

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

HEITOR PEREIRA BARROS

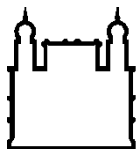
**INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL A MIOBLASTOS HUMANOS
EM CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Instituto Oswaldo Cruz,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Wilson Savino
Prof. Dr. Adriana Bonomo

Rio de Janeiro
2013

Ficha catalográfica



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Heitor Pereira Barros

**INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL A MIOBLASTOS HUMANOS
EM CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Wilson Savino
Prof. Dr. Adriana Bonomo

Aprovada em: 23 / 01 / 2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Clarissa Menezes Maya Monteiro - Presidente
Prof. Dr. Regina Coeli dos Santos Goldenberg
Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida
Suplente 1: Cláudia Mermelstein
Suplente 2: Andrea Henriques Pons

Rio de Janeiro, 23 de Janeiro de 2013

AGRADECIMENTOS:

Por meio desse pequeno texto espero poder lembrar e dizer o quão agradecido sou por tudo o que se passou até estarmos aqui hoje. Lembrando que o maior agradecimento não se encontra em palavras, mas em gestos do cotidiano. Primeiramente, eu agradeço a Deus, pois sem Ele em minha vida e sem a fé que tenho nada disso teria acontecido.

Esta dissertação é dedicada aos meus pais e a minha esposa, Luciana, que sempre me apoiaram incondicionalmente. Minha mãe, Luiza, que sempre está do meu lado, me apoiando, mesmo sem entender o que faço, mas sempre entendendo o quão importante esse projeto foi pra mim. Ela que é responsável pela minha educação e formação do meu caráter. Obrigado mãe. Ao meu pai, Claudio, que sempre foi o meu exemplo de sucesso profissional. Dizem que os filhos se espelham no pai e isso pra mim é verdade. Meu pai, sempre foi pra mim um exemplo de perseverança e luta. Obrigado pai. Ambos são responsáveis por quem sou e estão comigo diariamente.

À minha esposa, Luciana, que desde o início dessa caminhada científica está do meu lado. O que no início do nosso namoro era um sonho, aos poucos, vai virando realidade. Sem o seu apoio essa dissertação não sairia do papel. Sempre me apoiando e me incentivando. Sua família, principalmente meus sogros, também participou ativamente dessa caminhada. Sei que torceram muito. E pelas horas de alegria e pelas viagens, sou muito grato, pois sem elas tudo teria ficado mais difícil e pesado.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial meus primos Renata e Rômulo, que mesmo na minha ausência, por falta de tempo, sempre estiveram por perto quando precisei. Vocês são pessoas especiais às quais eu tenho sorte de ter na minha vida.

Aos amigos do INCA esse espaço é deveras pequeno. Ana Merc, nossa menina, você me ajudou demais. Mesmo antes desse projeto eu te *pentelhei* como seu aluno e você colocou um pouco de organização em mim. Sua ajuda foi imprescindível pra que eu chegasse aqui. Ana Paula, sem você, eu creio que o *lab* não seria a mesma coisa. Tenho muito a lhe agradecer, pela ajuda nos experimentos, pelo carinho e pelas puxadas de orelha merecidas. Suelen e Triciana que sempre estavam prontas pra ajudar em um experimento grande demais. Pelo companheirismo e pelo carinho, obrigado! Galvani, cara (somos carioca), obrigado pelas dicas, conselhos, pelas ajudas inestimáveis, pelas risadas e mesmo pelas imitações do “cana”. Tem muita gente do INCA que não posso deixar de agradecer também, Areal, João Luiz, Chica, Bianca, Andressa, obrigado pela presença e pela ajuda. E a todos da equipe e dos amigos do Inca, obrigado!

Aos amigos do LPT, que sempre me receberam de braços abertos, mesmo eu sendo aluno “de fora”. Luiz, Pedro, Tiago, Leandra, Marina, Juju, Dani, Dai, Ailin e tantos outros que me receberam e me ajudaram a me sentir “em casa” toda vez que eu ia no lab. Muito obrigado pela força, pelo carinho e pela torcida.

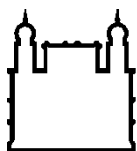
Aos pesquisadores do laboratório, meu agradecimento pelos momentos em que apresentava o meu trabalho e sempre dão ótimos conselhos e nos ajudam a ver além. Ao Ingo, pela ajuda inestimável no projeto. Com sua ajuda conseguimos resolver alguns pepinos que surgiram no decorrer da dissertação.

Gostaria de agradecer também ao grupo de BH e a Ana Maria Caetano, pois abriu o seu laboratório e me permitiu aprender o que é tolerância oral. Sem a sua ajuda esse projeto não teria nem começado.

E aos meus orientadores Adriana e Savino, muito obrigado! Ainda me lembro que no final de 2007, eu disse ao Savino que queria trabalhar com a Adriana. Com a ajuda dele, em 2008 eu estava no grupo da Adriana. À Adriana, que me orienta desde a iniciação científica, tenho uma gratidão enorme. Graças à sua orientação que me vi aprendendo tanto. Tenho por ela um imenso respeito por sua história e sua dedicação à ciência. Muito obrigado! E ao Savino, que desde 2008 profetizou que trabalharíamos juntos, minha imensa gratidão. Obrigado pela oportunidade, pelo espaço e confiança dada. Sem ele não teríamos nem começado esse projeto. A sua orientação foi muita valiosa pra mim, pois me ensinou muita coisa. Assim como pela Adriana, sempre tive muito respeito por toda sua via profissional. Muito obrigado!

**O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente acontece.**

Benjamin Disraeli



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

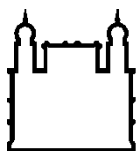
INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL A MIOBLASTOS HUMANOS EM CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Heitor Pereira Barros

Resumo

O desenvolvimento de novos protocolos que possibilitem o uso de terapia celular é fundamental para o aumento da qualidade de vida em pacientes com doenças genéticas ou desordens malignas. Em particular, pacientes portadores de distrofias musculares de origem genética poderiam se beneficiar desta terapia. No entanto, há uma dificuldade importante a ser suplantada: os mioblastos usados para o tratamento serem provenientes, na maioria dos casos, de doador alogênico ou até xenogênico. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos que induzam tolerância no indivíduo a ser tratado, aos mioblastos transplantados. Estas células são capazes de reparar a fibra muscular quando enxertadas no músculo doente, por mecanismo de diferenciação e fusão celular com células musculares pré-existentes. No presente trabalho utilizamos camundongos singênicos C57BL/6, que foram divididos em 3 grupos: experimental, controle positivo, controle negativo. O grupo experimental que recebeu diariamente, por gavagem, extrato de mioblastos/miotubos humanos e *Lactococcus lactis*, *ad libitum* por um período de 5 dias; e dois outros grupos (controles negativo e positivo) que receberam PBS oralmente. Após 4 dias, os camundongos foram imunizados com extrato o mesmo extrato, associado ao adjuvante completo de Freund (CFA) ou hidróxido de alumínio no coxim plantar ou intraperitonealmente (grupo experimental e controle positivo). Uma semana após a imunização, todos os grupos receberam um reestímulo, ou foram transplantados com mioblastos no músculo *tibialis anterior* após criação do mesmo. Usando o corante fluorescente CFSE para medir proliferação e iodeto de propídeo para excluir células mortas, constatamos que o grupo experimental apresentava redução de 60% na proliferação quando comparado com o controle positivo. Sete dias após o transplante foi observado, usando bromodeoxiuridina, uma redução de 90% na taxa de proliferação celular nos linfonodos drenantes. No mesmo período, pode-se observar um maior número de células inflamatórias no músculo dos animais não tratados quando comparado com o grupo experimental. As células T do animal tolerizado produzem 50% menos interferon- γ . Somente o controle positivo produziu IL-10 e nenhum deles IL-4. Após 1 mês de transplante, somente observamos células humanas no grupo tolerizado. Esses resultados demonstram que o protocolo de tolerância oral modula a resposta imunológica contra o mioblasto *in vitro* e *in vivo*, sugerindo portanto seu uso no transplante de precursores miogênicos em indivíduos imunocompetentes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INDUCTION OF ORAL TOLERANCE TO HUMAN MYOBLASTS IN IMMUNOCOMPETENT MICE

Heitor Pereira Barros

Abstract

The development of new protocols that make possible the use of cell therapies is fundamental for the improvement of life quality in patients having genetic diseases or any malignant disorder. In particular, patients with muscular dystrophies could benefit from this therapy. Nevertheless, there is an important issue to be circumvented: myoblasts used in the therapy come in most cases from allogeneic or even xenogeneic donors. In this way, the development of protocols that induce tolerance of the host for accepting the injected myoblasts is necessary. Those cells are capable to repair muscular fibers when injected into the lesioned muscle, by a mechanism involving cell differentiation and fusion with pre-existing myofibers. Accordingly, the establishment of an experimental protocol inducing immunotolerance to myoblasts is necessary for therapeutic reasons. In the present work we used syngeneic C57BL/6 mice which were divided in three groups: The *experimental group* that received daily, by gavage, an extract derived from human myoblasts/myotubes and *Lactococcus lactis*, for a total of 5 days. Two groups, namely negative and positive controls, received PBS orally. After 4 days, mice were immunized with myoblast/myotube extract associated to complete Freund's adjuvant or aluminum hydroxide in the footpad or i.p., (respectively positive and experimental groups), or with CFA or aluminum hydroxide plus PBS (negative group). One week after immunization, all groups were boosted with the same protein extract. Myoblasts were then transplanted in the *tibialis anterior* muscle after a cryolesion in all groups. Using CFSE to measure proliferation and propidium iodide to exclude unviable cells, we found 60 % less proliferation in the tolerized group, when compared to the positive control group. Using bromodeoxyuridine after myoblast transplantation, we found a reduction of 90% in cell proliferation of lymphocytes from the draining lymph nodes. Seven days post-transplant we could see a higher number of inflammatory cells in the muscle of mice from positive and negative groups in comparison with the experimental group. T cells from the tolerized mice produced less than 50% of the interferon- γ produced by the experimental group. Only the positive, non-tolerized group produced IL-10 and none of them produced IL-4. Lastly, we could only detect human cells in the muscle of the mice that received the complete oral plus probiotic treatment. The results demonstrate that the protocol of oral tolerance modulates the *in vitro and in vivo* immune response against transplanted myoblasts, a promising result for design further strategies using transplantation of myogenic precursor's immunocompetent individuals.

Lista de Abreviaturas Utilizadas:

BMD – Distrofia muscular de Becker
BrdU - Bromodeoxiuridina
BSA – Albumina de soro bovino
CFA – Adjuvante completo de Freund
CFSE – Ester de succinimidilcarboxyfluoresceína
DAPC – Complexo de proteínas associada à distrofina
DMD – Distrofia muscular de Duchenne
DMEM – “Dulbecco's Modified Eagle Medium”
DSS – “Detergent Saving System”
EDMD – Distrofia muscular de Emery-Dreifuss
Foxn1 – Proteína “Forkhead box N1”
FSH – Distrofia Facio-escapulo-humeral
GALT – Tecido linfoide associado à mucosa
GRMD – Distrofia muscular do (cão) *Golden retriever*
INF- γ – Interferon gama
L. lactis – *Lactococcus lactis*
LGMD – Distrofia muscular de membros e cintura
MDX – modelo de camundongo com distrofia muscular
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA – RNA mensageiro
nNOS – óxido nítrico sintase
PBS – Solução de salina fosfatada tamponada
PI – Iodeto de propídeo
SCID – camundongo com imunodeficiência combinada severa
SFB – Soro fetal bovino
T.A. – Músculo tibialis anterior
Th1 – linfócitos T do tipo Helper 1
Th2 – linfócitos T do tipo Helper 2
Treg – linfócitos T reguladores

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1.	As Distrofias Musculares	13
1.2.	Modelos Animais	17
1.3.	Aspectos Clínicos e Possibilidades Terapêuticas em Distrofias Musculares	19
1.4.	Tolerância Oral	22
1.5.	Meios e Mecanismos da Tolerância Oral.....	24
1.6.	A Mucosa Intestinal e a Tolerância Oral	25
1.7.	Probióticos	26
2.	OBJETIVOS	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais.....	30
3.2	Mioblastos.....	30
3.3	Cultivos de mioblastos humanos	30
3.4	Extratos de células musculares humanas.....	31
3.5	Cultivo de <i>Lactococcus lactis</i>	31
3.6	Transplante dos mioblastos	31
3.7	Histologia	32
3.8	Citofluorimetria para detecção de moléculas de superfície.....	33
3.9	Ensaio de proliferação celular com CFSE.....	33
3.10	Ensaio de proliferação celular com bromodeoxiuridina (BrdU)	34
3.11	Detecção de morte celular por iodeto de propídeo	34
3.12	Avaliação da concentração de citocinas	35
3.13	Análise Estatística	35
3.14	Protocolos Experimentais para indução de tolerância oral	35

4. RESULTADOS	39
4.1 Avaliação da imunogenicidade do extrato de células musculares humanas	39
4.2 Fenótipo de subpopulações de linfócitos T em linfonodos drenantes após indução de tolerância via oral a antígenos de extrato de células musculares humanas	40
4.3 Modulação da resposta imune antígeno-específica, após indução de tolerância via oral a extrato de células musculares humanas	43
4.4 O tratamento oral modula a resposta após 1 semana de transplante ...	45
4.5 Uma semana pós-transplante não há variação no baço	47
4.6 Um mês pós-transplante há modulação da resposta imune	48
4.7 Tolerância oral com <i>L. lactis</i> e extrato de mioblastos/miotubos permite a pega do transplante.	51
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Tipos de distrofias musculares.....	14
Figura 2. Sinal de gower.	15
Figura 3. A distrofina e o complexo de proteínas associado a esta molécula no sarcolema.	17
Figura 4. Padrões histológicos distintos entre músculos esqueléticos saudáveis e distróficos.....	18
Figura 5. Marcha de trendelemburg.	21
Figura 6. Ilustração da metodologia aplicada para as análises de presença das células injetadas.	33
Figura 7. Protocolo de tolerização oral sem utilização de probiótico.	36
Figura 8. Protocolo de tolerização oral em presença de próbiótico.....	37
Figura 9. Segundo protocolo de tolerização oral em presença de próbiótico. ...	38
Figura 10. Imunogenicade do extrato de células musculares humanas em camundongos normais.....	40
Figura 11. Número de linfócitos nos linfonodos drenantes em camundongos imunizados ou não com extrato de células musculares humanas, na tentativa ou não de geração de tolerância via oral.	41
Figura 12. Número absoluto de linfócitos t cd4 de fenótipos regulador e t efectoras nos linfonodos drenantes (cd4 ⁺ cd25 ⁺ foxp3 ⁺ e cd4 ⁺ cd25 ⁺ foxp3 ⁻ , respectivamente) de camundongos submetidos ou não ao protocolo de tolerização oral, e imunizados com extrato de células musculares humanas.	42
Figura 13. Modulação na produção de interferon- γ e interleucina-10 por linfócitos provenientes de linfonodos de animais submetidos a protocolo de tolerização via oral as extrato de células musculares humanas.	44
Figura 14. Modulação na proliferação de linfócitos t (cd3-positivos) provenientes de linfonodos de animais submetidos a protocolo de tolerização via oral as extrato de células musculares humanas.	45
Figura 15. Após o transplante o tratamento oral regula a resposta imune de forma localizada.....	46
Figura 16. Após o transplante não há diferenças nas subpopulações de linfócitos.....	48
Figura 17. Um mês pós-transplante parece ocorrer regulação do sistema imune.....	49
Figura 18. Não parece haver diferenças entre as tregs.	50
Figura 19. Não há mudança nas subpopulações de linfócitos no baço 1 mês após o transplante.	51
Figura 20. Presença de células humanas em músculo tibialis anterior (t.a) de camundongo c57bl/6 imediatamente após o transplante.....	52

Figura 21. Presença de mioblastos humanos em músculo de camundongo rag-ko 1 mês após transplante	52
Figura 22. Animais que recebem tratamento completo mantêm células humanas após 1 mês de transplante.....	53
Figura 23. Animais que receberam o extrato por gavagem não possuem células humanas após 1 mês de transplante.....	53
Figura 24. Animais que receberam a bactéria <i>L. Lactis</i> não apresentam células humanas após 1 mês de transplante.....	54
Figura 25. Os animais que não receberam o tratamento oral rejeitaram os mioblastos humanos enxertados.	54

1 INTRODUÇÃO

1.1. As Distrofias Musculares

As distrofias musculares fazem parte de um grupo de doenças neuromuscular crônica e congênita. São caracterizadas por uma perda progressiva da força muscular gerado por uma degeneração contínua do músculo esquelético (EMERY, 2002).

Existem diversos tipos de distrofias musculares. Entre as distrofias com caráter hereditário podemos relacionar a distrofia muscular de Duchenne (DMD), a distrofia muscular de Becker (BMD), de Emery-Dreifuss (EDMD), distal, facioscapulohumeral (FSH), oculofaríngea, de cintura (LGMD – “limbgirdle muscular disease”) e as distrofias congênitas. Cada uma dessas doenças recebe seu nome pelos sinais clínicos que o paciente apresenta (Figura 1), sem contar a grande heterogeneidade genética que pode ocorrer dentro da mesma doença.

