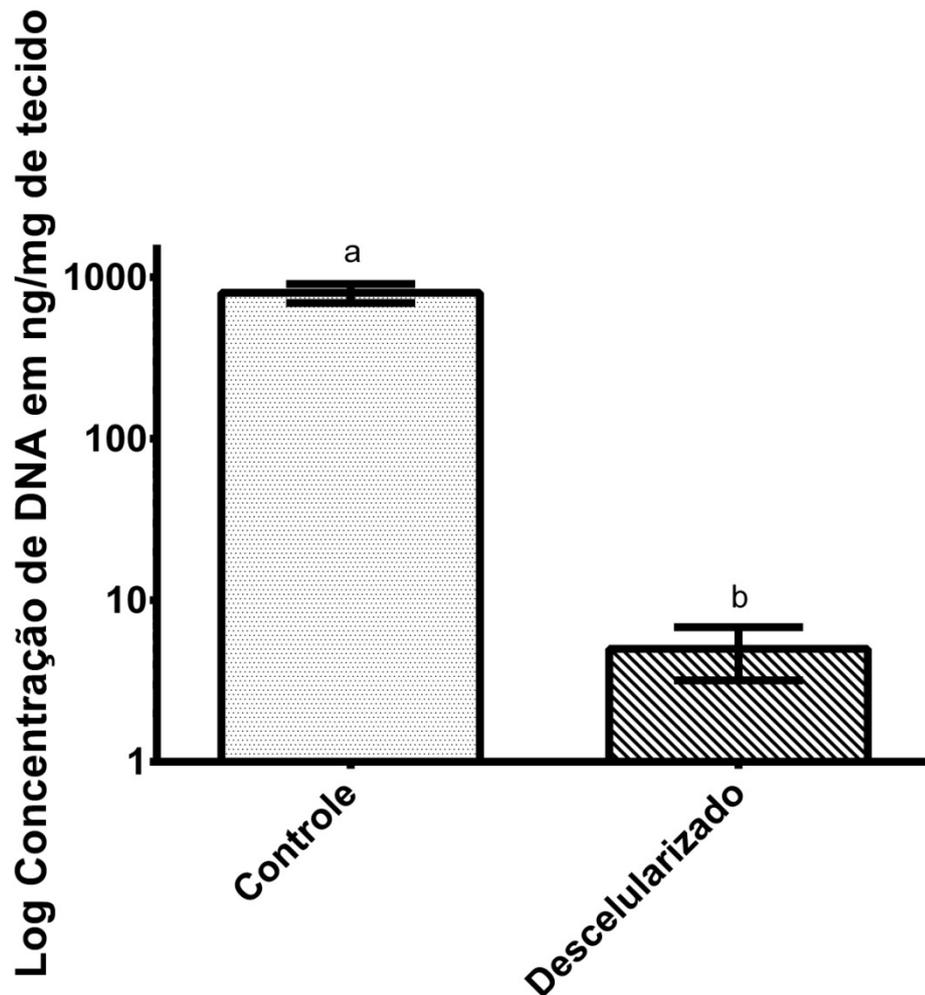


Figura II: Quantificação de DNA antes e depois do processo de descelularização do músculo de ratos. Concentração média no controle:  $0,8 \pm 0,107$  ng/mg. Concentração média no descelularizado:  $0,005 \pm 0,002$  ng/mg.  $p=0,0178$ . Segundo o teste t paramétrico não pareado.

Além da quantificação do DNA presente nas amostras de músculo de ratos, o material foi submetido a uma análise histológica com o corante DAPI em um microscópio confocal para a pesquisa da presença de núcleos. Como pode ser visto no corte transversal do músculo de rato representado na Figura III é possível observar a delimitação dos fascículos do músculo, com suas respectivas estruturas celulares, devido à auto-fluorescência do tecido quando exposto a luz ultravioleta. Além disso, pode ser observada a presença de núcleos na periferia das fibras musculares do tecido não descelularizado.

