

PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO EQUINO

Gabrielle de Souza Girodo

Carla Maria Figueiredo de Carvalho

Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

gabrielle.sgirodo@gmail.com

Objetivos

Caracterizar a matriz extracelular (MEC) descelularizada de músculo esquelético equino.

Métodos e Procedimentos

Fragmentos de músculo bíceps femoral equino foram descelularizados com 1% SDS (7 dias), 5mM EDTA + 50mM Tris (2 dias) e 1% Triton X-100 (2 dias); lavados em PBS 1x (4 dias); e analisados macro e microscopicamente (Colorações de Hematoxilina e Eosina; Tricrômio de Masson; Picrossírius e Alcian Blue) quanto à remoção de resquícios celulares, preservação da estrutura tridimensional (microscopia eletrônica de varredura) e conteúdo proteico da MEC (imunohistoquímica e imunofluorescência) CEUA nº 4682060519.

Resultados

A análise macroscópica demonstrou aspecto gelatinoso e coloração branca translúcida após descelularização. Na análise histológica, foi observada a eliminação de núcleos e fibras musculares, preservação e organização do tecido conectivo (fibras colágenas espessas e finas) e glicosaminoglicanos no tecido da MEC descelularizada.

Na análise de microscopia eletrônica de varredura, observou-se preservação da ultraestrutura e organização da rede de fibras proteicas da MEC, além da remoção das fibras musculares.

Proteínas de MEC foram observadas antes e depois do processo de descelularização: fibronectina e elastina (imuno-histoquímica) e colágeno V, laminina e perlecan (imunofluorescência). Essas proteínas são de extrema importância, pois caracterizam a

estrutura tridimensional da matriz mesmo após a descelularização, facilitando a adesão e suporte celular.

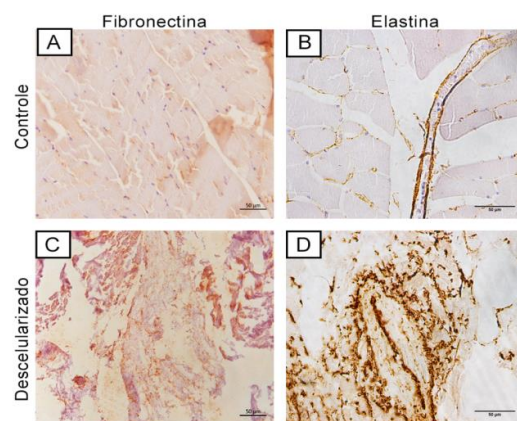


Figura 1: Imunomarcagem positiva de proteínas de matriz extracelular (fibronectina e elastina) de músculo esquelético equino antes (Controle) (A-B) e após descelularização (C-D); Barra de escala: 50 µm.

Conclusão

Concluiu-se que a estrutura tridimensional e composição proteica da matriz extracelular de músculo esquelético equino foi preservada, similarmente ao tecido nativo, devido à eficiência do processo de descelularização, obtendo-se, assim, um biomaterial promissor para medicina regenerativa.

Referências Bibliográficas

- CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. Vol. 32,12 (2011): 3233-43.
- GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int*. 2017:9831534.

PRODUCTION OF DECELLULARIZED EXTRACELLULARIZED MATRIX OF EQUINE SKELETAL MUSCLE

Gabrielle de Souza Girodo

Carla Maria Figueiredo de Carvalho

University of São Paulo - Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny

gabrielle.sgirodo@gmail.com

Objectives

Characterize the extracellular matrix (SCM) decellularization of the equine skeletal muscle.

Methods and Procedures

Fragments of biceps femoral is were decellularized with 1% SDS (7 days), 5mM EDTA + 50mM Tris (2 days) and 1% Triton X-100 (2 days); washed in PBS 1x (4 days); and analyzed macro and microscopically (Hematoxylin and Eosin stains); Masson trichrome; Picrossírius and Alcian Blue) as to the removal of cellular remains, preservation of the three-dimensional structure (scanning electron microscopy) and protein content of ECM (immunohistochemistry and immunofluorescence) CEUA nº 4682060519.

Results

The macroscopic analysis showed a gelatinous aspect and translucent white coloration after decellularization. In the histological analysis, the elimination of muscle nuclei and fibers, preservation and organization of connective tissue (thick and thin collagen fibers) and glycosaminoglycans in the decellularized ECM tissue were observed.

In the scanning electron microscopy analysis, preservation of the ultrastructure and organization of the ECM protein fiber network was observed, besides the removal of muscle fibers.

ECM proteins were observed before and after the decellularization process: fibronectin and elastin (immunohistochemistry) and collagen V, laminine and perlecan (immunofluorescence). These proteins are of extreme importance, because they characterize the three-dimensional structure of the matrix even after decellularization, facilitating adhesion and cell support.

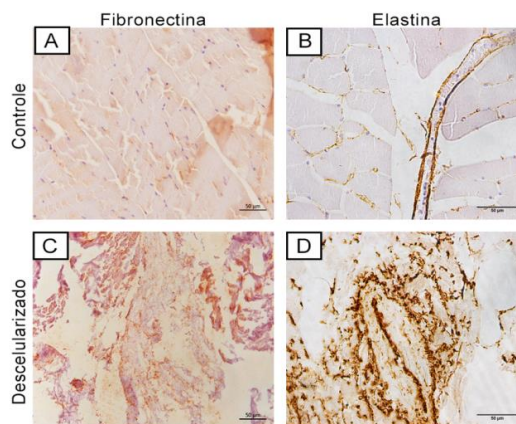


Figure 1: Positive immunomark of extracellular matrix proteins (fibronectin and elastin) from equine skeletal muscle before (Control) (A-B) and after decellularization (C-D); Scale bar: 50 μ m.

Conclusion

It was concluded that the three-dimensional structure and proteinic composition of the extracellular matrix of equine skeletal muscle was preserved, similarly to native tissue, due to the efficiency of the decellularization process, thus obtaining a promising biomaterial for regenerative medicine.

Bibliographical References

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. Vol. 32,12 (2011): 3233-43.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int*. 2017;9831534.