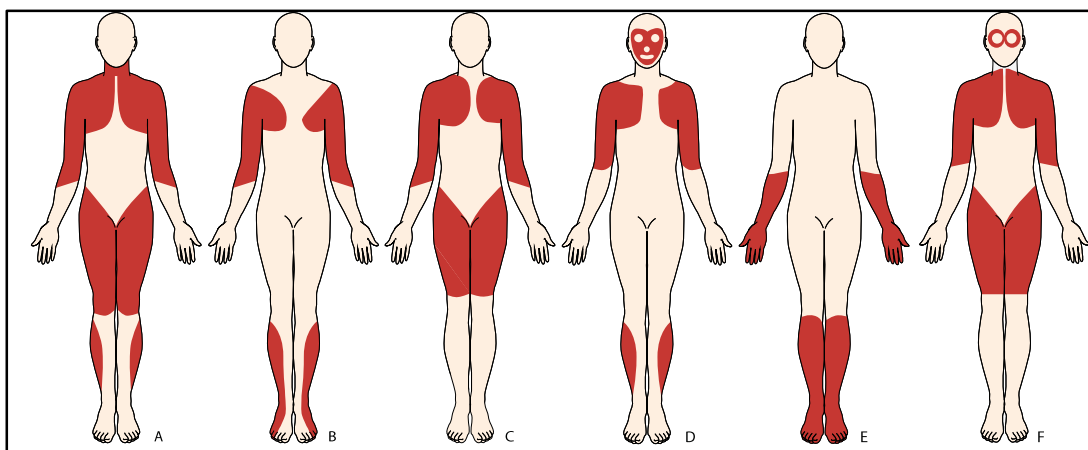


Figura 1. Tipos de distrofias musculares. A, Duchenne e Becker; B, Emery-Dreifuss; C, limbgirdle; D, facioscapulohumeral; E, distal; F, oculofaríngea. Vermelho = áreas afetadas. Adaptado de Emery, 2002

Entre as distrofias musculares, destaca-se a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) por ser a mais grave e com maior prevalência, afetando 1 a cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas dentre todas as populações (Hoffman, 1987). A DMD tem caráter recessivo e é transmitida pelo cromossomo X (X p21) e mutações que provoquem a não produção ou a produção da distrofina truncada ou pouco funcional leva à doença (Ray et al, 1985; Monaco et al, 1987). As mutações são provocadas em 65% dos casos por

deleção, 27% por uma mutação pontual, em 8% por uma duplicação e em 1% por uma translocação, inversão ou por mutação intrônica (Aartsma-Rus & van Ommen, 2009).

A distrofia muscular foi descrita pela primeira vez pelo médico inglês Charles Bell, na metade do século XIX, que a descreveu como um caso de paralisia parcial das extremidades inferiores. A descrição mais detalhada do processo foi dada pelo médico Edward Meryon em 1852 que observou que a doença afligia toda a musculatura do paciente. Ainda na metade do século XIX, foi o neurologista francês Guillaime Benjamin Amand Duchenne quem descreveu a doença que leva o seu nome como sendo uma doença que leva a uma perda muscular progressiva, e perda dos movimentos, inicialmente dos membros inferiores e por fim dos membros superiores, com hipertrofia muscular, aumento intersticial do tecido conjuntivo e adiposo nos músculos dos pacientes (ver revisão Emery 2002). Neste estudo completo, o Dr. Duchenne estudou diversos pacientes, descrevendo vários casos, inclusive em duas meninas, correlacionando os casos com os sinais clínicos descritos acima. Um pouco mais tarde, em 1879, o médico Willian Gower chegou à conclusão de que a doença seria hereditária e seria herdada pela mãe. Esse mesmo médico descreveu o que hoje é conhecido como o “sinal de Gower” (Figura 2), o qual caracteriza a dificuldade dos pacientes DMD em se levantar, tendo que apoiar as mãos nos membros inferiores de forma a conseguir a propulsão necessária para se elevar.



Figura 2. Sinal de Gower. O indivíduo se coloca de joelhos e se apoia nos braços para levantar as pernas. Em seguida se apoia nas pernas e, finalmente, ergue o tronco, se pondo em pé. Retirado de <http://www.neurologyarticles.com>

A distrofina é um importante componente da membrana celular associado ao citoesqueleto de fibras musculares, ancorando as células à matriz extracelular (Figura 3) (Hoffman, 1987). A presença de uma forma truncada ou ausência da

distrofina leva a uma desestabilização do sarcolema que pode terminar em ruptura durante a contração da fibra muscular. Ela apresenta massa molecular de 427 kDa e seu gene tem em torno de 2,5Mb, com sua sequência sendo a maior do genoma humano, ocupando quase 2% do cromossomo e 0,05% do genoma. O gene consiste de 79 exon se o transcrito é a distrofina, a qual é expressa predominantemente em músculos lisos, cardíaco e esquelético e em menores proporções no cérebro (Bogdanovich et al, 2004). Esta proteína faz parte de um complexo de ancoramento da membrana da fibra muscular à matriz extracelular. Durante os processos de contração e relaxamento a presença desse complexo é fundamental para a estabilização mecânica do sarcolema, transmitindo a força gerada pelos sarcômeros para a matriz extracelular (Petrof et al, 1993). O domínio N-terminal e as repetições de espectrina da distrofina se ligam a filamentos de F-actina do citoesqueleto. Já a porção C-terminal fica ancorada ao complexo de proteínas associado à distrofina (DAPC) e essas se ligam aos componentes da matriz extracelular, como a laminina (Davies; Nowak, 2006). A ausência ou transcrição truncada da distrofina pode acarretar, devido ao imenso estresse mecânico provocado pelo processo de contração, a perda da integridade do sarcolema provocando uma necrose das fibras musculares pela abertura de canais de cálcio, aumentando o influxo deste íon, com consequente ativação de proteases (Straub& Campbell, 1997). A consequência da necrose das fibras musculares é a presença de um infiltrado inflamatório que leva a ciclos sucessivos de degeneração-regeneração. Na figura 4 podemos observar a diferença entre um músculo saudável e um músculo de um paciente com distrofia muscular de Duchenne. No músculo distrófico podemos notar uma presença de núcleos centralizados em fibra musculares, o que caracteriza área recente de regeneração, a presença de células musculares com tamanhos diferentes e desorganizadas e fibrose no tecido muscular.

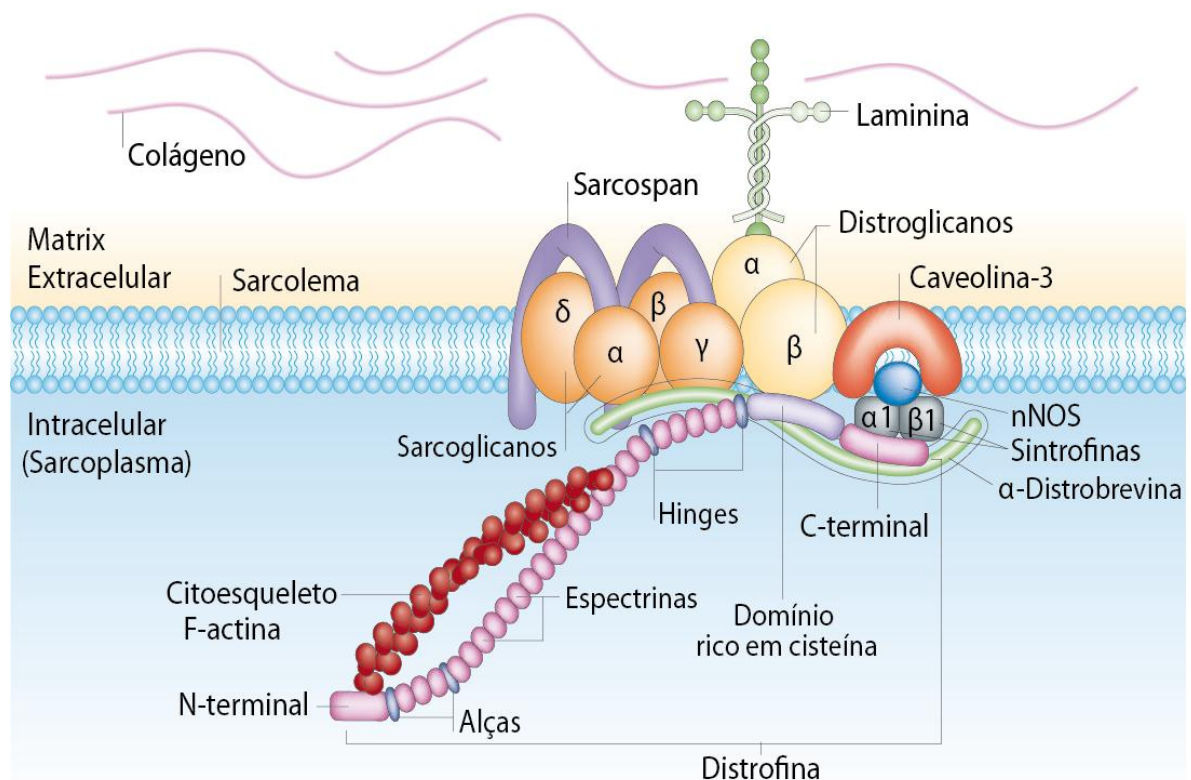


Figura 3. A distrofina e o complexo de proteínas associado a esta molécula no sarcolema. O esquema mostra a ligação entre a distrofina e o complexo de proteínas associado à distrofina (DAPC). Como podemos observar a distrofina se liga ao DAPC na região terminal e esta é composta por repetições de espectrinas. A região N-terminal da distrofina se liga aos filamentos de F-actina do citoesqueleto celular. O DAPC é formado por proteínas sarcoplasmáticas (óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), sintrofinas e α -distrobrevinas) e por proteínas da matriz extracelular (α -distroglicanos e laminina). O DAPC é o responsável pela ligação mais firme entre o citoesqueleto e a matriz. Adaptado de Davies & Nowak 2006.

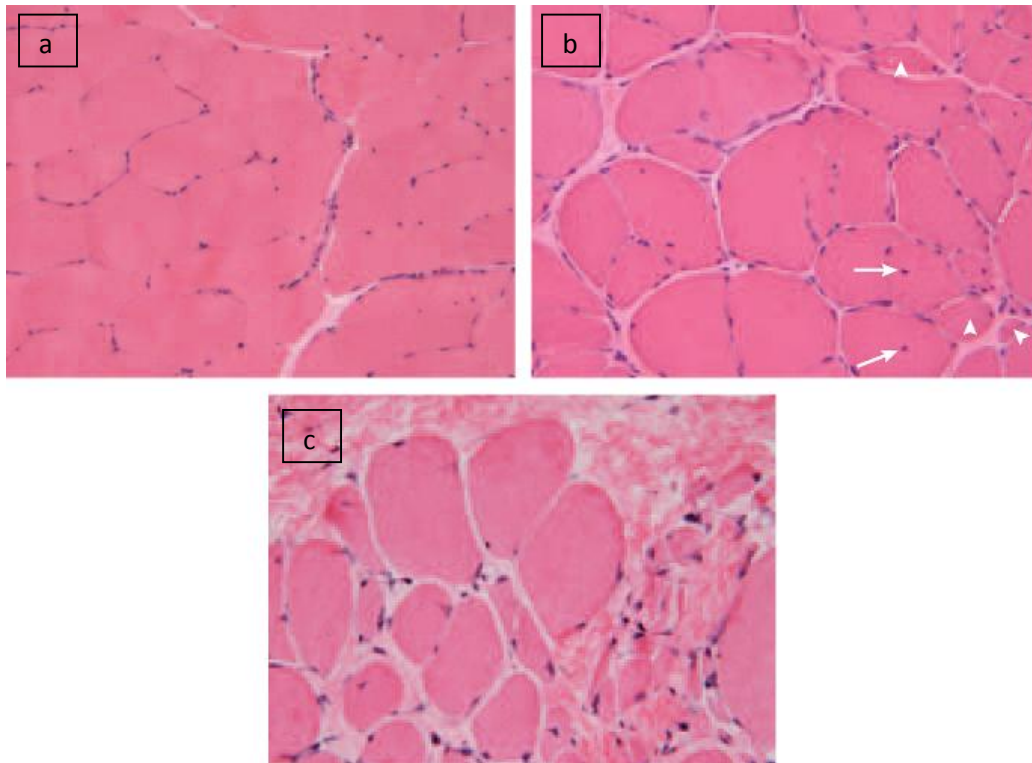


Figura 4. Padrões histológicos distintos entre músculos esqueléticos saudáveis e distróficos. Coloração com hematoxilina e eosina de músculo saudável em (a) e músculo distrófico e (b e c). No músculo sadio podemos notar que as fibras musculares têm quase o mesmo diâmetro com os núcleos quase sempre localizados na periferia. Quando observamos os músculos de pacientes distróficos notamos a presença de núcleos centralizados (apontado por setas brancas), assim como uma desorganização do tecido, com presença de fibras com tamanhos diferenciados, e a deposição de tecido conectivo entre as fibras. Adaptado de Davies & Nowak 2006.

1.2. Modelos Animais

Existem diversos modelos animais para o estudo de distrofias musculares. O modelo animal mais estudado de DMD é o camundongo mdx, mutante natural de uma colônia de animais C57Bl/10ScSn, no qual uma mutação pontual espontânea no éxon 23 no gene da distrofina causa interrupção da leitura da fita de mRNA gerando uma proteína não-funcional (Sicinski, 1989). Este modelo tem a mesma doença genética e homologia bioquímica, porém num fenótipo moderado. A miopatia e a função mecânica são bem menos graves, resultando numa expectativa de vida quase normal, evidenciando portanto que a ausência de distrofina em camundongos é menos crítica que para humanos (Collins, 2003). Ainda assim, o camundongo mdx é o modelo experimental mais utilizado, sendo recomendado devido a inúmeros artigos publicados utilizando este

modelo, vislumbrando conhecimento sobre músculo esquelético e cardíaco, além da patologia respiratória (Willmann R, 2009). No entanto, o curso da doença nesses animais difere daquele que ocorre em humanos. Neste modelo, as primeiras manifestações de degeneração muscular ocorrem entre a 3ª e a 5ª semana de vida. Após esta fase de degeneração aguda, segue-se um período de regeneração e hipertrofia muscular transitória seguido de processos de degeneração/regeneração em níveis baixos praticamente durante toda a vida do animal. Entretanto, por motivos ainda desconhecidos, a regeneração muscular nestes animais deixa de ocorrer em idade mais avançada (em torno do 15º mês de vida), o que acarreta fraqueza muscular, que progride para o êxito letal (Coulton, 1988; Pastoret, 1993; Tanabe, 1986).

Como modelo experimental de DMD, há ainda o cão distrófico da raça Golden Retriever (GRMD). Esses animais possuem uma mutação pontual que corresponde a uma troca de base nucleotídica no sentido 3' do íntron 6. Isso leva à não leitura do exon7 e conseqüente alteração na leitura do exon8, o que acaba por causar um parada prematura no processo de transcrição (Sharp, et al, 1992). Diferentemente dos camundongos MDX, os cães GRMD sofrem de uma rápida e progressiva doença que leva ao óbito, similar à doença encontrada em pacientes DMD. Contudo, há uma grande variação na severidade da doença. Alguns animais sobrevivem por apenas alguns dias e outros chegam a viver meses a até alguns anos (Ambrosio et al, 2008).

O reparo muscular deficiente nos cães GRMD leva a uma fraqueza progressiva (6 a 9 semanas), levando a atrofia muscular e fibrose (6 meses em média). O crescimento dos filhotes é afetado. Os animais com a mutação se tornam menos ativos quando comparados aos saudáveis com 9 meses de idade. Animais mais afetados têm dificuldades de locomoção, com dificuldade de se levantar e caminhar. Aos 12 meses esses animais começam a ter dificuldades respiratórias. Com o passar do tempo são levados a óbito por problemas cardiorrespiratórios.

1.3.Aspectos Clínicos e Possibilidades Terapêuticas em Distrofias Musculares

Em indivíduos saudáveis, o músculo esquelético adulto é um tecido estável, composto de fibras musculares pós-mitóticas multinucleadas, e por uma pequena população de células mononucleares (Clegg e Hauschka, 1987). Após o nascimento, a reparação e o crescimento desse tecido ocorrem através da ativação dessa população mononuclear, as células satélites, mantida como uma população de reserva, e que se mantém quiescente no músculo maduro (Schultz E, 1978; Mauro, 1961). As células satélites estão dispostas adjacentes à fibra muscular, ocupando um espaço entre a lâmina basal e membrana plasmática (Hawker e Garry, 2001). Depois de ativadas, por exemplo, em decorrência de uma lesão traumática ou uma doença, parte desta população sai do estado de quiescência, seguindo então as etapas de proliferação, diferenciação em mioblastos, fusão e formação de fibra muscular madura. Na DMD, o processo de regeneração e degeneração acarreta em exaustão da população de células satélites, ocorrendo uma substituição progressiva do tecido muscular por tecido adiposo e posterior fibrose (Heslop et al, 2000)

Os pacientes com distrofia muscular apresentam degeneração progressiva do tecido muscular, esquelético e cardíaco. Em pacientes DMD a fraqueza muscular começa nos primeiros anos de vida e já na adolescência o paciente perde a capacidade de deambulação. Esses pacientes costumam não resistir até o fim da terceira década de vida, sendo levados ao óbito por insuficiência respiratória (Hayes et al, 2008). Há relatos de já se encontrar sinais da doença intra-útero, embora não haja relatos de morte neonatal.

Em geral, os primeiros sinais clínicos são detectados aos dois anos de idade, sendo notado o atraso do desenvolvimento psicomotor da criança (Grounds, 2008). Durante o segundo ano, o acometimento da cintura pélvica pode ser notado de forma sutil, e os pacientes podem assumir uma posição lordótica compensatória. Aos três anos de idade já pode ser observado o levantar miopático, e com o passar do tempo surge a báscula de bacia ou marcha de Trendelenburg (Figura 5). O período de tempo que o paciente continua deambulando é variável, podendo se estender na maioria dos casos até acima

dos 10 anos de idade. Entretanto, as intervenções ortopédicas e fisioterápicas podem prolongar o tempo de deambulação em até dois anos (Eagle et al,2007).