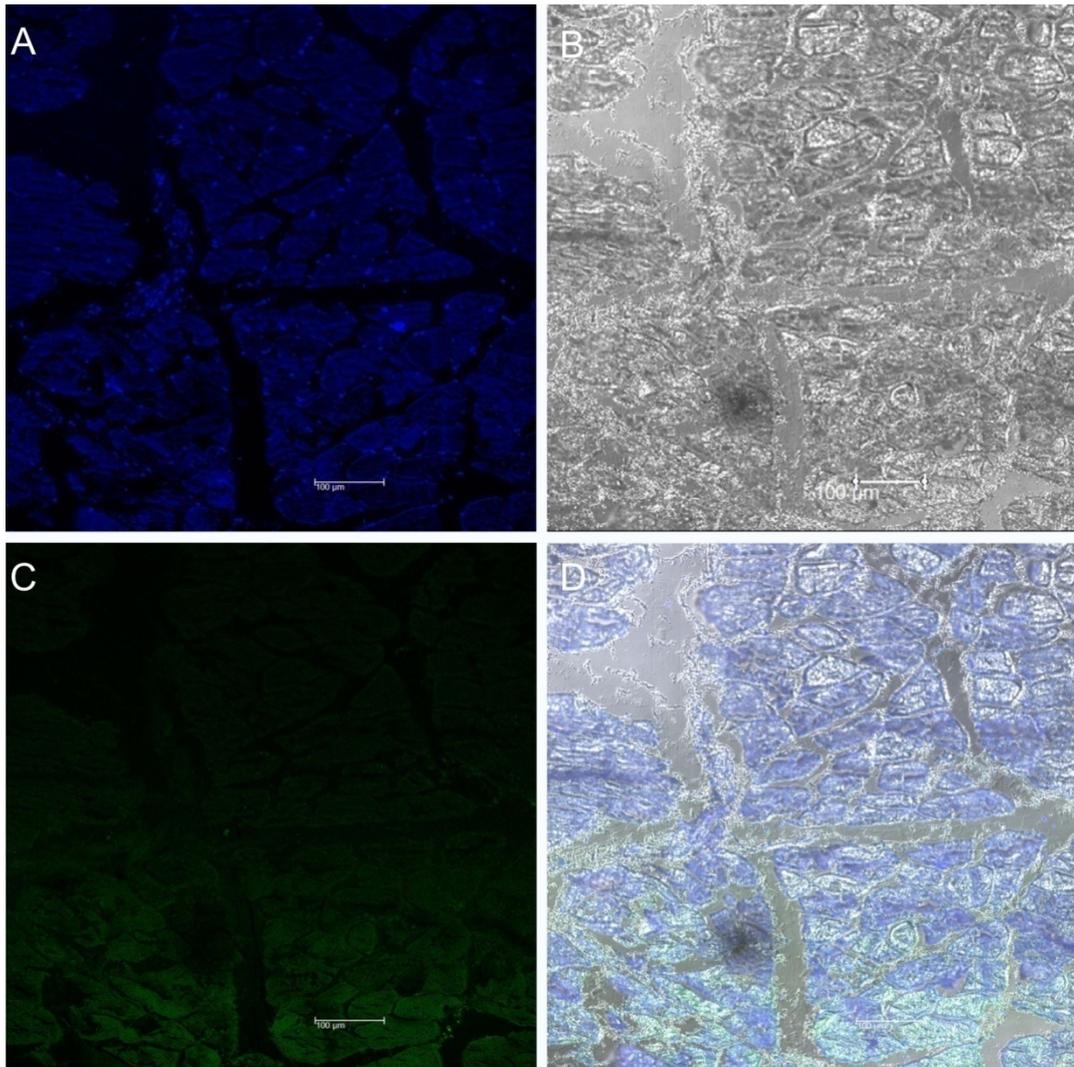


Figura III: Histologia de fluorescência do músculo de rato não descclularizado. Corte transversal com ampliação de 200 vezes. A. Coloração com DAPI (446nm-476nm) indicando a presença de núcleos na periferia das fibras musculares, além disso, é perceptível uma auto-fluorescência da matriz na faixa de comprimento de onda observado; B. Campo observado por meio de luz transmitida; C. Auto-fluorescência da matriz na faixa de 500nm-557nm, podemos observar a inexistência de estruturas nucleares nessa imagem provando a existência de auto-fluorescência da matriz estudada quando submetida à luz ultravioleta e D. Sobreposição das imagens A, B e C. Barra de 100 µm.

Por sua vez, o material descclularizado não apresenta estruturas nucleares nem celulares ao ser submetido a microscopia confocal como demonstrado na Figura IV. Pode-se observar apenas a delimitação dos fascículos sem a presença de estrutura celular devido a auto-fluorescência das proteínas da matriz extracelular do músculo de rato.