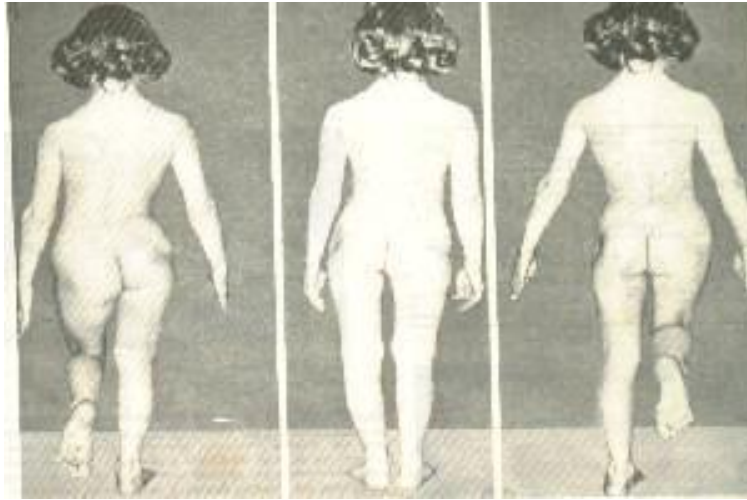


Figura 5. Marcha de Trendelenburg. Pessoas com fraqueza da musculatura abduutora do quadril demonstram esse tipo de marcha. A causa da fraqueza é variável e também está presente em paciente com DMD. Observa-se um discreto encurtamento do membro afetado. Retirado de:

<http://www.cultura.ufpa.br/ortraum/Patologia%20do%20quadril.htm>

Ao longo dos últimos anos, modelos envolvendo terapia celular foram testados a fim de estabelecer uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de distrofias musculares. Entretanto, mesmo com o avanço alcançado, a aplicabilidade das terapias tem-se mostrado bastante limitada, sendo a cura não obtida até os dias atuais. As limitações por parte dessas terapias implicam em alguns fatores principais: intensa morte celular verificada logo após o transplante e a migração limitada das células transferidas no músculo enxertado; a introdução da distrofina leva a um reconhecimento pelas células do sistema imune e posterior rejeição (Camirand, 2008). A rejeição ocorre logo que o transplante de mioblasto é realizado em consequência do dano tecidual que gera inflamação, e as citocinas geradas neste ambiente inflamatório induzem a expressão de MHC de classe II e a CD80 nas fibras musculares. Estas, agem como células apresentadoras de antígenos, aumentando a apresentação direta de antígenos e contribuindo para a rejeição do transplante (Camirand, 2008).

Para pacientes portadores da distrofia muscular não há alternativa terapêutica atual afora o uso de glicocorticoides. Portanto, para esses pacientes

é de grande importância a geração de um protocolo que viabilize o transplante alógeno de mioblastos como terapia para distrofia muscular. Numa fase inicial no entanto, é importante gerarmos modelos animais que nos permitam estudar as características biológicas de um transplante xenogênico de precursores miogênicos humanos.

Os principais modelos utilizados na literatura são de animais imunodeficientes, tendo em vista que esses animais, não possuem (total ou parcialmente) uma resposta imune adaptativa de base celular, tornando-os então permissivos ao desenvolvimento das células humanas enxertadas no músculo esquelético. Dentre os modelos bastante utilizados estão os camundongos SCID, os Nude e os RAG2^{-/-}.

Os animais SCID, portadores de Imunodeficiência Combinada Severa, apresentam ausência de linfócitos T e B, devido à mutação no gene Prkdc (Proteinkinase DNA activated catalytic propeptide). Os animais Nude são caracterizados pela ausência do timo, um órgão linfóide primário onde ocorre a maturação do linfócito T. A ausência do timo é explicada por uma mutação do gene Foxn1 (Forkhead box N1). Como a maturação de linfócitos T nesses animais é deficiente, a resposta imunológica adaptativa é afetada. Já os animais Rag2^{-/-} são imunodeficientes devido a uma mutação no gene que codifica a enzima recombinase Rag2. Essa enzima é fundamental para o rearranjo das cadeias v(d)j dos linfócitos T e B. A ausência dessa enzima impossibilita a maturação dos linfócitos. Em alguns casos, foram utilizados animais duplo nocautes para Rag2 e cadeia γ comum a vários receptores de citocinas (Rag2^{-/-} γ C^{-/-}).

Todos esses modelos têm em comum o fato de possuírem alguma mutação que leva à diminuição parcial ou total da resposta imune adaptativa de base celular, o que permitiu o estudo da migração, proliferação, diferenciação e fusão dos mioblastos transplantados nos músculos destes animais imunodeficientes. Por exemplo, nosso Laboratório demonstrou que a eficácia do transplante de mioblastos humanos em animais Rag2^{-/-} γ C^{-/-} é maior que em outros animais imunodeficientes (Silva-Barbosa et al, 2005, 2008), e que a região onde primeiro as células transplantadas se alojam é rica em laminina (Silva-Barbosa

et al, 2008; Riederer et al, 2012). Mais recentemente foi mostrado que um microambiente pró-inflamatório inicial (logo após o transplante dos mioblastos humanos), favorece a proliferação, dispersão e fusão das células transplantadas no tecido muscular do hospedeiro Rag^{-/-}γC^{-/-} (Bencze et al, 2012).

Se de um lado é necessário conhecer as características microambientais do músculo receptor, que possam interferir na eficácia do transplantes de precursores miogênicos, de outro lado é preciso que, em termos de terapia humana e terapia experimental utilizando animais imunocompetentes, possamos de alguma maneira, impedir a resposta imune adaptativa celular, a qual leva inexoravelmente à destruição do tecido transplantado em condições alogênicas ou xenogênicas. Uma estratégia para se lograr essa situação é lançarmos mão de regras básicas de indução de tolerância imunológica. Há muitos poucos estudos utilizando esse tipo de abordagem na tentativa de se obter maior eficácia de transplante de precursores miogênicos. No entanto, em estudo recente (Camirand et al, 2008) induziu-se tolerância central utilizando-se sistema alogênico camundongo-camundongo no qual foi feita irradiação total seguida de re-população do animal com precursores de medula óssea. Ainda assim, em termos de medicina translacional, a tolerância central é muito difícil, e por isso a geração de tolerância oral pode representar um passo importante. Este modelo de indução de tolerância tem-se mostrado eficaz em diversos estudos (revisado em Faria, 2005).

Considerando que no presente estudo desenvolvemos um modelo de tolerância imunológica via oral, houvemos por bem introduzir um conjunto de conceitos básicos sobre esta estratégia de modulação da resposta imune adaptativa.

1.4. Tolerância Oral

O processo pelo qual o sistema imune evita a destruição de tecidos do próprio, via autorreatividade, é conhecido como autotolerância. Um grande número de linfócitos autorreativos são eliminados no interior dos órgãos linfoides primários em um processo conhecido como tolerância central. No entanto, para um número menor de linfócitos T autorreativos que escapam da deleção central

existe outro mecanismo que permite prevenir a autorreatividade num processo conhecido como tolerância periférica. O princípio da tolerância imunológica foi demonstrado no início da década de 1950 quando Medawar mostrou que fetos de camundongos da linhagem A injetados intraútero com células de camundongo da linhagem B, tornavam-se tolerantes especificamente a enxertos de pele da linhagem B na vida adulta (Billingham et al, 1953).

Entretanto, já na década de 1940 haviam sido feitas as primeiras observações em que a administração de dinitroclorobenzeno em azeite por via oral prevenia a sensibilização contra esse agente após várias injeções do mesmo via intracutânea (Chase, 1946). No final da década de 60, dois estudos demonstraram que nem sempre imunizações pelo trato gastrointestinal eram seguidas de estimulação antigênica (Crabbe et al., 1969; Rothberg; Kraft, 1967). Todavia, o primeiro trabalho efetivamente demonstrando que um estado de tolerância imunológica (mesmo que parcial) a uma determinada proteína poderia ser conseguido se esta fosse administrada previamente pela via oral, foi publicado em meados da década de 1970 (Thomas, Parrott, 1974). Parrott demonstrou que quando ratos eram alimentados com 25mg de BSA (albumina sérica bovina) durante 14 dias e imunizados com a mesma proteína na presença de CFA (adjuvante completo de Freund), ele atingia um estado de tolerância parcial, definido pela produção de anticorpos específicos no soro após 20 dias.

Alguns anos mais tarde definiu-se a tolerância oral como sendo uma supressão específica da resposta imune celular e/ou humoral a um determinado antígeno, se esse foi previamente administrado pela via oral (Vaz et al, 1977).

1.5. Meios e Mecanismos da Tolerância Oral

Atualmente é aceito que a tolerância imunológica resultante da administração oral de um antígeno não é programada nas linhagens germinativas, mas é adquirida durante a maturação do sistema imune por mecanismos que suprimem ou inativam clones antígeno-reativos (Weiner et al, 1994). Existem vários mecanismos de tolerância oral, os quais estão relacionados com a dose do antígeno administrada na fase de indução e não são mutuamente exclusivos. O primeiro mecanismo é a indução de células

supressoras (Mattingly; Waksman, 1978), T reguladoras (Tregs), pela ingestão de baixas doses do antígeno de forma contínua. Entretanto, ao se ingerir doses altas, dois efeitos poderão surgir: anergia (Melamed; Friedman, 1994) ou deleção dos clones respondedores (Afuwape et al, 2004). A baixa dose do antígeno irá estimular o GALT (tecido linfóide associado à mucosa intestinal) que irá gerar células Th2, secretoras de IL-4 e IL-10, e células Treg, secretoras de TGF- β , dando origem à supressão ativa, específica àquele antígeno (Weiner, 1999). Essa relação entre dose e efeito na tolerância oral não é excludente. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente: a geração de clones reguladores, produtores de TGF- β , e a deleção dos clones respondedores no momento do contato do antígeno, administrado via oral, no GALT.

É importante notar que a tolerização via oral não se aplica a todos os antígenos. Foi demonstrado que extratos sonicados de *Leishmania major*, *Leishmania donovani* ou *Staphylococcus aureus*, quando administrados oralmente, eram tolerogênicos. Todavia, a administração por via oral dos extratos de *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium* não gerava tolerância (Weiner, 1999). Ainda mais interessante, neste mesmo trabalho o autor mostrou que quando camundongos recebiam os extratos não-tolerogênicos de forma repetida, ele conseguia um efeito de imunização diretamente ligado ao número de doses orais do mesmo extrato. No entanto, o mesmo não acontecia com os extratos que geravam tolerância.

Outra particularidade da tolerância oral é a possibilidade de se gerar um efeito “bystander”, em que as células Treg antígeno-específicas geradas durante o tratamento oral, liberam TGF- β no sítio-alvo, e essa citocina pode suprimir a resposta contra outros antígenos presentes no local (Miller et al, 1991).

Inúmeros fatores podem afetar a geração de células T reguladoras, como por exemplo, o nível de co-estimulação, o microambiente onde a resposta imune está sendo gerada e a exposição de epítomos que podem favorecer a geração destas células (Weiner et al, 1994). No entanto, as células dendríticas que vêm ganhando destaque na indução de células T reguladoras no intestino. De fato, as células dendríticas intestinais são tolerogênicas, se comparadas às células dendríticas presentes na circulação sistêmica (Sun et al., 2007). Além disso,

estes mesmos autores descreveram um subtipo de célula dendrítica de fenótipo CD103⁺, isolada dos tecidos linfóides associados à mucosa intestinal, e que expressam a enzima retinal-dehidrogenase, envolvida no metabolismo de vitamina A em ácido retinóico. Este ácido, na presença de TGF- β , promove a conversão de células T virgens em células T reguladoras pelas células dendríticas.

1.6.A Mucosa Intestinal e a Tolerância Oral

A principal região de interação do antígeno administrado pela via oral é a mucosa do trato gastrointestinal. Sabe-se que essa mucosa é a maior área de exposição de antígenos no ser humano, com uma área em torno de 300m², com cerca de 10¹² células linfóides por metro quadrado, formando o GALT (tecido linfóide associado à mucosa gastrointestinal). Essa barreira é formada por uma única camada celular, mas é protegida por vários mecanismos físicos e químicos, e ainda como pela imunidade inata e adaptativa (Brandtzaeg, 2009).

Por outro lado, temos um grande número de bactérias que colonizam o nosso intestino e esse número chega a algo em torno de 10¹³-10¹⁴ bactérias (Neish, 2009), o que é dez vezes mais que o número de células em nosso corpo e essas bactérias contém no total, 150 vezes mais genes que o nosso genoma (Qin et al, 2010). O número de espécies varia muito dependendo dos hábitos, mas aceita-se que esse número oscila em torno de 1000 espécies e mais de 7000 cepas (Ley et al,2006). Nesse ambiente, não se encontram apenas bactérias, mas também vírus, protozoários, arque-bactérias e fungos.

O microbioma intestinal é dominado por dois filos de bactéria: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*(Xu et al, 2007). No trato gastrointestinal chega por ano em uma pessoa adulta, cerca de 30 kg de proteínas provenientes da alimentação e, deste total, 130-190g são proteínas que serão absorvidas por dia na alimentação (Brandtzaeg, 1998). Nesse contexto, em condições fisiológicas o GALT evolui de tal forma que não gera respostas imunes contra as bactérias comensais ou aos antígenos alimentares. Dessa forma, o GALT é um ambiente tolerogênico, mantido graças a um balanço complexo com participação de diversos fatores que contribuem para a sua manutenção.

1.7. Probióticos

O conceito de probiótico surgiu pela primeira vez quando Döderlein sugeriu que bactérias produtoras de ácido láctico inibiam o crescimento de patógenos (citado por Holzapfel et al, 2001). Ainda no início do século XX, Ilya Mechnikov propôs a utilização de microrganismos vivos para manter a saúde e o bom funcionamento intestinal, além de prolongar a vida. Atualmente, o termo probiótico é usado para descrever microrganismos que são benéficos à saúde do hospedeiro (Round & Mazmanian, 2009). Alguns critérios devem ser seguidos para que um microrganismo seja considerado probiótico:

1. Oferecer benefícios à saúde do hospedeiro;
2. Ser capaz de ser preparado de maneira viável e em larga escala;
3. Manter-se estável e viável durante o uso ou quando estocado;
4. Ser capaz de sobreviver no ecossistema intestinal por tempo suficiente para exercer seu efeito benéfico.

A maioria dos microrganismos probióticos utilizados comercialmente e em modelos de inflamação são bactérias lácteas gram-positivas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, isoladas do próprio trato gastrointestinal humano. Embora sejam escassos, existem trabalhos que demonstram que outras bactérias lácteas também podem ser consideradas probióticas. Dentre elas estão: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* e bactérias não lácteas como *Propionibacterium freudenreichii* e a gram-negativa *Escherichia coli* Nissle 1917). Como exemplo, pode-se citar o efeito da *Escherichia coli* Nissle 1917 ou da *Lactococcus lactis* sp *cremosis*, no modelo de colite induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS). Ambas as espécies foram capazes de inibir a infiltração celular inflamatória neste modelo (Revisado por Round, Mazmanian, 2009)

Existem 3 mecanismos que diferenciam e classificam os probióticos de acordo com o efeito benéfico que eles causam ao serem ingeridos (Lebeer, et al, 2010). Primeiro alguns probióticos podem excluir ou inibir microrganismos patogênicos. A inibição pode ocorrer via a produção de amônia, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Kullisaar et al, 2002; Cleveland et al, 2001). Já a

exclusão ocorre devido à competição por sítios de adesão no epitélio intestinal (Lee et al, 2003). O segundo mecanismo é a indução do aumento da função da barreira epitelial intestinal via a modulação de vias de sinalização que culminam, por exemplo, na produção de mais muco e defensinas, no funcionamento das junções oclusivas e na prevenção da apoptose de células epiteliais (Leeber et al, 2010). O terceiro modo baseia-se na modulação da resposta imune do hospedeiro, resultando tanto em efeitos locais quanto sistêmicos (Smits et al, 2005).

Apesar de existirem evidências substanciais provenientes de estudos *in vitro* e *in vivo* que suportam esses três mecanismos de ação dos probióticos, os resultados de estudos clínicos são bem menos convincentes (Goldin&Gorbach, 2008).

Particularmente em relação à bactéria *Lactococcus lactis*, viu-se que seu uso como pró-biótico tem um efeito positivo na modulação do sistema imune (Van Huynegem, et al 2009).

Estudos anteriores realizados pelo grupo de Ana Maria Caetano de Faria demonstraram que o *L. lactis* pode funcionar como carreador de proteínas importantes nas respostas inflamatórias, como HSP-65. Este mesmo grupo, havia demonstrado que o tratamento com HSP60 por via oral é capaz de inibir reações inflamatórias associadas à formação de placas de ateroma (Maron et al, 2002). Mais recentemente, utilizaram *L.lactis* como vetor para HSP-65, administrado oralmente, num modelo de encefalomielite alérgica experimental (Rezende et al, 2012)

Tendo claro o potencial terapêutico de *L. lactis* como modulador e carreador de antígenos aos quais se deseja inibir a resposta imune, resolvemos utilizar *L. lactis* administrado simultaneamente a extratos proteicos de mioblasto/miotudos como estratégia para tolerizar camundongos imunocompetentes.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo Geral:

Desenvolver um protocolo de indução de tolerância imunológica a transplante de precursores miogênicos humanos em camundongos imunocompetentes.

2.2. Objetivos Específicos:

- 2.2.1. Estabelecer em camundongos C57Bl/6 normais, um protocolo quantitativo de medida de resposta imune a antígenos de células musculares humanas.
- 2.2.2. Estabelecer modelo para indução de tolerância imunológica oral a antígenos de células musculares humanas.
- 2.2.3. Viabilizar o transplante xenogênico, tanto para fins terapêuticos, quanto para a compreensão dos mecanismos básicos de diferenciação muscular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Animais:

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 (H-2^b), machos ou fêmeas, com idades variando entre 8 e 12 semanas. Todos os animais utilizados foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Câncer e os protocolos aprovados segundo as normas institucionais de boas práticas para manipulação de animais de experimentação.

3.2 Mioblastos:

No presente estudo, foram utilizadas duas células diferentes como fonte de precursores miogênicos humanos. Inicialmente, utilizamos células retiradas do quadríceps por biópsia de uma criança de cinco anos, utilizando-se um protocolo já descrito previamente (Edom et al,1994). Essas células (CHQ) são primárias e, portanto possuem número limitado de passagens em cultura. Numa segunda etapa, utilizamos linhagem de mioblastos (LHCN-M2) retirados do músculo peitoral maior de um paciente de 41 anos, e que, ao contrário da preparação anterior, foram imortalizadas e, portanto, podem ser expandidas indefinidamente (Zhu et al,2007).

3.3 Cultivos de mioblastos humanos:

Para o cultivo da CHQ utilizamos o meio Ham-F10 (Gibco – Califórnia, EUA), suplementado com gentamicina (Life Tech, 5mg/L) e 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco – Califórnia, EUA), à 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ e saturada de água. Para o cultivo da LHCN-M2 utilizamos um meio composto de dois diferentes meios de cultura. Para fazer tal meio, utilizamos 1/5 de meio 199 (LGC, São Paulo, Brasil) e 4/5 de meio DMEM (*Dulbecco-modified Eagle Medium*) High Glucose (Gibco – Califórnia, EUA) e suplementamos com gentamicina (Life Tech, 5mg/L) e 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco – Califórnia, EUA), e mantivemos à 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂ e saturada de água. Para diferenciação, os mioblastos foram cultivados até 90% de confluência na garrafa. Após a confluência foram colocados em meio DMEM privado de SFB.

3.4 Extratos de células musculares humanas

Para a produção do extrato de células musculares humanas utilizadas na indução da tolerância e nos ensaios *in vitro*, cultivamos os mioblastos até 90% de confluência, e trocamos o meio de cultivo por DMEM sem SFB. Após 3 dias de cultivo com deprivação de SFB, os mioblastos encontraram-se em processo de diferenciação. A cultura apresenta mioblastos e miotubos, além de alguns miotubos fusionados. Nesse momento, tripsinizamos as células e fizemos alíquotas de 2×10^6 células/mL em PBS estéril. Em seguida, fizemos o extrato por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. O congelamento consistiu de 5 minutos em nitrogênio líquido e o descongelamento à 40°C por 5 minutos. Este material foi fervido por 10 minutos. Após esse procedimento, centrifugamos a 800g e recolhemos o sobrenadante. Para mensurar a concentração de proteínas no sobrenadante, utilizamos o método de Lowry.

3.5 Cultivo de *Lactococcus lactis*:

A linhagem bacteriana NCDO2118 de *Lactococcus lactis* sp *lactis* (*L. lactis*) é originada da coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para o cultivo de *L. lactis* foi utilizado o meio M17 (Difco) líquido suplementado com 1% de glicose (GM17). As bactérias foram crescidas a 30°C sem agitação por 24h. Após este período, foi medida a densidade ótica a 600nm (GeneQuant pro, Amersham/Bioscience). Uma vez que a densidade ótica a 600nm tenha atingido 2.0, foi realizado um novo inóculo em meio GM17 (5µL de bactérias em 25 mL de meio) para ser ofertado aos animais.

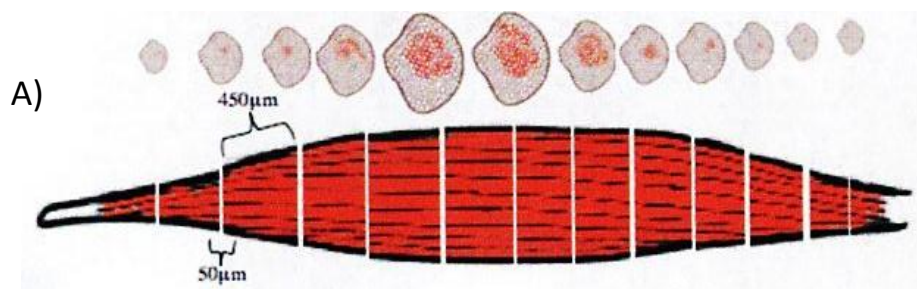
3.6 Transplante dos mioblastos:

Os camundongos foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma solução de ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Os músculos *tibialis anterior* (TA) dos camundongos passaram por três ciclos de crio-lesão (10 segundos sob uma peça metálica resfriada em nitrogênio líquido, com intervalo de 30 segundos por cada ciclo), para gerar o ambiente necessário

de regeneração, imediatamente antes a injeção de 5×10^5 mioblastos em $15 \mu\text{L}$ de PBS. A injeção foi realizada em um único ponto utilizando-se uma seringa Hamilton de $50 \mu\text{L}$. As análises foram realizadas no sétimo, décimo quarto dia e 1 mês após o transplante. Após o período indicado os animais foram eutanaziados em câmara de CO_2 . Em seguida o músculo TA foi retirado e montado em goma Tragacanth (6% - Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), congelado em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido e depois conservado à -80°C .

3.7 Histologia:

Todos os músculos foram cortados no sentido transversal em cortes de $5 \mu\text{m}$ utilizando-se o criostato CM1850 UV (Leica Microsystems Inc; Buffalo Grove, EUA) à -25°C . Para obtermos uma análise do músculo inteiro aproveitamos $50 \mu\text{m}$ (10 cortes) e depois pulamos outros $450 \mu\text{m}$ (90 cortes), sucessivamente até o final do músculo, como mostrado na figura 6.



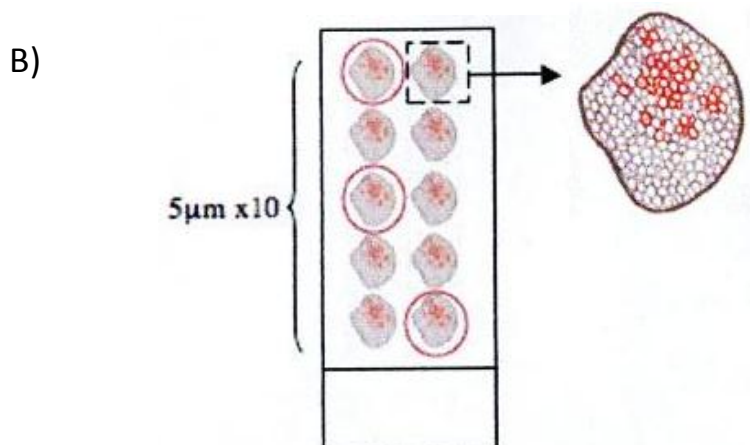


Figura 6. Ilustração da metodologia aplicada para as análises de presença das células injetadas. A) Ilustração do método empregado para a determinação da presença de células humanas no músculo *tibialis anterior* (TA) de camundongos imunocompetentes. O músculo TA foi inteiramente cortado em seções de 5µm no criostato. A cada 500µm, 10 cortes foram coletados em lâmina para obtenção de amostras regulares de todo o músculo analisado. B) Análise *in situ* de marcadores de interesse sobre a cinética de 5 e 30 dias após o transplante.

Os cortes foram fixados em acetona absoluta gelada por 10 minutos, e em seguida bloqueados com BSA 1% por 30 minutos e marcados com o anticorpo anti-lamina A/C (NCL-Lam-A/C, monoclonal IgG2b, Novocastra) por 1 hora e meia, utilizando-se o ARK kit para peroxidase (ARK™ (Animal Research Kit) Peroxidase, França).

3.8 Citofluorimetria para detecção de moléculas de superfície:

As células foram distribuídas em placas de 96 poços com fundo “V” (Nunc) na concentração de 1×10^6 células por poço, e em seguida foram adicionados 10 µL/poço de PBS com 10% de soro normal de camundongo. As placas foram mantidas a 4°C durante 10 minutos, visando ao bloqueio de sítios inespecíficos. Seguiu-se etapa de lavagem com PBS e centrifugação a 4°C, 450G durante 5 minutos. Após este período, os anticorpos diluídos em PBS foram adicionados, em volume final de 10µL, e incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro. Seguiu-se etapa de lavagem com PBS e centrifugação a 4°C, 450G durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspendido em

200µL de PBS contendo 1% de formaldeído. O material foi posteriormente adquirido utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). A análise dos fenótipos foi realizada utilizando-se o programa FlowJo Software (Tree Star, Standford, CA, USA).

3.9 Ensaios de proliferação celular com CFSE

Após a obtenção de células de linfonodos, estas foram ajustadas à concentração de 10^6 células em 1 mL de meio DMEM, e adicionado CFSE à concentração de 1µM em tubos de 15 mL. Em seguida, as células foram levadas a 37°C por 10 minutos, homogeneizadas suavemente e deixadas mais 5 minutos a 37°C. Foram acrescentados 10 mL de DMEM gelado e colocado durante 5 minutos a 4°C. As células foram centrifugadas a 4°C, por 5 minutos a 450G e o *pellet* ressuspenso em DMEM duas vezes, sendo colocadas em placa de 24 poços, na presença ou ausência do re-estímulo com extrato de mioblasto, durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida. Ao final da incubação, as células foram lavadas em PBS, marcadas com anticorpos anti-CD3, e imediatamente adquiridas no citômetro de fluxo FACS Calibur (BD, ST Diego, CA, USA).

3.10 Ensaios de proliferação celular com bromodeoxiuridina (BrdU)

Após a obtenção das células de linfonodos, estas foram ajustadas na concentração de 4×10^5 células por 200µL de meio DMEM e colocadas em placas de 96 poços com fundo em U. Nas últimas 18 das 72 h totais de incubação à 37°C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida, foi adicionado o BrdU na concentração de 10µM. Ao final da incubação, as células foram lavadas em PBS, marcadas com anticorpos anti-CD3, sendo então fixadas em paraformaldeído 2% em PBS por 30 minutos a 37°C. A seguir, as células foram permeabilizadas com etanol 70% (Merck) por 30min à -20°C, lavadas e tratadas com 100U/ml de DNase (Sigma-Aldrich) em 0,15M NaCl, 4.2mM MgCl₂ e 10µMHCl (pH=5) por 40 minutos a 25°C. As células foram novamente lavadas e foi adicionado o anticorpo anti-BrdU FITC (eBioscience), prosseguindo incubação por 30 minutos à 37°C. As células foram lavadas e a incorporação de BrdU na população de linfócitos T foi determinada por citometria de fluxo.

3.11 Detecção de morte celular por iodeto de propídeo

Solução de iodeto de propídeo (PI, 500 μ M) foi adicionada a suspensões celulares, diluída em solução tampão (450 μ L de água destilada + 50 μ L de tampão de ligação 10X, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) 1:10. A leitura no FacsCalibur se deu imediatamente após a adição da solução com PI.

3.12 Avaliação da concentração de citocinas

Após a eutanásia dos animais, os linfonodos drenantes ao transplante ou estímulo (poplíteo) e não-drenantes (axilar e braquial) foram retirados e macerados. As células totais foram contadas e colocadas em placa de 24 poços contendo 10⁶ células por poço em 1mL de DMEM high glucose e estimuladas ou não com 30 μ g de extrato de mioblasto por poço. Para controle positivo, utilizamos células estimuladas com ConA (concanavalin A – Sigma Aldrich). Após 72 h, o sobrenadante de cada poço foi recolhido e estocado à -20°C até o momento da análise. Para a detecção de citocinas de interesse, utilizamos o ensaio imunoenzimático ELISA. Cada ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Medimos por ELISA as concentrações das citocinas IL-10, IFN- γ e IL-2.

3.13 Análise Estatística

Para o acompanhamento dos animais pós-transplantes, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, considerando as diferenças significantes quando $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados utilizando-se o pacote computacional GraphPad Prism®5.0.

3.14 Protocolos Experimentais para indução de tolerância oral

Utilizamos três protocolos diferentes para indução de tolerância oral, conforme descrito nas figuras 7, 8 e 9. Em um deles foram introduzidos apenas extratos de células musculares humanas, e as imunizações foram feitas em presença de adjuvante completo de Freund. No segundo protocolo, utilização a bactéria *Lactococcus lactis*, ingerida juntamente com a gavagem de extratos de células

musculares humanas. Neste protocolo, a imunização posterior foi realizada em presença de hidróxido de alumínio, adjuvante que pode ser usado em humanos. No terceiro protocolo todos os grupos foram imunizados e introduzimos mais um controle que somente bebia a bactéria e não recebeu o extrato de músculo humano por gavagem.

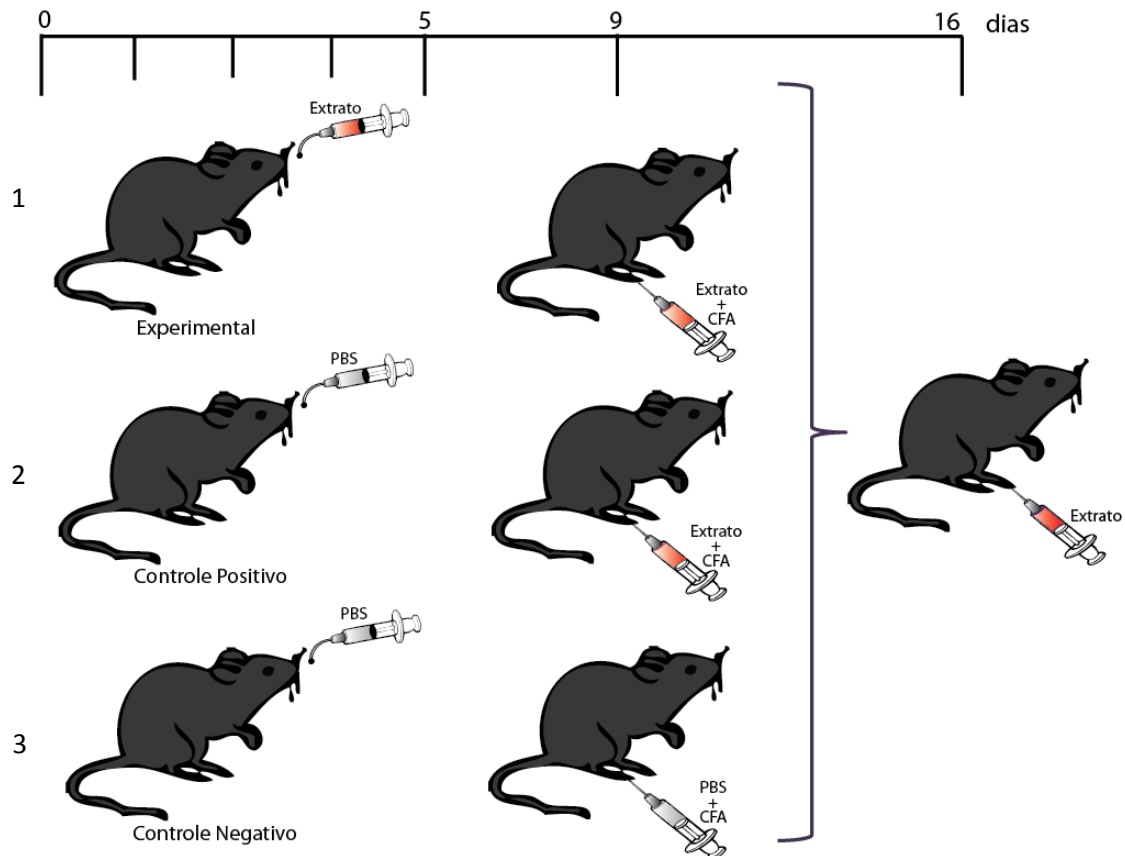


Figura 7. Protocolo de tolerização oral sem utilização de probiótico. Em (1) os grupos controles receberam PBS por gavagem durante cinco dias contínuos e o grupo experimental recebeu extrato de células musculares humanas pelo mesmo período. Após quatro dias, (2) os grupos controle-positivo e experimental foram imunizados com o extrato de proteínas de células musculares humanas em presença de adjuvante completo de Freund (CFA). O grupo controle recebeu CFA mais PBS. Após uma semana, (3) todos os três grupos receberam uma nova injeção do extrato na pata contralateral.