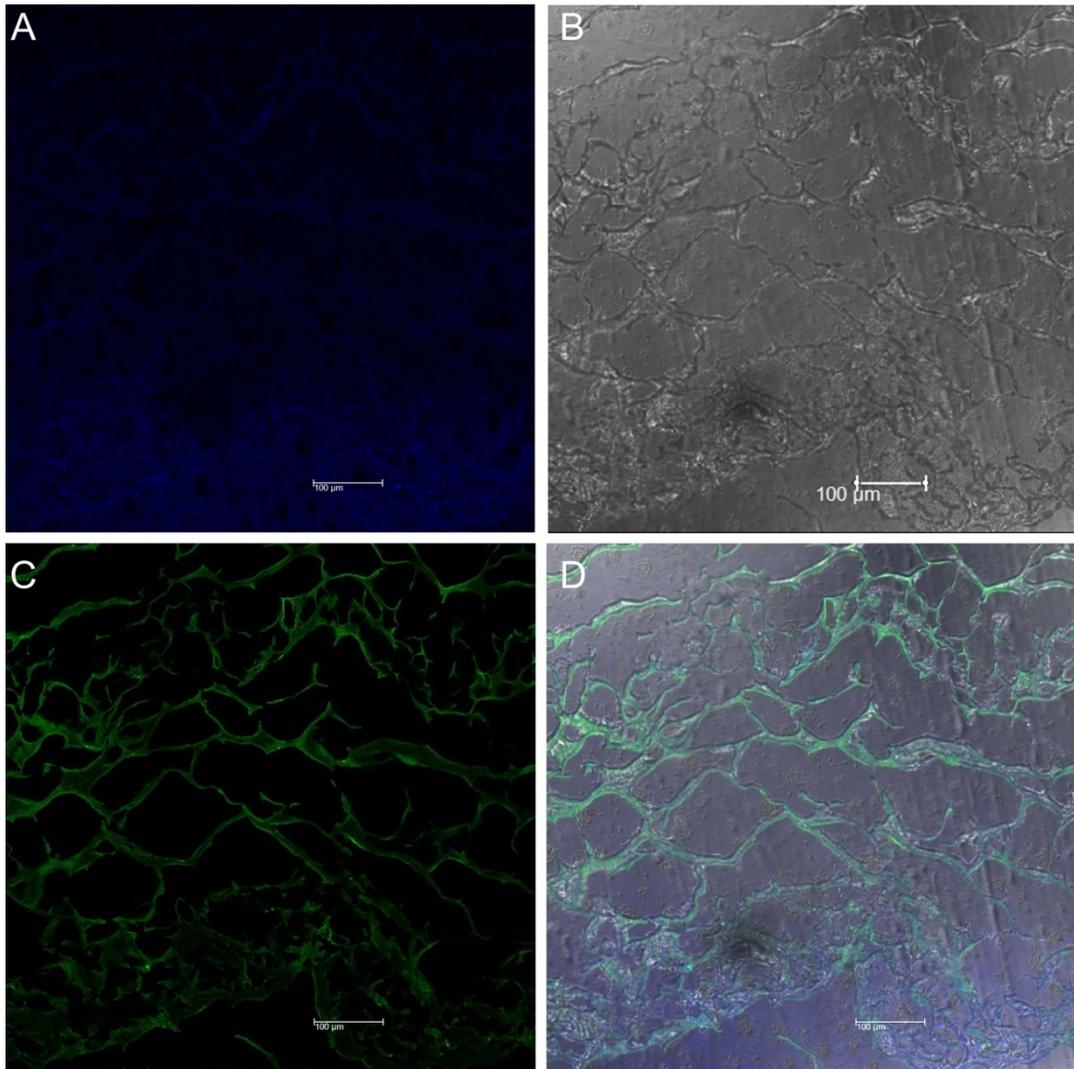


Figura IV: Histologia de fluorescência do músculo de rato descelularizado. Corte transversal com ampliação de 200 vezes. A. Coloração com DAPI (446nm-476nm) sem a presença de núcleos ou estrutura celulares, porém é perceptível apenas uma auto-fluorescência da matriz na faixa de comprimento de onda observado; B. Campo observado por meio de luz transmitida; C. Auto-fluorescência da matriz na faixa de 500nm-557nm, podemos observar a inexistência de estruturas nucleares nessa imagem provando a existência de auto-fluorescência da matriz estudada quando submetida à luz ultravioleta e D. Sobreposição das imagens A, B e C. Barra de 100 μm.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 DESCELULARIZAÇÃO

Assim como, Borschel, Dennis e Kuzonjr (2004) e Perniconi et. al. (2011), obtivemos um tecido descelularizado com aspecto translúcido e com uma coloração ligeiramente amarela clara, como pode ser visto na Figura I. Além disso, a perda da coloração avermelhada característica da mioglobina do tecido muscular foi progressivamente perdida com o passar dos dias sob ação de soluções de detergentes, presumivelmente devido ao processo de lise celular esperado durante o processo de descelularização. Pôde-se notar que esse processo de descelularização/perda de coloração ocorreu inicialmente na periferia do tecido e que só foi completado após o quinto dia sob ação de detergentes. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato da técnica de descelularização, empregado no presente trabalho, se valia da difusão das soluções pelo tecido, visto a inexistência de um sistema adequado para a perfusão das soluções o que teria diminuído significativamente o tempo requerido para a descelularização.

Os critérios para descelularização foram definidos conforme Wolf et al. (2012): conteúdo de DNA menor que 50ng de DNA dupla fita por mg da matriz; resíduos de DNA devem ser constituídos de fragmentos menores que 200 pares de base; e ausência de estruturas nucleares após coloração com 4,6 diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Desse modo, o protocolo de descelularização empregado no presente trabalho conseguiu se enquadrar nos requisitos de descelularização supracitados, visto que, não foi possível observar estruturas nucleares na coloração com DAPI nos músculos submetidos à descelularização. Além disso, a análise detida das Figuras III e IV nos permite verificar a manutenção da estrutura 3D da matriz extracelular dos músculos de ratos após serem submetidos ao processo de descelularização, visto que a auto-fluorescência do material nos comprimentos de ondas analisados revelam a permanência de uma estrutura com aspecto de treliça que visivelmente corresponde aos limites dos fascículos musculares. Tais estruturas em treliça foram observadas também no trabalho de Perniconi et. al. (2011) no qual por meio de imunofluorescência foram capazes de determinar a composição dessas fibras como

sendo formadas por fibronectina e laminina. Dessa forma, por inferência, postulamos que as estruturas visualizadas nesse trabalho também são compostas por tais proteínas.