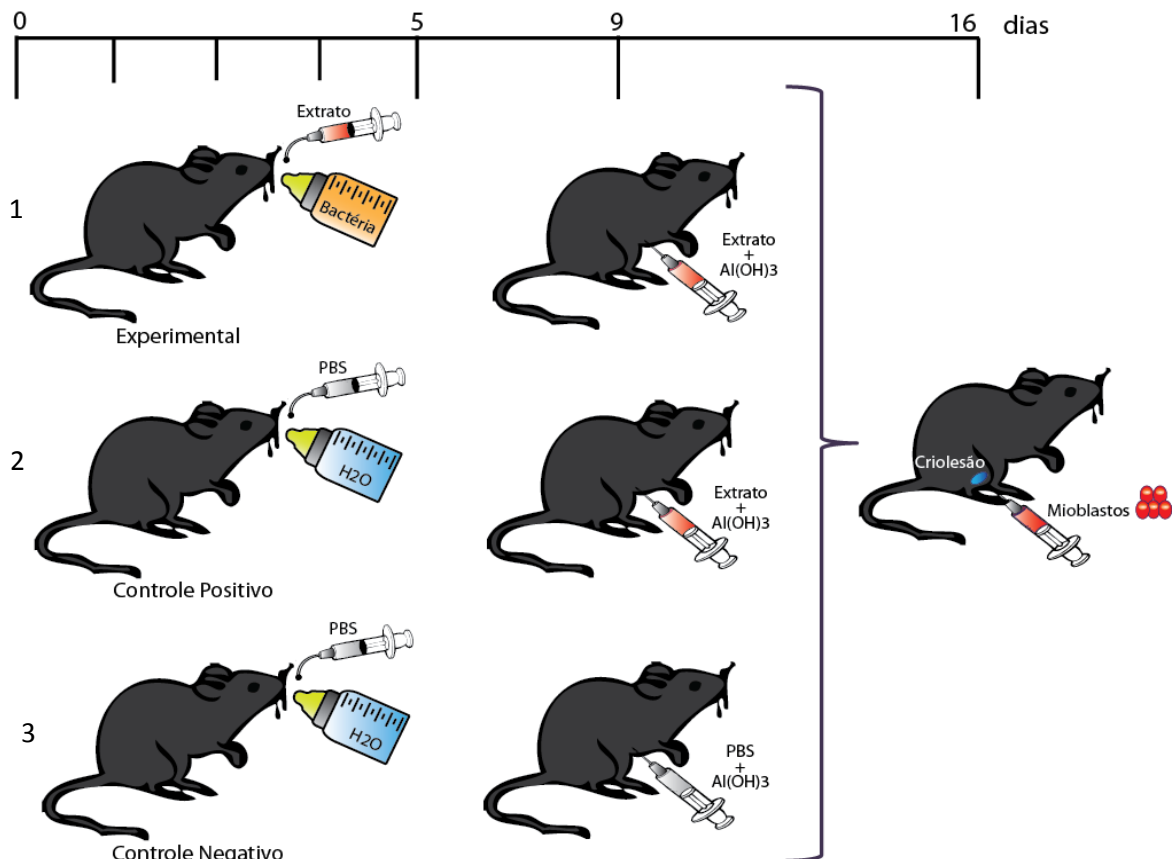


Figura 8. Protocolo de tolerização oral em presença de probiótico. O grupo experimental tomou livremente, durante 5 dias a bactéria *Lactococcus lactis*. Esse grupo tomou por gavage o extrato do células musculares humanas pelo mesmo período. Os demais grupos receberam água na mamadeira e PBS por gavage. Após 4-7 dias, os animais foram imunizados. Os grupos controle positivo e experimental receberam uma injeção intraperitoneal de hidróxido de alumínio e extrato de células musculares humanas. O grupo controle negativo apenas recebeu o hidróxido de alumínio com PBS. Uma semana depois, todos os grupos foram transplantados após crio-lesão do músculo *tibialis anterior* com 5×10^5 mioblastos.

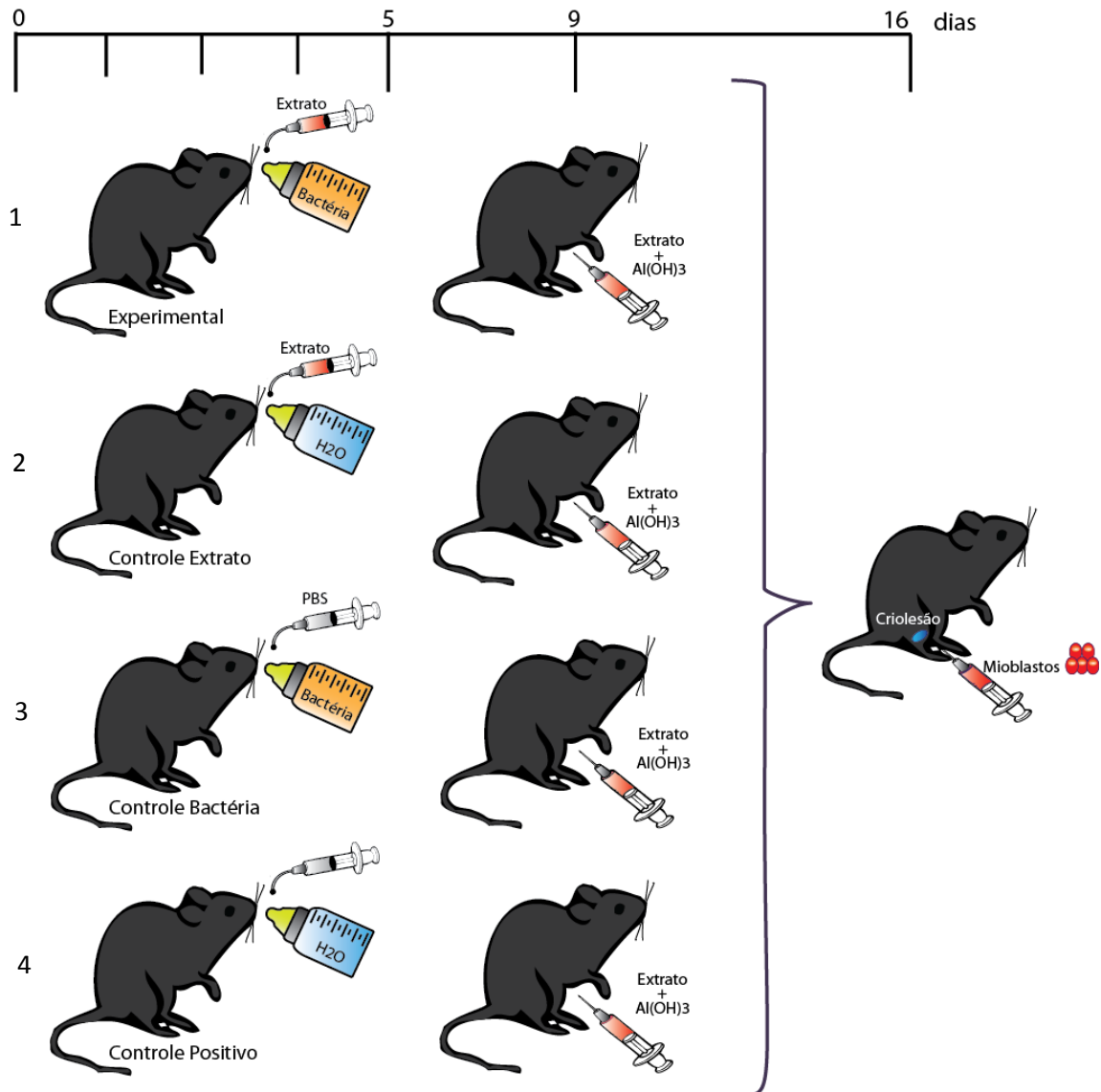


Figura 9. Segundo Protocolo de tolerização oral em presença de probiótico. O grupo 1 tomou livremente, durante 5 dias a bactéria *Lactococcus lactis*. Esse grupo tomou por gavagem o extrato de células musculares humanas pelo mesmo período. O grupo 2 bebeu água na mamadeira e extrato de músculo humano por gavagem. O grupo 3 recebeu *L. lactis* na mamadeira e PBS humano por gavagem. E o grupo 4 bebeu água e PBS por gavagem. Após 4-7 dias, todos os grupos foram imunizados com uma injeção intraperitoneal de hidróxido de alumínio e extrato de células musculares humanas. Uma semana depois, todos os grupos foram transplantados após crio-lesão do músculo *tibialis anterior* com 5×10^5 mioblastos.

4. RESULTADOS:

4.1 Avaliação da imunogenicidade do extrato de células musculares humanas:

Inicialmente investigamos se o extrato de células musculares humanas era imunogênico, ou seja, capaz de gerar uma resposta imune que pudesse ser quantificada. Esse passo inicial foi fundamental para os demais experimentos, pois, caso contrário não seria possível dizer, imunologicamente, se o protocolo de tolerização era capaz de modular a resposta contra o extrato da célula.

Para isso, dividimos os animais em dois grupos: controle positivo e controle negativo. O primeiro grupo foi imunizado no coxim plantar com 100µg do extrato de células musculares humanas juntamente com CFA. O segundo grupo foi imunizado no coxim plantar somente com CFA e PBS. Após uma semana, os animais foram eutanaziados e os linfonodos poplíteos foram retirados, tendo sido colocados em cultivo na presença de diferentes concentrações do extrato (figura 9).

Esse resultado nos mostra que o extrato de células musculares humanas é capaz de gerar uma resposta imune de tal forma que podemos quantificar posteriormente o percentual e o número de células que respondem a um reestímulo *in vitro* ao mesmo extrato. Ainda, verificamos uma relação diretamente proporcional à concentração do extrato utilizada no reestímulo *in vitro*. Com isso foi escolhida a concentração ideal para os próximos experimentos *in vitro* de 30µg por mililitro (de DMEM 10%SFB).

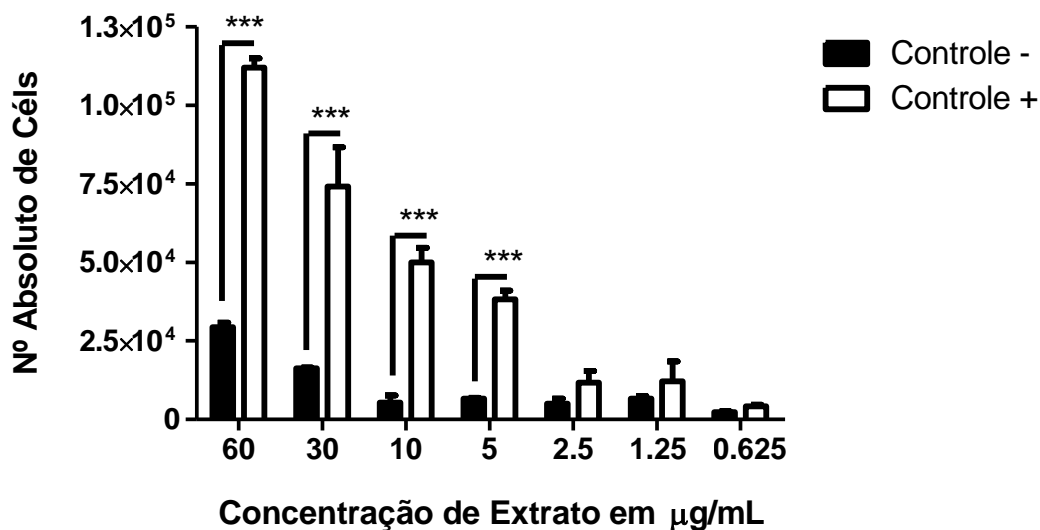


Figura 10. Imunogenicidade do extrato de células musculares humanas em camundongos normais. Utilizamos células do linfonodo poplíteo de animais previamente imunizados pelo extrato (grupo controle positivo) ou tratadas apenas com CFA (controle negativo). Como medida de proliferação linfocitária induzida de forma específica pelo extrato antigênico, as células foram marcadas com CFSE e 2×10^6 foram colocadas em cultura. Diferentes concentrações do extrato foram utilizadas para determinar se o extrato era imunogênico e qual era a melhor concentração do mesmo a ser utilizada para ensaios futuros. O gráfico representa o percentual de células que diluíram CFSE, corrigido pelo número inicial das mesmas. N=3 experimentos com 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$

4.2 Fenótipo de subpopulações de linfócitos T em linfonodos drenantes após indução de tolerância via oral a antígenos de extrato de células musculares humanas

Tendo sido observado que o extrato de mioblasto era capaz de gerar uma memória imunológica, iniciamos protocolos visando a conseguir um estado de tolerância imunológica a mesmo extrato. Iniciamos pelo uso do protocolo ilustrado esquematicamente na figura 7. Um dia após a segunda injeção de extrato na pata contralateral, foi feita a análise das diferentes subpopulações linfocitárias dos linfonodos drenantes (Figuras 10 e 11).

Observamos um aumento no número absoluto de linfócitos B no linfonodo drenante dos animais do grupo do controle positivo quando comparados aos animais do controle negativo. Nas demais subpopulações não vimos diferenças estatisticamente significativas, embora houvesse uma tendência a uma

diminuição de linfócitos T no grupo submetido à tolerização oral (grupo experimental), quando comparado ao controle positivo, imunizado não-tolerizado.

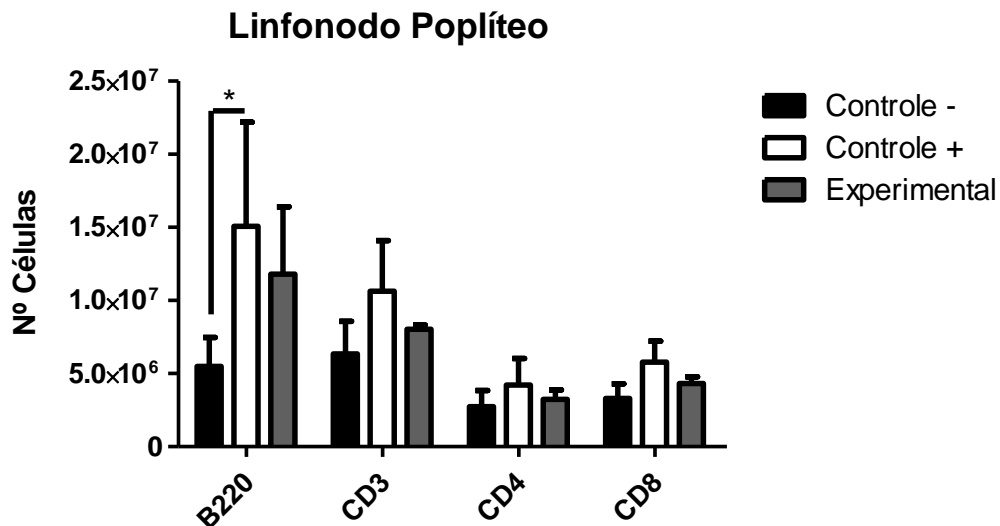


Figura 11. Número de linfócitos nos linfonodos drenantes em camundongos imunizados ou não com extrato de células musculares humanas, na tentativa ou não de geração de tolerância via oral. Todos os grupos passaram pelo mesmo protocolo como mostrado na fig. 7. Um dia após a última injeção do extrato os linfonodos drenantes foram excisados e foi feita a contagem de células. As células foram então marcadas com os respectivos anticorpos, lidas e analisadas por citometria de fluxo. N=3 experimentos com 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Neste mesmo experimento, quantificamos o número de células T de fenótipo regulador, presentes nos linfonodos drenantes, assim como células T expressando CD25, mas não o fator de transcrição FoxP3, portanto devendo-se tratar de linfócitos T efetores. Não observamos diferenças significativas entre nenhum dos grupos (figura 11 a-b), devido às grandes diferenças do número de células encontradas nos diferentes experimentos.

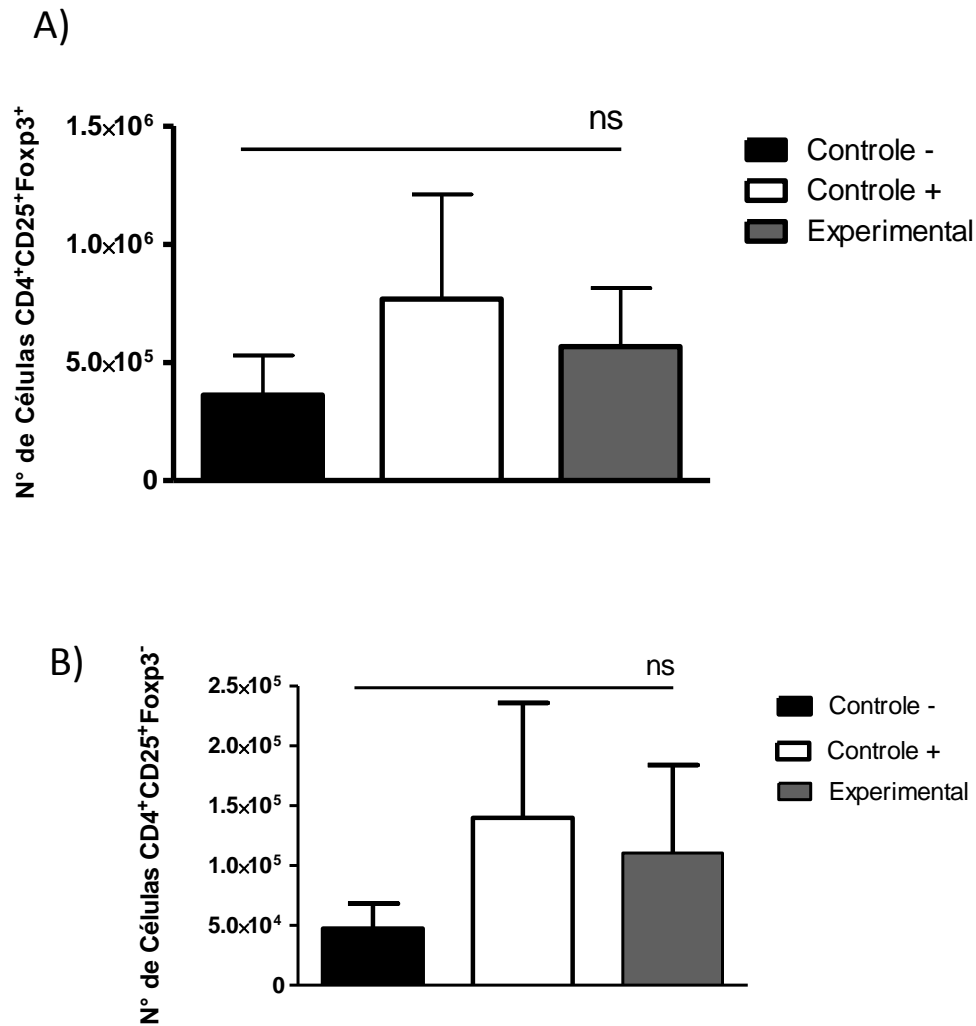
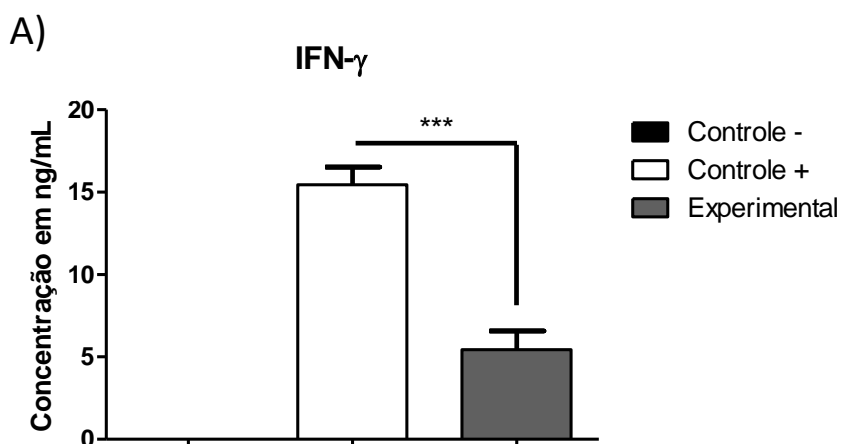


Figura 12. Número absoluto de linfócitos T CD4 de fenótipos regulador e T efectoras nos linfonodos drenantes (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻, respectivamente) de camundongos submetidos ou não ao protocolo de tolerização oral, e imunizados com extrato de células musculares humanas. Todos os grupos passaram pelo mesmo protocolo como mostrado na fig. 1. Um dia após a última injeção do extrato os linfonodos drenantes foram excisados e foi feita a contagem de células. Após, as células foram marcadas com os respectivos anticorpos e as aquisições foram feitas no citômetro FACSCalibur. N=3 experimentos com 6-8 animais por grupo. ns = não significativo estatisticamente

4.3 Modulação da resposta imune antígeno-específica, após indução de tolerância via oral a extrato de células musculares humanas

Apesar de não termos observado diferenças estatisticamente significativas em termos de números absolutos de diferentes subpopulações linfocitárias nos linfonodos drenantes, observamos modulação da resposta imune, entre animais submetidos ao 1.º protocolo de tolerização via oral (portanto com gavagem de extrato de células musculares, mas na ausência de pró-biótico). Vimos que, após 72 horas de cultivo de linfócitos dos linfonodos drenantes, após imunização ou não, e em presença de reestímulo com extrato de células musculares houve modulação nos níveis de citocinas produzidas localmente, conforme evidenciado pela técnica de ELISA a produção de citocinas (Figura 12a-b), com redução significativa na produção de IFN- γ quando comparamos os grupos controle positivo e experimental, enquanto o grupo negativo não apresentou produção dessa citocina pró-inflamatória, sugerindo portanto uma diminuição na resposta do tipo Th1 nos animais submetidos ao protocolo de tolerização. Interessantemente, a produção de IL-10 também foi completamente inibida nos animais tolerizados, quando comparados aos camundongos imunizados, não tolerizados. Por outro lado, não conseguimos detectar níveis de IL-4 em quaisquer dos grupos analisados.



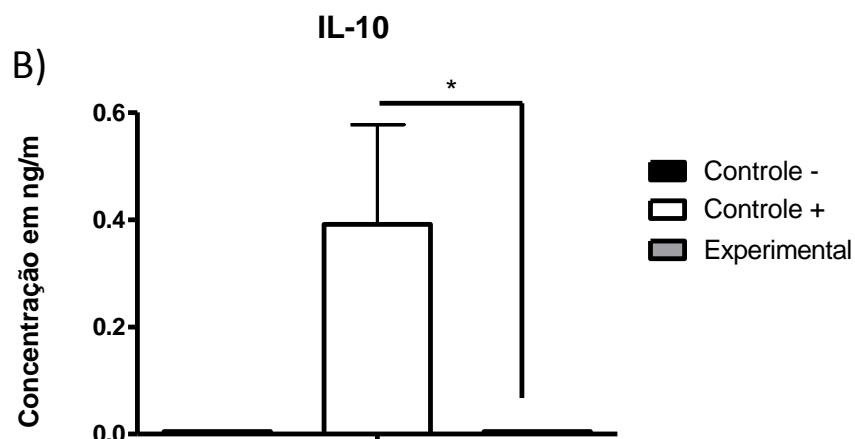


Figura 13. Modulação na produção de interferon- γ e Interleucina-10 por linfócitos provenientes de linfonodos de animais submetidos a protocolo de tolerização via oral as extrato de células musculares humanas. Células de linfonodos dos grupos descritos na figura 7 foram colocadas em 1 ml de meio contendo ou não o extrato de mioblasto. Após 3 dias os sobrenadantes desses cultivos foram retirados e analisados por ELISA para a presença das citocinas mencionadas. A produção de ambas as citocinas IFN- γ e IL-4 foi drasticamente diminuída nos animais submetidos ao protocolo de tolerização oral. Dados obtidos de 3 experimentos com 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Procuramos em seguida avaliar a resposta proliferativa de linfócitos provenientes de linfonodos drenantes, de camundongos dos 3 grupos descritos no protocolo de tolerização via oral mostrado na figura 7. Nestes experimentos, um dia após a segunda injeção do extrato, retiramos os linfonodos poplíteos, coramos as células com CFSE e deixamos 2 milhões de células em cultivo, em presença do extrato de células musculares humanas. Vimos uma redução de mais 60% na proliferação das células do grupo experimental (submetido à tolerização via oral) quando comparadas com o controle positivo, apenas imunizados. (Figura 13).

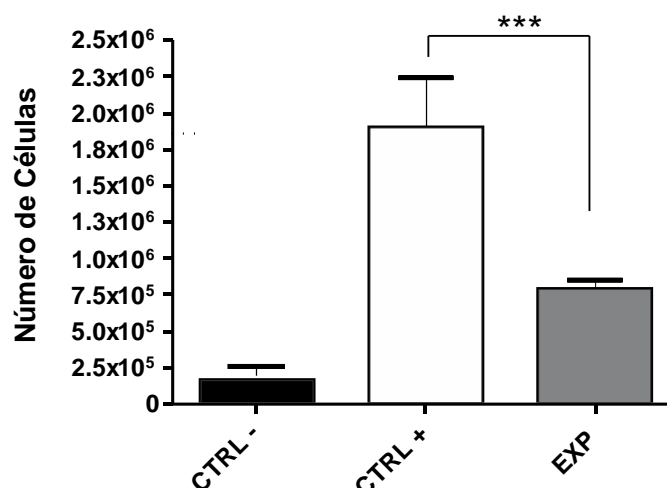


Figura 14. Modulação na proliferação de linfócitos T (CD3-positivos) provenientes de linfonodos de animais submetidos a protocolo de tolerização via oral as extrato de células musculares humanas. Células de linfonodos dos grupos descritos na figura 7 foram contadas e coradas com CFSE. Dois milhões de células foram então cultivadas em 1mL de meio DMEM completo com 10%SFB na presença do extrato de células musculares. Após 3 dias, as células foram retiradas e marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD3, para selecionar os linfócitos T, e PI, para excluir as células mortas. A resposta proliferativa foi drasticamente diminuída nos animais submetidos ao protocolo de tolerização oral. Dados obtidos de 3 experimentos com 6-8 animais por grupo. *** $p < 0,001$.

Tomados em conjunto, esses dados mostraram que a estratégia para desenvolvimento de tolerância via oral, foi de fato capaz de modular negativamente a resposta imune específica ao extrato de células musculares humanas.

Considerando os dados mencionados anteriormente sobre o papel de pró-bióticos como coadjuvantes na indução de tolerância oral, procuramos desenvolver um segundo protocolo (ilustrado na figura 8) segundo o qual administramos extrato de células musculares humanas por gavagem, simultaneamente à ingestão *ad libitum* da bactéria *L. lactis*.

4.4 O tratamento oral modula a resposta após 1 semana de transplante:

Como forma de avaliar o transplante de mioblasto, os animais foram eutanasiados e tiveram o linfonodos drenantes (poplíteo) e não-drenantes (facial, braquial e axilar) ao enxerto retirados uma semana após o transplante. As células foram colocadas em cultura na presença da mesma concentração do extrato de

mioblasto utilizada previamente para avaliar a proliferação por incorporação de BrdU (figura 14 a-b).

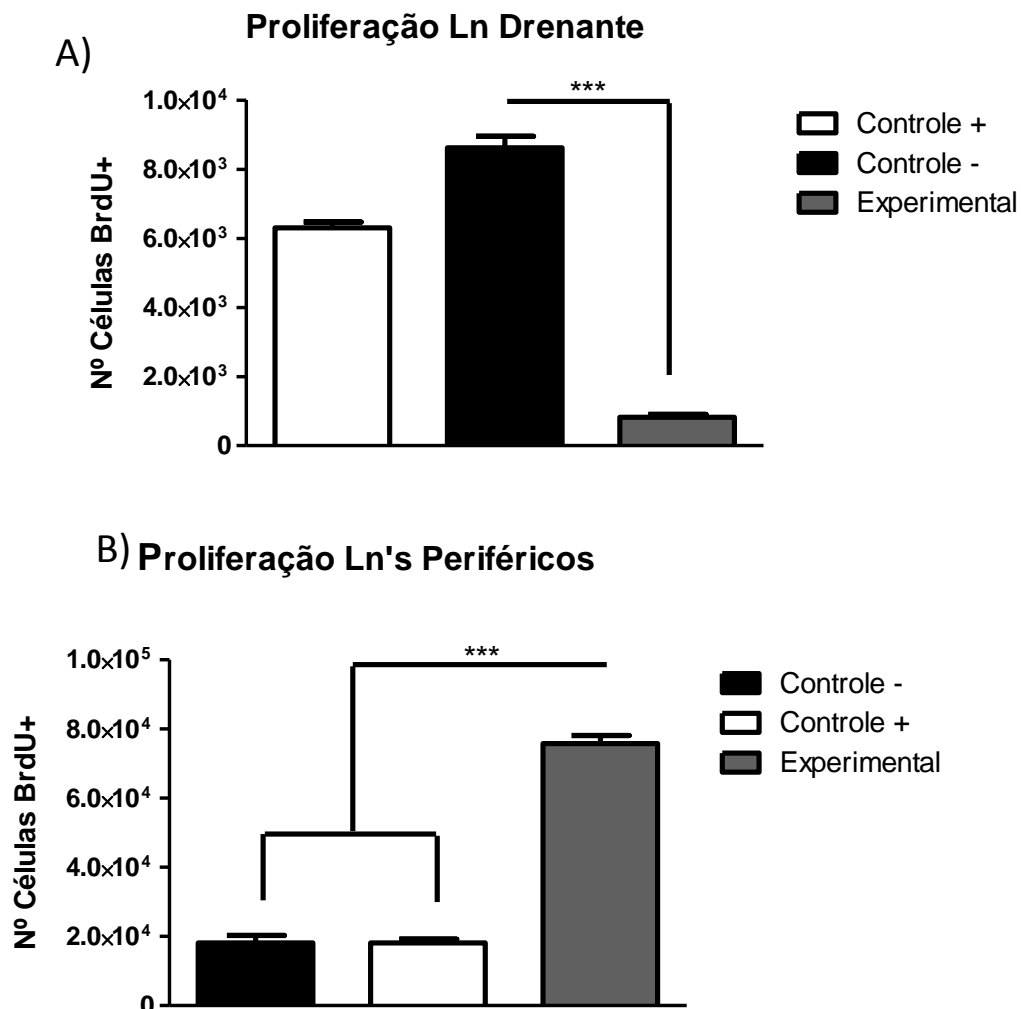


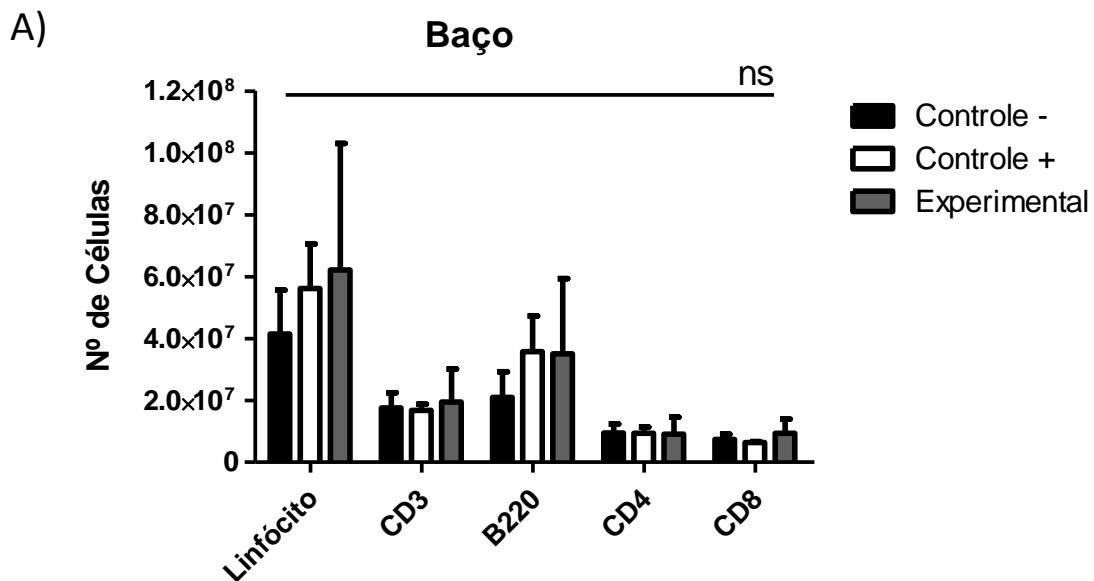
Figura 15. Após o transplante o tratamento oral regula a resposta imune de forma localizada. Uma semana após o transplante o linfonodo poplíteo e os demais periféricos foram retirados, e 2×10^6 células foram aliqüotadas e colocadas em cultura na presença do extrato do mioblasto. No segundo dia de cultura, 18 h antes da retirada das células, foi adicionado BrdU na cultura. No terceiro dia as células foram retiradas e analisadas por citometria de fluxo. O número total de células proliferando foi corrigido pela celularidade dos linfonodos. N= 2 repetições com 5 animais por grupo. ** $p < 0,01$

Pode-se notar que, enquanto nos demais controles ocorre uma maior proliferação frente ao extrato do que nos animais do grupo experimental, quando analisamos o linfonodo drenante (fig.8a). Entretanto, quando olhamos para os demais linfonodos (facial, axilar e braquial), ocorre o contrário. O maior número

de células em proliferação contra o extrato se encontra no grupo experimental. Isso pode nos indicar que esteja ocorrendo um efeito de supressão local da resposta imune contra o extrato das células após o transplante das mesmas.

4.5 Uma semana pós-transplante não há variação no baço

Tendo visto que após 1 semana de transplante ocorre uma regulação da resposta imune nos linfonodos drenantes, foi-se verificar se estaria havendo alguma modulação nas subpopulações dos linfócitos. Pela limitação do número de células não foi verificado essas subpopulações nos linfonodos, mas sim nos baços desses animais transplantados. O baço de cada animal foi retirado e macerado e as células foram marcadas com os anticorpos de interesse (figura 15). Não houve diferenças significativas no percentual ou no número de células de diferentes fenótipos quando comparadas entre os 3 grupos.



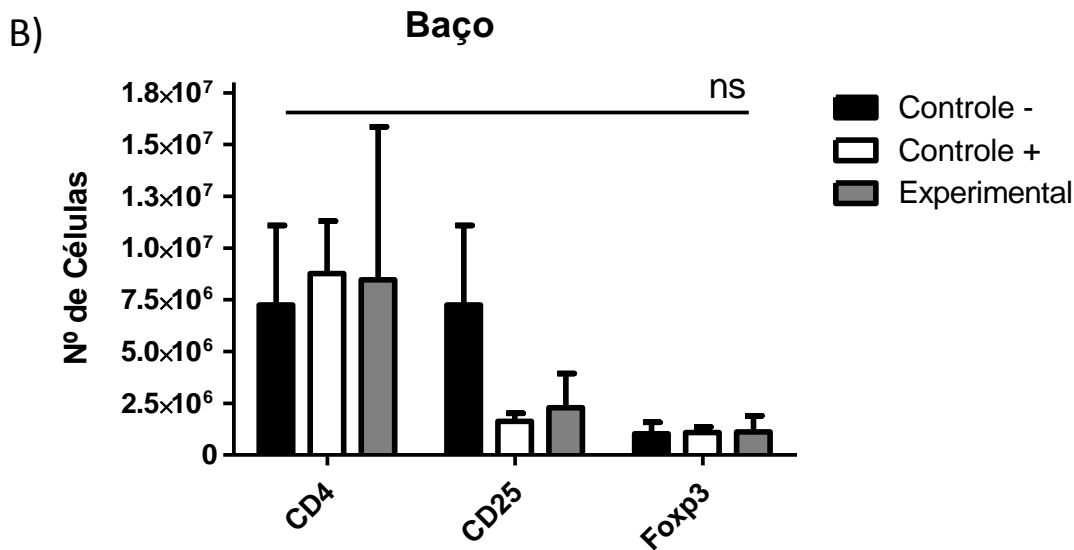


Figura 16. Após o transplante não há diferenças nas subpopulações de linfócitos. Todos os grupos passaram pelo protocolo descrito na figura 7. Uma semana pós-transplante, o baço de cada animal foi retirado e análises foram feitas por citometria de fluxo a fim de quantificar a população de cada tipo celular presente nos baços. N= 2 repetições, com 5 animais por grupo.

4.7 Um mês pós-transplante há modulação da resposta imune:

Tendo clara a possibilidade de modular a resposta à mioblastos humanos pelo tratamento oral, partimos para os testes de avaliação do transplante. Neste caso, introduzimos a administração de *L. lactis ad libitum* juntamente com a gavagem do extrato como mostrado na figura 8. Como a avaliação da pega do transplante será feita em um mês, verificamos se após este período e com o novo protocolo a inibição da resposta seria mantida.