O fato da quantidade de DNA por mg de tecido ter ficado em média abaixo de 0,005 ng/mg representa outro indicio que corrobora a descelularização do material. Esse valor representa uma diminuição de em média 99,0% da quantidade de DNA presente no tecido após o processo de descelularização. Essa diminuição do conteúdo de DNA encontra-se dentro da faixa obtida em trabalhos como o de Wolf et al. (2012) que obtiveram uma redução de 99,5% ( $7,42 \pm 1,67$  ng/mg de DNA na matriz para  $1549 \pm 489$  ng/mg de DNA no controle), porém era baseado em um protocolo bem mais complexo e agressivo que o utilizado nesse trabalho. Além disso, essa pequena diferença percentual pode ser contabilizada na metodologia diferenciada de extração e quantificação empregada nos dois trabalhos, bem como à diferença das espécies e porte dos animais dos quais os tecidos foram extraídos. GILLIES et al. (2010), utilizando um método inovador de descelularização de um músculo inteiro baseando-se na ação específicas de toxinas contra as fibras musculares foram capazes de obter uma quantidade de DNA de  $2,92 \pm 0,14$  µg/mg de tecido no material in natura e de  $0,12 \pm 0,01$  µg/mg de tecido no material descelularizado o que se encontra acima do valor de 0,05 ng/mg estipulado. Provavelmente essa incapacidade de atingir a redução no conteúdo de DNA estipulado tem como origem a dificuldade de difusão de soluções em um músculo inteiro levando a uma incompleta descelularização e remoção das estruturas macromoleculares indesejadas do tecido. Desse modo, apesar do trabalho supracitado ser considerado o único que realmente desenvolveu um método eficaz para a descelularização de porções grandes de músculo quando este é analisado sob a óptica atual percebe-se que na realidade ainda precisamos de uma estratégia eficaz para conseguir superar a barreira prática imposta pela difusão. Desse modo enquanto essa barreira não for rompida a utilização prática de matriz descelularizada de músculo ficará restrita à regeneração de lesões pequenas em modelos animais.

## 6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o presente trabalho conseguiu produzir uma matriz descelularizada de músculo esquelético de ratos Wistar com níveis ideais para o processo de recelularização. Além disso, o presente trabalho representa um avanço na técnica de descelularização de músculo esquelético, pois, utilizando um protocolo simples, foi capaz de alcançar níveis de descelularização maiores que os descritos na literatura mantendo a estrutura 3D do tecido. Porém mais estudos são necessários para a melhor caracterizar os efeitos dessa matriz. Desse modo, temos como perspectiva futuras cultivar as células tronco mesenquimais da polpa dentária humana sob o biomaterial com o intuito de observar possíveis modificações morfológica nessas células ao entrarem em contato com a matriz e avaliar a capacidade de repopulação dessa matriz por esse tipo celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. 2008. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**. **20(2): 86-100**.

AVISS, K.; GOUGH, J.; DOWNES, S. 2010. Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. **European cells & materials**. **13(19): 193-204**.

BACH, A.; BEIER, J.; STERN-STAETER, J.; HORCH, R. 2004. Skeletal muscle tissue engineering. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. **8(4): 413-422**.

BEIER, J.P.; KLUMPP, D.; RUDISILE, M.; DERSCH, R.; WENDORFF, J.H.; BLEIZIFFER, O.; ARKUDAS, A.; POLYKANDRIOTIS, E.; HORCH, R.E.; KNESER, U. 2009. Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle. **BMC biotechnology**. **9(34): 1-14**.

BENTZINGER, C.; WANG, Y.; VON MALTZAHN, J.; RUDNICKI, M. 2013. The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies. **Bioessays**. **35(3): 231-241**.

BHAT, S.; KUMAR, A. 2012. Biomaterials in regenerative medicine. **Journal of Postgraduate Medicine Education Research**. **46(2): 81-89**.

BIAN, W.; BURSAC, N. 2009. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture. **Biomaterials**. **30(7): 1401-1412**.

BIAN, W.; LIAU, B.; BADIE, N.; BURSAC, N. 2009. Mesoscopic hydrogel molding to control the 3D geometry of bioartificial muscle tissues. **Nature protocols**. **4(10): 1522-1534**.

BOLDRIN, L.; ELVASSORE, N.; MALERBA, A.; FLAIBANI, M.; CIMETTA, E.; PICCOLI, M.; BARONI, M.D.; GAZZOLA, M.V.; MESSINA, C.; GAMBA, P.; VITIELLO, L.; DE COPPI, P. 2007. Satellite cells delivered by micro-patterned scaffolds: a new strategy for cell transplantation in muscle diseases. **Tissue engineering**. **13(2): 253-262**.

BORSCHEL, G.; DENNIS, R.; KUZONJR, W. 2004. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. **Plastic and Reconstructive Surgery**. **113(2): 595-602**.

BORSELLI, C.; CEZAR, C.; SHVARTSMAN, D.; VANDENBURGH, H.; MOONEY D. 2011. The role of multifunctional delivery scaffold in the ability of cultured myoblasts to promote muscle regeneration. **Biomaterials**. **32(34): 8905-8914**.

BORSELLI, C.; STORRIE, H.; BENESCH-LEE, F.; SHVARTSMAN, D.; CEZAR, C.; LICHTMAN, J.W.; VANDENBURGH, H.H.; MOONEY, D.J. 2010. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. **107(8): 3287-3292**.

BREULS, R.; JIYA, T.; SMIT, T. 2008. Scaffold stiffness influences cell behavior: opportunities: for skeletal tissue engineering. **The Open Orthopaedics Journal**. **2(1): 103-109**.

BUITRAGO, S.; MARTIN, T.E.; TETENS-WOODRING, J.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; WILDING G.E. 2008. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. **47(1): 11-17**.

CARLSON, E.C.; CARLSON, B.M. 1991. A method for preparing skeletal muscle fiber basallaminae. **The Anatomical Record**. **230(1): 325-331**.

CARVALHO, J.L.; CARVALHO, P.H.; GOMES, D.A.; GOES, A.M. 2012. Characterization of decellularized heart matrices as biomaterials for regular and whole organ tissue engineering and initial in-vitro recellularization with ips cells. **Journal of Tissue Science & Engineering**. **s11(002): 1-5**.

CHEN, M.C.; SUN, Y.C.; CHEN, Y.H. 2013. Electrically conductive nanofibers with highly oriented structures and their potential application in skeletal muscle tissue engineering. **Actabiomaterialia**. **9(3): 35562-5572**.

CHEN, X.; WALTERS, T. 2013. Muscle-derived decellularised extracellular matrix improves functional recovery in a rat latissimusdorsi muscle defect model. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**. **66(12): 1750-1758**.

CHOI, J.; KIM, J.; YOON, H.; CHO, Y. 2012. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. **Tissue Engineering Part A**. **19(3-4): 329-339**.

CHOI, J.S.; LEE, S.J.; CHRIST, G.J.; ATALA, A.; YOO, J.J. 2008. The influence of electrospun aligned poly ( $\epsilon$  -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. **Biomaterials**. **29(19): 2899-2906**.

CHUA, C.; TAN, L.; AN, J. 2013. Advanced nanobiomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. **Nanomedicine**. **8(4): 501-503**.

CONCONI, M.T.; DE COPPI, P.; BELLINI, S.; ZARA, G.; SABATTI, M.; MARZARO, M.; ZANON, G.F.; GAMBA, P.G.; PARNIGOTTO, P.P.; NUSSDORFER, G.G. 2005. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. **Biomaterials**. **26(15): 2567-2574**.

CORONA, B.T.; WU, X.; WARD, C.L.; MCDANIEL, J.S.; RATHBONE, C.R.; 2013. The promotion of a functional fibrosis in skeletal muscle with volumetric muscle loss injury following the transplantation of muscle-ECM. **Biomaterials**. **34(13): 3324-3335**.

CORREIA, S.I.; PEREIRA, H.; SILVA-CORREIA, J.; VAN DIJK, C.N.; ESPREGUEIRA-MENDES, J.; OLIVEIRA, J.M.; REIS, R.L. 2013. Current concepts:

tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. **Journal of The Royal Society Interface.** **11(92): 1-20.**

CRAPO, P.; GILBERT, T.; BADYLAK, S. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials.** **32(12): 3233-3243.**

DE COPPI, P.; BELLINI, S.; CONCONI, M.T.; SABATTI, M.; SIMONATO, E.; GAMBA, P.G.; NUSSDORFER, G.G.; PARNIGOTTO, P.P. 2006. Myoblast-acellular skeletal muscle matrix constructs guarantee a long-term repair of experimental full-thickness abdominal wall defects. **Tissue engineering.** **12(7): 1929-1936.**

DEQUACH, J.; LIN, J.; CAM, C. 2012. Injectable skeletal muscle matrix hydrogel promotes neovascularization and muscle cell infiltration in a hindlimb ischemia model. **European Cells and Materials.** **23(1): 400-412.**

DEQUACH, J.A.; MEZZANO, V.; MIGLANI, A.; LANGE, S.; KELLER, G.M.; SHEIKH F.; CHRISTMAN, K.L. 2010. Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture. **PloSone.** **5(9): e13039.**

ELLIOTT, M.J.; DE COPPI, P.; SPEGGIORIN, S.; ROEBUCK, D.; BUTLER, C.R.; SAMUEL, E.; CROWLEY, C.; MCLAREN, C.; FIERENS, A.; VONDRYS, D.; COCHRANE, L.; JEPHSON, C.; JANES, S.; BEAUMONT, N.J.; COGAN, T.; BADER, A.; SEIFALIAN, A.M.; HSUAN, J.J.; LOWDELL, M.; W.; BIRCHALL, M.A. 2012. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. **The Lancet.** **380(9846): 994-1000.**

FISHMAN, J.; ANSARI, T.; SIBBONS, P.; DECOPPI, P.; BIRCHALL, M. 2012. Decellularized rabbit cricoarytenoiddorsalis muscle for laryngeal regeneration. **Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology.** **121(2): 129-138.**

FREYTES, D.; MARTIN, J.; VELANKAR, S.; LEE, A.; BADYLAK, S. 2008. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. **Biomaterials.** **29(11): 1630-1637.**

FRÖHLICH, M.; GRAYSON, W.L.; MAROLT, D.; GIMBLE, J.M.; KREGAR-VELIKONJA, N.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2009. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. **Tissue Engineering Part A.** **16(1): 179-189.**

FUOCO, C.; SALVATORI, M.L.; BIONDO, A.; SHAPIRA-SCHWEITZER, K.; SANTOLERI, S.; ANTONINI, S.; BERNARDINI, S.; TEDESCO, F.S.; CANNATA, S.; SELIKTAR, D.; COSSU, G.; GARGIOLI, C. 2012. Injectable polyethylene glycol-fibrinogen hydrogel adjuvant improves survival and differentiation of transplanted mesoangioblasts in acute and chronic skeletal-muscle degeneration. **Skeletal Muscle.** **2(1): 1-14.**