Para avaliar a capacidade proliferativa das células dos linfonodos drenantes 1 mês após o transplante, retiramos os linfonodos, coramos com CFSE e colocamos em cultura na presença do extrato de mioblasto como fonte de reestímulo (figura 16)

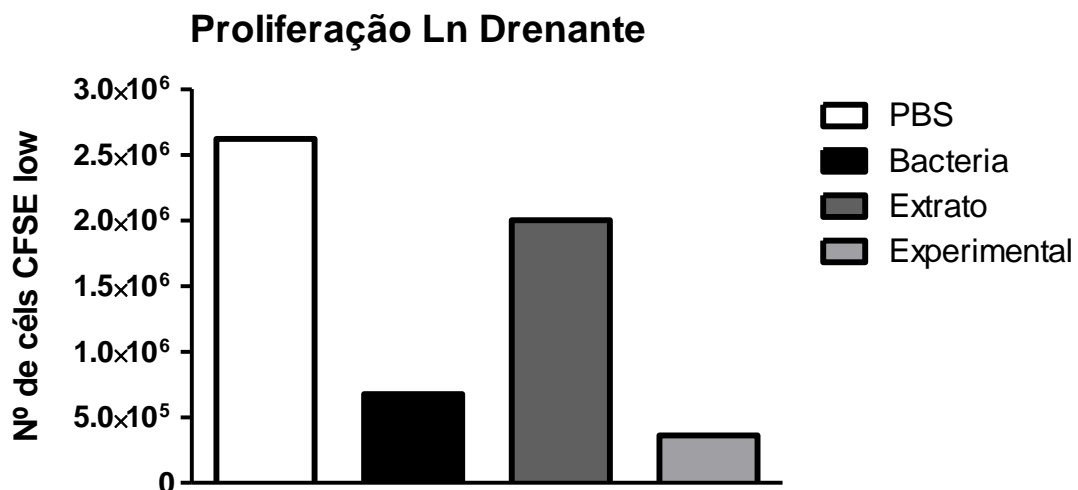


Figura 17. Um mês pós-transplante parece ocorrer regulação do sistema imune. As células dos linfonodos drenantes foram contadas e coradas com CFSE. 2×10^6 células foram colocadas com 1 mL de meio DMEM 10%SFB na presença de 30 μ g de extrato de mioblasto. Após 72 h as células foram recolhidas contadas e adquiridas no FacsCanto para avaliar a diluição de CFSE. As células foram analisadas no FlowJoTreeStar®. N = 1 experimento com 3 animais por grupo.

A figura 17 mostra que ocorre uma diminuição na proliferação do grupo experimental quando comparado com o grupo PBS e Extrato, demonstrando que mesmo após 1 mês há ainda uma regulação do sistema imune nos linfonodos drenantes.

Em seguida perguntou-se sobre o perfil das células T reguladoras nesses linfonodos drenantes. Para isso, foram retirados os linfonodos drenantes dos animais transplantados após 1 mês e as células foram imuno marcadas para CD4, CD25 e Foxp3 (figura 17).

Nº Treg LnDrenante 1 mês

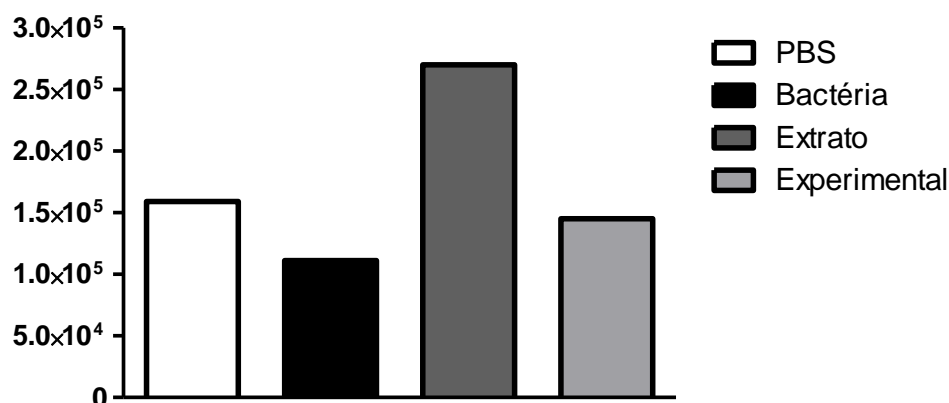


Figura 18. Não parece haver diferenças entre as Tregs. Para avaliar o número de células T reguladoras nos linfonodos drenantes, marcamos o linfonodo com os anticorpos anti-CD4, anti-CD25 e anti-Foxp3. Depois ajustamos o percentual encontrado para o número de células do linfonodo quando este foi retirado. As células foram adquiridas citômetro FacsCanto II e analisadas no programa FlowJoTreeStar®. N = 1 experimento com 3 animais por grupo.

Os resultados obtidos com esse experimento único indicam que, um mês após o transplante, não há modulação importante do número de células T reguladoras presentes no linfonodo drenante dos diferentes grupos.

No mesmo experimento foi avaliado o número das diferentes subpopulações nos baços dos animais (figura 18). Para isso, os baços foram retirados, macerados e contados. Suas células foram coradas com os anticorpos anti-CD3, anti-B220, anti-CD4 e anti-CD8 e depois adquiridas no FacsCanto.

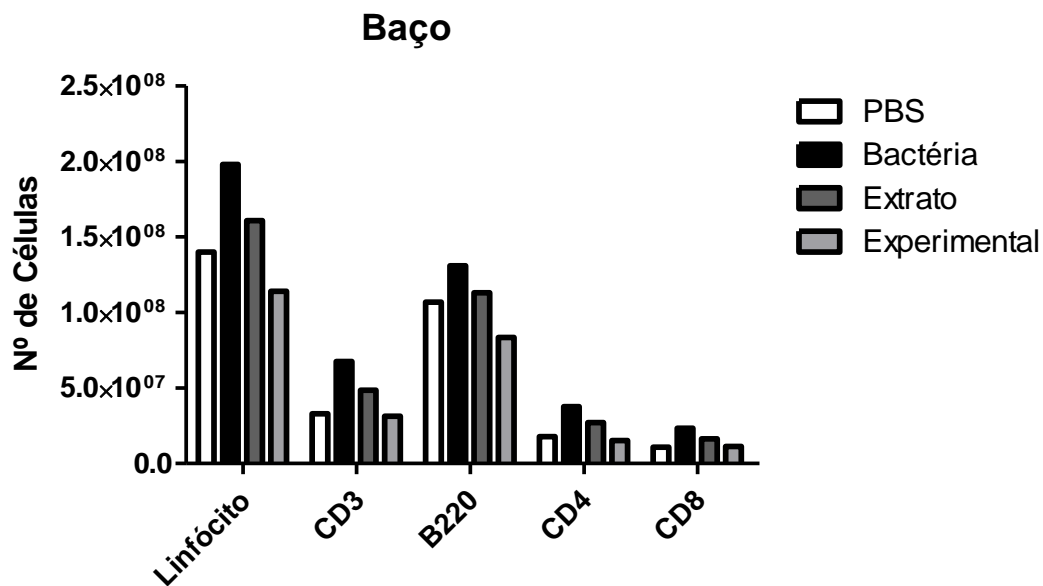


Figura 19. Não há mudança nas subpopulações de linfócitos no baço 1 mês após o transplante. Para avaliar os diferentes tipos celulares nos baços, marcamos o linfonodo com os anticorpos anti-CD3, anti-B220, anti-CD4 e anti-CD8. Depois ajustamos o percentual encontrado para o número de células do baço quando este foi retirado. As células foram adquiridas no FacsCanto e analisadas no FlowJoTreeStar®. N = 1 experimento com 3 animais por grupo

4.8 Tolerância oral com *L.lactis* e extrato de mioblastos/miotubos permite pega do transplante.

Como podemos observar nas figuras 20-25, células humanas estão presentes no músculo do camundongo 1 mês pós-transplante. Para essa análise usamos dois anticorpos específicos para proteínas humanas. O anti-lamina A/C, que reage com duas isoformas da proteína estrutural de envelope nuclear, a lamina A e a lamina C, e o anti-espectrina, que reage com a proteína de citoesqueleto de mesmo nome. Todos os cortes foram corados com anti-lamina A/C, em verde, para nos mostrar a organização do tecido, DAPI para núcleo e anti-lamina A/C e/ou anti-espectrina em vermelho.

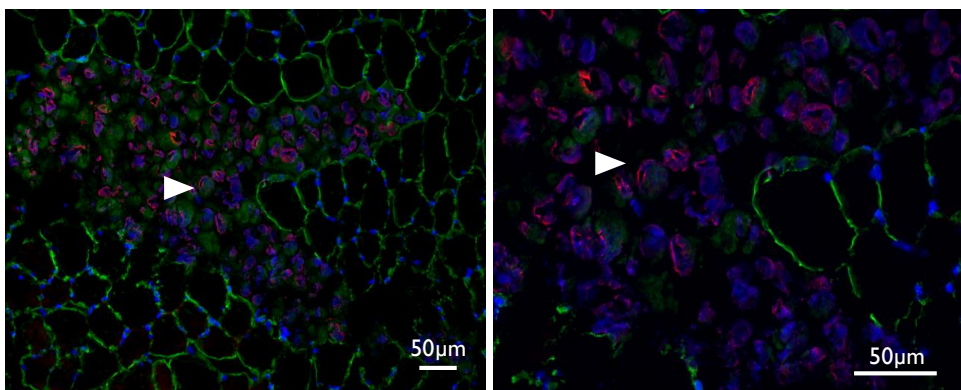


Figura 20. Presença de células humanas em músculo tibialis anterior (T.A) de camundongo C57BL/6 imediatamente após o transplante. Esse animal teve o músculo T.A. crio-lesionado e em seguida mioblastos humanos foram transplantados no músculo. Imediatamente após o transplante o animal foi sacrificado e o músculo T.A foi retirado, congelado e secções de 5 um foram feitas. As setas brancas indicam a presença do mioblasto humano no músculo do camundongo. Os mioblastos humanos foram marcados com anti-lamina A/C (vermelho), também marcamos a laminina com anticorpo anti-laminina (verde) e o núcleo foi corado com DAPI (azul).

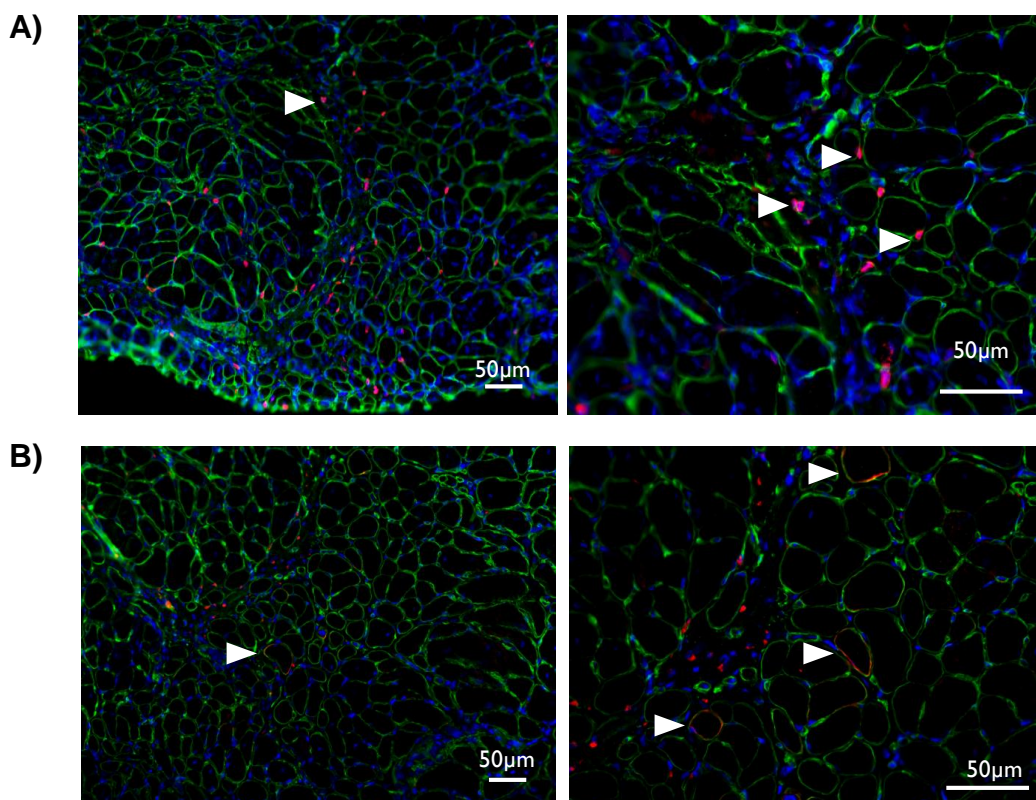


Figura 21. Presença de mioblastos humanos em músculo de camundongo RAG-KO 1 mês após transplante: Podemos observar pela marcação positiva em lamina A/C (A) e espectrina (B) a presença de mioblastos humanos no músculo de um camundongo imunodeficiente após 1 mês de transplante. Essas células em camundongo imunodeficientes foram capazes de repor o estoque de células satélites

de se fundir em fibras de camundongo reparando a mesma, como podemos notar nas células indicadas por setas brancas. Utilizamos esses cortes como controle positivo de marcação para as células humanas. Os mioblastos humanos foram marcados com anti-lamina A/C ou anti-espectrina(vermelho), também marcamos a laminina com anticorpo anti-laminina (verde) e o núcleo foi corado com DAPI (azul).

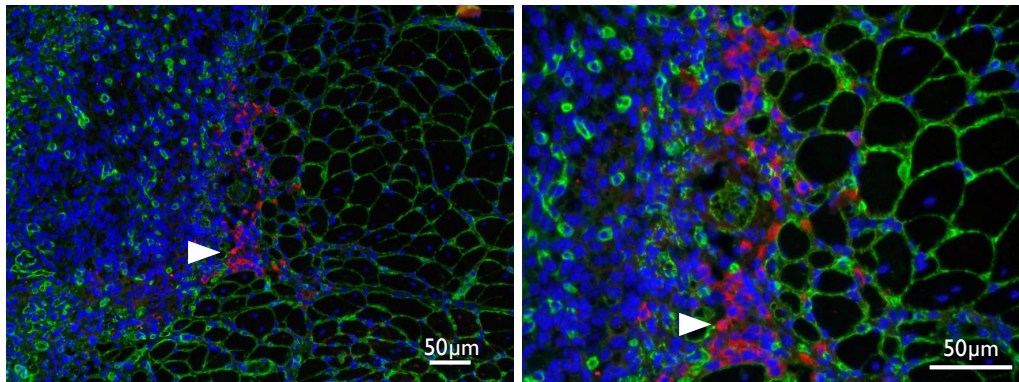


Figura 22. Animais que recebem tratamento completo mantêm células humanas após 1 mês de transplante. Animais imunocompetentes receberam o tratamento completo via oral pré transplante. Um mês após o transplante os músculos desses animais foram corados por imunofluorescência e apresentavam mais células humanas quando comparado com os demais controles (Figura 15, 16 e 17). Os mioblastos humanos foram marcados com anti-lamina A/C e anti-espectrina(vermelho), também marcamos a laminina com anticorpo anti-laminina (verde) e o núcleo foi corado com DAPI (azul). As setas brancas indicam as células humanas no músculo dos animais. N = 3 animais.

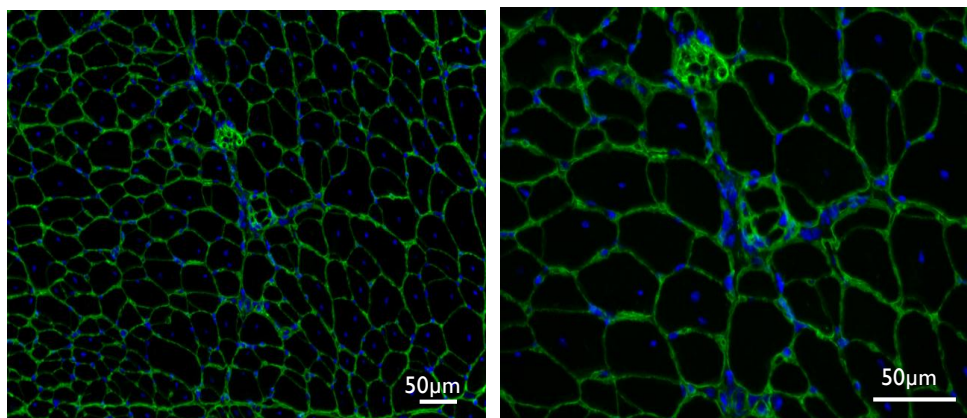


Figura 23. Animais que receberam o extrato por gavagem não possuem células humanas após 1 mês de transplante. Os animais do grupo controle que só recebem o extrato de mioblasto por gavagem durante o tratamento rejeitaram todas as células humanas no período de 1 mês. Novamente, os mioblastos humanos foram marcados com anti-lamina A/C e anti-spectrina (vermelho), também marcamos a laminina com anticorpo anti-laminina (verde) e o núcleo foi corado com DAPI (azul). N = 2 animais

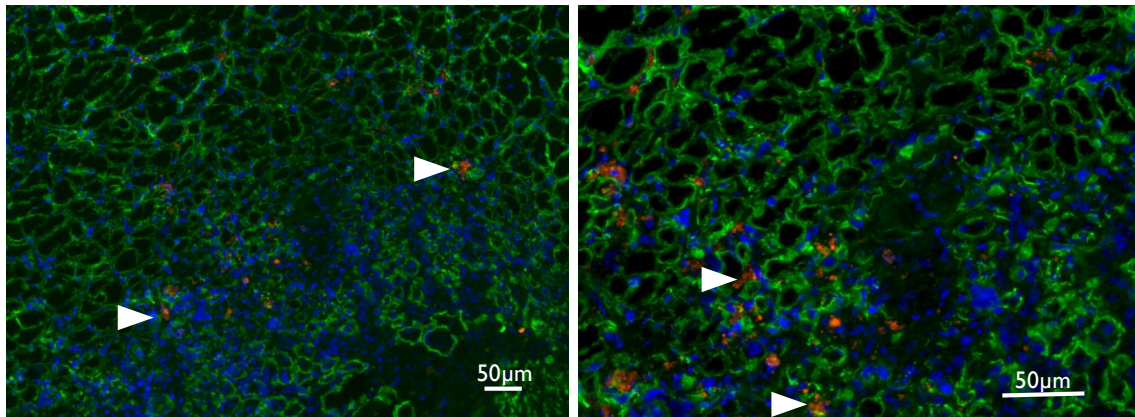


Figura 24. Animais que receberam a bactéria *L. lactis* não apresentam células humanas após 1 mês de transplante. **Os animais do grupo controle que só receberam, *ad libitum*, *L. lactis* durante o tratamento rejeitaram todas as células humanas no período de 1 mês. Temos que notar que a fluorescência alaranjada, seta branca, que aparece nas fotos é possivelmente lipofusceína, que são resíduos de lipídios fluorescentes de lisossomos. Novamente, os mioblastos humanos foram marcados com anti-lamina A/C e anti-espectrina(vermelho), também marcamos a laminina com anticorpo anti-laminina (verde) e o núcleo foi corado com DAPI (azul). N = 3 animais.**