GAMBA, P.G.; CONCONI, M.T.; LO PICCOLO, R.; ZARA, G.; SPINAZZI, R.; PARNIGOTTO, P.P. 2002. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. **Pediatric Surgery International.** **18(5-6): 327-331.**

GILBERT, P.M.; HAVENSTRITE, K.L.; MAGNUSSON, K.E.G.; SACCO, A.; LEONARDI, N.A.; KRAFT, P.; NGUYEN, N.K.; THRUN, S.; LUTOLF, M.P.; BLAU, H.M. 2010. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. **Science**. **329(5995): 1078-1081**.

GILBERT, T. 2012. Strategies for tissue and organ decellularization. **Journal of Cellular Biochemistry**. **113(7): 2217-2222**.

GILLIES A.; SMITH, L.; LIEBER, R.; VARGHESE, S. 2010. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes. **Tissue Engineering Part C: Methods**. **17(4): 383-389**.

GILLIES, A.; LIEBER, R. 2011. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. **Muscle & nerve**. **44(3): 318-331**.

GONZALEZ-ANDRADES, M.; DE LA CRUZ CARDONA, J.; IONESCU, A.M.; CAMPOS, A.; DEL MAR PEREZ, M.; ALAMINOS, M. 2011. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. **52(1): 215-222**.

HASHIMOTO, Y.; FUNAMOTO, S.; KIMURA, T.; NAM, K.; FUJISATO, T.; KISHIDA, A. 2011. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomaterials**. **32(29): 7060-7067**.

HE, M.; CALLANAN, A. 2012. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. **Tissue Engineering Part B: Reviews**. **19(3): 194-208**.

HILL, E.; BOONTHEEKUL, T.; MOONEY, D.J. 2006. Regulating activation of transplanted cells controls tissue regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. **103(8): 2494-2499**.

HUANG, N.F.; LEE, R.J.; LI, S. 2010. Engineering of aligned skeletal muscle by micropatterning. **American Journal of Translational Research**. **2(1): 43-55**.

JÄRVINEN, T. A.; JÄRVINEN, T. L.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. 2005. Muscle injuries biology and treatment. **The American Journal of Sports Medicine**. **33(5): 745-764**.

KARP, J.; LANGER, R. 2007. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. **Current Opinion in Biotechnology**. **18(5): 454-459**.

KASOJU, N.; KUBIES, D.; KUMOREK M.M.; KŘÍŽ, J.; FÁBRYOVÁ, E.; MACHOVÁ, L.; KOVÁŘOVÁ, J.; RYPÁČEK, F. 2014. Dip TIPS as a facile and versatile method for fabrication of polymer foams with controlled shape, size and pore architecture for bioengineering applications. **PloSone**. **9(10): e108792**.

KROEHNE, V.; HESCHEL, I.; SCHÜGNER, F.; LASRICH, D.; BARTSCH, J.; JOCKUSCH, H. 2008. Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for

muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. **Journal of cellular and molecular medicine.** **12(5a): 1640-1648.**

LE, X.; POINERN, G.; ALI, N.; BERRY, C.; FAWCETT, D. 2013. Engineering a biocompatible scaffold with either micrometre or nanometre scale surface topography for promoting protein adsorption and cellular response. **International Journal of Biomaterials.** **2013(2013): 1-16.**

LEVENBERG, S.; ROUWKEMA, J.; MACDONALD, M.; GARFEIN, E.S.; KOHANE, D.S.; DARLAND, D.C.; MARINI, R.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; MULLIGAN, R.C.; D'AMORE, P.A.; LANGER R. 2005. **Nature biotechnology.** **23(7): 879-884.**

LISI, A; BRIGANTI, E.; LEDDA, M.; LOSI, P.; GRIMALDI, S.; MARCHESE, R.; SOLDANI, G. 2012. **PloSone.** **7(4): e34284.**

LU T.G.; LIN, B.; KIM, J.; SULLIVAN, M.; TOBITA, K.; SALAMA, G.; YANG, L. 2013. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. **Nature communications.** **4(2307).**

MA, J.; HOLDEN, K.; ZHU, J.; PAN, H.; LI, Y. 2011. The application of three-dimensional collagen-scaffolds seeded with myoblasts to repair skeletal muscle defects. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** **2011(1): 1-9.**

MACCHIARINI, P.; JUNGEBLUTH, P.; GO, T.; ASNAGHI, M.A.; REES, L.E.; COGAN, T.A.; DODSON, A. MARTORELL, J.; BELLINI, S.; PARNIGOTTO, P.P.; DICKINSON, S.C.; HOLLANDER, A.P.; MANTERO, S.; CONCONI, M.T.; BIRCHALL, M.A. 2008. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **Lancet.** **372(9655): 2023-2030.**

MANO, J.F.; SILVA, G.A.; AZEVEDO, H.S.; MALAFAYA, P.B.; SOUSA, R.A.; SILVA, S.S.; BOESEL, L.F.; OLIVEIRA, J.M.; SANTOS, T.C.; MARQUES, A.P.; NEVES, N.M.; REIS, R.L. 2007. **Journal of the Royal Society Interface.** **4(17): 999-1030.**

MARCOS-CAMPOS, I.; MAROLT, D.; PETRIDIS, P.; BHUMIRATANA, S.; SCHMIDT, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2012. Bone scaffold architecture modulates the development of mineralized bone matrix by human embryonic stem cells. **Biomaterials.** **33(33): 8329-8342.**

MEREGALLI, M.; FARINI, A.; SITZIA, C.; TORRENTE, Y. 2014. Advancements in stem cells treatment of skeletal muscle wasting. **Frontiers in physiology.** **5(48): 1-12.**

MERRITT, E.K.; CANNON, M.V.; HAMMERS, D.W.; LE, L.N.; GOKHALE, R.; SARATHY, A.; SONG, T.J.; TIERNEY, M.T.; SUGGS, L.J.; WALTERS, T.J.; FARRAR, R.P. 2010. Repair of traumatic skeletal muscle injury with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix. **Tissue Engineering.** **16(9): 2871-2881.**

MERRITT, E.K.; HAMMERS, D.W.; TIERNEY, M.; SUGGS, L.J.; WALTERS, T.J.; FARRAR R.P. 2010. Functional assessment of skeletal muscle regeneration utilizing

homologous extracellular matrix as scaffolding. **Tissue Engineering Part A. 16(4): 1395-1405.**

MILNER, D.; CAMERON, J. 2013. Muscle repair and regeneration: stem cells, scaffolds, and the contributions of skeletal muscle to amphibian limb regeneration. **Current Topics in Microbiology and Immunology. 367(1): 133-159.**

MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. 2009. Physical approaches to biomaterial design. **Nature Materials. 8(1): 15-23.**

NAKAYAMA, K.; LEE, C.; BATCHELDER, C.; TARANTAL, A. 2013. Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. **PLoS ONE. 8(5): e64134.**

PERNICONI, B.; COSTA, A.; AULINO, P.; TEODORI, L.; ADAMO, S.; COLETTI, D. 2011. The pro-myogenic environment provided by whole organ scale acellular scaffolds from skeletal muscle. **Biomaterials. 32(31): 7870-7882.**

PETERSEN, T.H.; CALLE, E.A.; ZHAO, L.; LEE, E.J.; GUI, L.; RAREDON, M.B.; GAVRILOV, K.; YI, T.; ZHUANG, Z.W.; BREUER, C.; HERZOG, E.; NIKLASON, L.E. 2010. Tissue-engineered lungs for *in vivo* implantation. **Science. 329(5991): 538-541.**

PEYTON, S.; KIM, P.; GHAJAR, C.; SELIKTAR, D.; PUTNAM, A. 2008. The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3D biosynthetic hydrogel system. **Biomaterials. 29(17): 2597-2607.**

PORZIONATO, A.; SFRISO, M.M.; MACCHI, V.; RAMBALDO, A.; LAGO, G.; LANCEROTTO, L.; VINDIGNI, V.; DE CARO, R. 2012. Decellularized omentum as novel biologic scaffold for reconstructive surgery and regenerative medicine. **European Journal of Histochemistry. 57(1): 24-30.**

RIBOLDI, S.A.; SADR, N.; PIGINI, L.; NEUENSCHWANDER, P.; SIMONET, M.; MOGNOL, P.; SAMPAOLESI, M.; COSSU, G.; MANTERO, S. 2008. Skeletal myogenesis on highly orientated microfibrillar polyesterurethane scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A. 84(4): 1094-1101.**

ROSSI, C.; POZZOBON, M.; DECOPPI, P. 2010. Advances in musculoskeletal tissue engineering: moving towards therapy. **Organogenesis. 6(3): 167-172.**

ROSSI, C.A.; FLAIBANI, M.; BLAAUW, B.; POZZOBON, M.; FIGALLO, E.; REGGIANI, C.; VITIELLO, L.; ELVASSORE, N.; DE COPPI, P. 2011. **The FASEB Journal. 25(7): 2296-2304.**

SATO, M.; ITO, A.; AKIYAMA, H.; KAWABE, Y.; KAMIHIRA, M. 2012. Effects of B-cell lymphoma 2 gene transfer to myoblast cells on skeletal muscle tissue formation using magnetic force-based tissue engineering. **Tissue Engineering Part A. 19(1-2): 307-315.**

SAWKINS, M.J.; BOWEN, W.; DHADDA, P.; MARKIDES, H.; SIDNEY, L.E.; TAYLOR, A.J.; ROSE, F.R.; BADYLAK, S.F.; SHAKESHEFF, K.M.; WHITE, L.J.

2013. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. **Actabiomaterialia**. **9(8): 7865-7873**.

SCHELLER, E.; KREBSBACH, P.; KOHN, D. 2009. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. **Journal of oral rehabilitation**. **36(5): 368-389**.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**. **91(4): 1447-1531**.

SEIF-NARAGHI, S.; SALVATORE, M.; SCHUP-MAGOFFIN, P.; HU, D.; CHRISTMAN, K. 2010. Design and characterization of an injectable pericardial matrix gel: a potentially autologous scaffold for cardiac tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**. **16(6): 2017-2027**.

SHANDALOV, Y.; EGOZI, D.; KOFFLER, J.; DADO-ROSENFELD, D.; BEN-SHIMOL, D.; FREIMAN, A.; SHOR, E.; KABALA, A.; LEVENBERG, S. 2014. An engineered muscle flap for reconstruction of large soft tissue defects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. **111(16): 6010-6015**.

SHAPIRA-SCHWEITZER, K.; SELIKTAR, D. 2007. Matrix stiffness affects spontaneous contraction of cardiomyocytes cultured within a PEGylated fibrinogen biomaterial. **Actabiomaterialia**. **3(1): 33-41**.

SINGELYN, J.M.; DEQUACH, J.A.; SEIF-NARAGHI, S.B.; LITTLEFIELD, R.B.; SCHUP-MAGOFFIN, P.J.; CHRISTMAN, K.L. 2009. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. **Biomaterials**. **30(29): 5409-5416**.

SIRIVISOOT, S.; HARRISON, B. 2011. Skeletal myotube formation enhanced by electrospun polyurethancarbon nanotube scaffolds. **International Journal of Nanomedicine**. **6(1): 2483-2497**.

SPECTOR, M. 2006. Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. **Swiss Medical Weekly**. **136(19-20): 293-301**.

STERN, M.M.; MYERS, R.L.; HAMMAM, N.; STERN, K.A.; EBERLI, D.; KRITCHEVSKY S.B.; SOKER, S.; VAN DYKE, M. 2009. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. **Biomaterials**. **30(12): 2393-2399**.

STOCK, U.; VACANTI, J. 2001. Tissue engineering: current state and prospects. **Annual Review of Medicine**. **52(1):443-451**.

THORREZ, L.; SHANSKY, J.; WANG, L.; FAST, L.; VANDENDRIESSCHE, T.; CHUAH, M.; MOONEY, D.; VANDENBURGH, H. 2008. Growth, differentiation, transplantation and survival of human skeletal myofibers on biodegradable scaffolds. **Biomaterials**. **29(1): 75-84**.

ULERY, B.; NAIR, L.; LAURENCIN, C. 2011. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**. **49(12): 832-864**.

VAVKEN, P.; JOSHI, S.; MURRAY, M. 2009. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. **Journal of Orthopaedic Research**. **27(12): 1612-1618**.

WANG, Z.Y.; TEO, E.Y.; CHONG, M.S.; ZHANG, Q.Y.; LIM, J.; ZHANG, Z.Y.; HONG M.H.; THIAN, E.S.; CHAN, J.K.; TEOH, S.H. 2013. Biomimetic three-dimensional anisotropic geometries by uniaxial stretch of poly(e-caprolactone) films for mesenchymal stem cell proliferation, alignment, and myogenic differentiation. **Tissue Engineering: Part C**. **19(7): 538-549**.

WARD, C.; CORONA, B.; YOO, J.; HARRISON, B.; CHRIST, G. 2013. Oxygen generating biomaterials preserve skeletal muscle homeostasis under hypoxic and ischemic conditions. **PloSone**. **8(8): e72485**.

WILLIAMS, D. 2009. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**. **30(30): 5897-5909**.

WOLF, M.; DALY, K.; REING, J.; BADYLAK, S. 2012. Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. **Biomaterials**. **33(10): 2916-2925**.

WOLF, M.T.; DALY, K.A.; BRENNAN-PIERCE, E.P.; JOHNSON, S.A.; CARRUTHERS, C.A.; D'AMORE, A.; NAGARKAR, S.P.; VELANKAR, S.S.; BADYLAK, S.F. 2012. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. **Biomaterials**. **33(29): 7028-7038**.

WU, X.; CORONA, B.; CHEN, X.; WALTERS, T. 2012. A standardized rat model of volumetric muscle loss injury for the development of tissue engineering therapies. **BioResearch open Access**. **1(6): 280-290**.

YANG, Q.; PENG, J.; GUO, Q.; HUANG, J.; ZHANG, L.; YAO, J.; YANG, F.; WANG, S.; XU, W.; WANG, A.; LU, S. 2008. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for *in vivo* cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Biomaterials**. **29(15): 2378-2387**.

YOUNG, D.; IBRAHIM, D.; HU, D.; CHRISTMAN, K. 2011. Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate. **Actabiomaterialia**. **7(3): 1040-1049**.

ZANG, M.; ZHANG, Q.; CHANG, E.; MATHUR, A.; YU, P. 2013. Decellularized tracheal matrix scaffold for tracheal tissue engineering: *in vivo* host response. **Plastic and Reconstructive Surgery**. **132(4): 549-559**.

ZHANG, Z.; GUPTA, M.; MA, P. 2013. Biomaterials and stem cells for tissue engineering. **Expert Opinion on Biological Therapy**. **13(4): 527-540**.

ZHOU, J.; HU, S.; DING, J.; XU, J.; SHI, J.; DONG, N. 2013. Tissue engineering of heart valves: PEGylation of decellularized porcine aortic valve as a scaffold for *in vitro* recellularization. **Biomedical Engineering Online**. **12(87): 1-12**.

ZORLUTUNA, P.; VRANA, N.; KHADEMHOSEINI, A. 2013. The expanding world of tissue engineering: the building blocks and new applications of tissue engineered constructs. **IEEE Reviews in Biomedical Engineering**. **6(1): 47-62**.