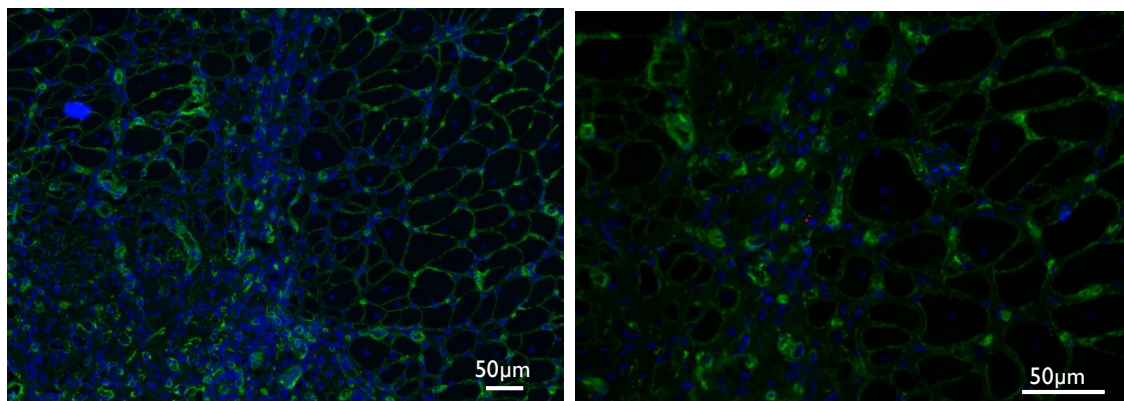


Figura 25. **Os animais que não receberam o tratamento oral rejeitaram os mioblastos humanos enxertados.** Os animais do grupo PBS que só foram imunizados com o extrato, rejeitaram todas as células enxertadas. Novamente, os mioblastos humanos foram marcados com anti-lamina A/C e anti-spectrina(vermelho), também marcamos a laminina com anticorpo anti-laminina (verde) e o núcleo foi corado com DAPI (azul). N = 2 animais

Com os resultados mostrados pelas figuras acima, pode-se dizer que o tratamento oral é capaz de tornar o animal tratado tolerante aos mioblastos enxertados, quando comparado com os demais grupos.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Existem vários tipos de distrofias musculares que variam, dependendo da severidade e do músculo afetado. A distrofia muscular com maior incidência é a distrofia muscular de Duchenne. A DMD é uma doença genética que afeta 1 a cada 3500 meninos nascidos, sendo a mais grave dentre as distrofias musculares e a mais comum. Dentre as crianças nascidas com DMD, em torno de um terço são mutações novas dentro do gene da distrofina (Ray et al, 2001). A distrofia muscular de Becker, apesar de apresentar os mesmos padrões de mutação, apresenta um fenótipo de doença muito mais ameno quando comparado com a DMD. Isso ocorre porque os pacientes com BMD expressam versões curtas de RNAm do transcrito da distrofina. Existem outras distrofias como a distrofia muscular de membros e cintura (LGMD) em que os pacientes também apresentam mutações em outras proteínas que estão associadas com a membrana celular da fibra muscular (Lim et al, 1995). No geral todas essas patologias possuem como ponto em comum a contínua degeneração e regeneração das fibras musculares, o que com a progressão da doença, leva a exaustão das reservas de células satélites. Essa exaustão leva a fibrose e formação de tecido adiposo na musculatura afetada, o que acaba por comprometer a função do órgão (Matsumura et al, 1993). Os tratamentos que existem, como glicocorticoides (Mendell et al, 1989), não são capazes de parar a degeneração muscular, apenas a retardam.

Várias terapias têm sido propostas para a recuperação de função da célula muscular. Estes tratamentos podem ser divididos em quatro estratégias: terapia celular; terapia genética; abordagens de mutação específica; e aumento na produção de urotrofina. Para a recuperação da função muscular tem sido proposta a utilização do transplante de célula tronco (Negroni et al, 2011). Vários trabalhos vêm utilizando células tronco de diferentes origens na tentativa de se alcançar o melhor modelo para uso no transplante. Podemos dividir em duas categorias de células tronco: as células que residem no tecido muscular ou são derivadas do mesmo; e as células tronco que não residem no músculo esquelético.

As células tronco mesenquimais (MSC) residem no compartimento do estroma da medula óssea, e constituem apenas 0,001-0,01% das células do

órgão (Pittenger et al, 1999). Mais recentemente, descobriu-se que em músculo humano sadio a presença de MSC em biópsias (Zheng et al, 2007) ou em resto de tecido muscular de cirurgias (Nesti et al, 2008). Pela facilidade na obtenção dessas amostras pensou-se em utilizar essas células para terapia de distrofias. Todavia diferentes trabalhos vêm se opondo quando à eficácia no uso das MSC (Gang et al, 2009; Nitahara-Kasahara et al, 2012; Garza-Rodea et al, 2011; Zucconi et al, 2011) e nem sempre o transplante com MSC não manipuladas conseguem atingir o grau de diferenciação necessário para reconstrução adequada do tecido lesado. No final da década de 90 mostrou-se que essas células tinham limitada capacidade de regeneração muscular *in vivo* (Ferrari et al, 1998). Mais tarde foi demonstrado que as MSC são capazes de proliferar *in vivo* e se diferenciar em fibras musculares tanto *in vitro* como *in vivo* (de Bari, et al, 2001). Todavia outros trabalhos mostram que estas mesmas células podem não ser tão eficientes na pega do transplante quanto anteriormente demonstrado (Meng et al, 2010). Além disto, já foram descritos outros efeitos colaterais como uma imunossupressão generalizada (Nasef et al, 2008) além da geração de tumores *in vivo* (Jeong et al, 2011)

Outro tipo celular que vem sendo estudado é o mioblasto. O mioblasto é originário de uma célula satélite que deixou de ser quiescente (seja por um estresse oxidativo ou algum outro estímulo específico) e passou a proliferar. Os mioblastos podem passar por várias divisões antes de se fundir à fibra muscular. A estratégia de transplante envolve a utilização de mioblastos de doadores saudáveis, expandir essas células em cultivo e injetá-las no músculo distrófico, como forma de restaurar as funções normais das fibras musculares, protegendo-as da degeneração pela fusão com células saudáveis, sem a mutação à distrofia muscular. Esse fenômeno é conhecido como complementação genética, o que significa que essas novas fibras musculares serão capazes de expressão tanto os genes exógenos quanto os do hospedeiro (Watt et al, 1982).

Precursos miogênicos vêm sendo utilizados em modelos de transplante em animais imunodeficientes. Para mimetizar a necessidade de regeneração do músculo a ser transplantado tem se utilizado o modelo de crio-lesão para gerar o ambiente de inserção dos mioblastos. Trabalhos nesses modelos animais

demonstraram que os mioblastos podem ser retirados de biópsias humanas e purificados em cultura. E ainda são células que podem ser expandidas *in vitro* podendo ser utilizadas na clínica. Essa abordagem sempre foi promissora como demonstrado pelo trabalho em que se transplanta mioblastos de camundongo saudáveis em camundongos mdx imunodeficientes (Partridge et al, 1989), restaurando a expressão de distrofina. Tais resultados geraram muitas expectativas o que rapidamente levou aos ensaios clínicos. Vários ensaios clínicos foram feitos na década de 90 com o transplante de mioblastos. Contudo, os resultados não foram tão promissores. Trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstraram que mioblastos humanos quando transplantados em camundongos imunodeficientes são capazes de regenerar o músculo transplantado se fusionando às fibras do camundongo, formando fibras mistas (Silva-Barbosa et al, 2005, 2008; Riederer et al, 2012; Bencze et al, 2012). Estes estudos, além de terem aplicação prática, começaram a descrever o ambiente inflamatório no entorno do transplante. De forma interessante, a resposta inflamatória inata parece modular as etapas de proliferação diferenciação do mioblastos *in vivo* até a formação da fibra (Benczel et al, 2012).

No entanto, o que esses trabalhos não respondem é como conseguir realizar o transplante em um indivíduo imunocompetente. Uma das principais restrições à terapia celular em pacientes com distrofias musculares, salvo transplantes autólogos com células modificadas geneticamente, é a rejeição das células transplantadas. Algumas barreiras se apresentaram para o sucesso da terapia. A primeira barreira é a da histocompatibilidade, onde mesmo com MHC compatível e tomando imunossuppressores, apenas um de doze pacientes demonstrou a expressão de distrofina do doador (Mendell et al, 1995). Outros problemas são a grande mortalidade dos mioblastos transplantados, baixo número de células transplantadas e má distribuição das células ao longo do músculo (Gussoni et al, 1992). Um teste clínico em 1993 afirmava que o transplante de mioblastos não seria possível sem imunossuppressores (Tremblay et al, 1993). Ainda hoje, não se pensa em terapia celular em distrofia muscular sem o uso de imunossuppressores como o Tacrolimus. Alguns estudos ainda

demonstraram uma melhora na técnica de implante usando fatias de músculo transplantadas em modelos de DMD (Fan et al, 1996).

Já sabemos que a imunidade inata modula a pega do músculo xenogênico transplantado. E ainda que a imunidade adaptativa tem papel fundamental na “pega” da medula óssea no transplante de progenitores hematopoiéticos (Monteiro et al, 2005). Sabendo da existência de um *cross-talk* entre imunidade inata e adaptativa nosso objetivo foi viabilizar o transplante xenogênico, tanto para fins terapêuticos quanto para a compreensão dos mecanismos básicos de diferenciação muscular.

No presente trabalho, propomos o uso de uma terapia combinada para induzir tolerância imunológica aos antígenos de precursores miogênicos humanos. Numa série de experimentos iniciais, vimos que apesar de imunologicamente termos obtido supressão da resposta utilizando apenas extrato proteico de mioblastos/miotubos, isto não pareceu acontecer *in vivo* em relação ao transplante. De fato, vimos que tolerância ao transplante, para ser alcançada, necessitou do uso de probiótico, combinado ao estímulo antigênico. Este resultado reforça a necessidade do uso de probióticos provavelmente como um adjuvante tolerogênico.

A tolerância oral é descrita como dependente de mecanismos de geração de células T reguladoras ou de deleção/anergia, na dependência da quantidade de antígeno utilizado (Weiner et al, 2004, 2006). Altas doses de antígeno levariam à eliminação celular enquanto baixas doses levariam à geração de células Treg. No nosso caso, não observamos aumento de célula Treg apesar de usarmos baixas doses de antígeno. Tampouco sabemos se a inibição é ativa. Para tal serão necessários experimentos de transferência celular.

Para viabilizar a utilização de terapia celular utilizando precursores miogênicos, sem a necessidade da manutenção do regime de imunossupressores é necessária a criação de um protocolo que torne o hospedeiro tolerante ao mioblasto que será transplantado. Para isso optamos pela estratégia de geração de tolerância através de inoculação via oral dos antígenos de interesse.

A indução da tolerância oral tem mostrado resultados promissores em várias doenças mediadas pelo sistema imune, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, esclerodermia e diabetes. No entanto, não existem dados do uso dessa estratégia no transplante de precursores miogênicos. O resultado da mostrado na figura 12 evidencia que a terapia oral foi capaz de modular negativamente a resposta inflamatória quando comparamos com os animais que não foram tratados frente ao um reestímulo do extrato de mioblastos/miotubos humanos. Ainda que não tenham sido encontradas diferenças numérica ou percentual nos diversos fenótipos dos linfócitos dos diferentes grupos, foi observado que o tratamento oral com o extrato de células humanas diminuía a capacidade dos linfócitos do animal tratado a responder frente a um reestímulo com o mesmo extrato.

Sabe-se que o tratamento com probióticos pode melhorar a saúde do hospedeiro e prevenir respostas imunes não desejáveis como: alergias e autoimunidade (Rijkers et al, 2010). Os efeitos benéficos dos probióticos têm sido descritos tanto em doenças humanas como em modelos experimentais. Foi demonstrado que para colite ulcerativa humana o uso de um preparado de probiótico em conjunto com baixas doses de Balsalazida atinge um índice de remissão de 85% dos pacientes tratados. Esse índice foi superior ao dos pacientes tratados apenas com doses medianas de Balsalazida apenas (80%) (Tursiet al, 2004). Outro grupo demonstrou que pacientes que sofrem de rinite alérgica quando passam a tomar via oral o *Lactobacillus casei Shirota*(LcS) apresentam uma redução nas citocinas IL-5, IL-6 e IFN- γ , induzidas pelo alérgeno, simultaneamente a um aumento na produção de IgG e diminuição dos níveis de IgE, quando comparados com o grupo placebo, mostrando assim que LcS é capaz de modular a resposta imune ao alérgeno (Ivory et al, 2008). Em modelos experimentais como o de artrite reumatoide (RA), a administração oral de *Lactobacillus casei* promoveu proteção contra a artrite induzida por colágeno, observando-se menor inchaço da pata do animal tratado, assim como redução no infiltrado inflamatório e na destruição do tecido cartilaginoso (Jae-Seon et al, 2008). Tendo em vista os efeitos já descritos anteriormente alteramos o protocolo

de tolerização e foi introduzido as bactérias probióticas no tratamento oral, fazendo uma terapia combinada.

Utilizando-se o protocolo ilustrado na figura 8, foi realizado o transplante de mioblastos nos diferentes grupos e os animais foram sacrificados com uma semana após o transplante. Como no experimento anterior foi observado que o tratamento modulou negativamente a resposta proliferativa das células dos animais tratados quando comparados com o não tratado. Entretanto, essa modulação negativa só ocorreu nos linfonodos de drenagem do transplante. Uma possibilidade para explicar estes dados pode residir no fato de o sistema imune estar controlando localmente a resposta aos antígenos do mioblastos/miotubos humanos em detrimento de outros sítios não relacionados ao transplante.

No mesmo experimento, os músculos transplantados foram retirados e analisados uma semana após o transplante, para a presença de células humanas utilizando-se imunohistoquímica. Vimos que todos os animais apresentavam marcação positiva para lamina A/C humana. Possivelmente, sete dias tenha sido um tempo muito curto pra avaliar a eficácia do tratamento quanto a presença ou ausência das células enxertadas. Ainda assim, vimos que após uma semana de transplante, o linfonodo de drenagem do animal que recebeu o tratamento oral completo proliferava muito menos quando comparado aos demais grupos. Nesse sentido, salientamos que, embora a presença de mioblastos tenha sido detectada em todos os grupos, o grupo experimental apresentava uma área de infiltrado inflamatório bem menor quando comparado com o grupo controle positivo.

Resolvemos então realizar o mesmo tipo de experimento, fazendo no entanto a avaliação do músculo receptor após um maior tempo de transplante, no sentido de ver as diferenças entre os grupos pudessem ser mostradas mais claramente, não somente por ensaios imunológicos, mas também pela análise da presença ou ausência das células humanas no músculo enxertado. Dessa forma o experimento foi repetido e o resultado imunológico foi bem parecido, mostrando que o grupo experimental tinha menor capacidade proliferativa quando comparado com o grupo PBS. Quando os músculos desses animais

foram analisados, só foram observadas células humanas naqueles músculos de animais que receberam a terapia tolerogênica combinada. O provável efeito disso é que embora a gavagem somente com o extrato de mioblasto seja capaz de modular a resposta imune (como mostrado na redução na produção de interferon- γ e na redução da proliferação frente a um reestímulo), não é capaz de criar um estado tolerogênico que permita a permanência dos mioblastos por 1 mês, como aconteceu com os animais submetidos à terapia combinada. Desnecessário dizer que os mecanismos envolvidos neste efeito tolerogênico precisam ser estudados de maneira mais aprofundada.

Ainda assim, e considerando os dados obtidos no presente trabalho, podemos dizer que:

- **A inoculação via oral de extrato proveniente de cultivos de precursores miogênicos humanos em camundongos imunocompetentes foi capaz de gerar um estado de tolerância imunológica: reduzindo a produção de IFN- γ e a resposta proliferativa de linfócitos T frente a um reestímulo pelo mesmo extrato.**
- **A bactéria *Lactococcus lactis*, quando inoculada via oral juntamente com extrato proveniente de cultivos de precursores miogênicos humanos, favoreceu a sobrevivência de mioblastos humanos transplantados em camundongos imunocompetentes, 1 mês após o transplante.**
- **Este modelo mostra que o tratamento com probióticos e antígeno é capaz de induzir tolerância a mioblastos humanos possibilitando o estudo da diferenciação de mioblastos durante um transplante e abrindo novas possibilidades para a terapia com célula alo- ou xenogênica, em humanos.**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aartsma-Rus A, Van Ommen GJB. 2009. Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet neurology*; 8(10):873–5.

Ambrosio CE, Valadares MC, Zucconi E, et al. 2008. Ringo, a golden retriever muscular dystrophy (grmd) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscul Disord.*;18(11):892-3.

Annacker O, Coombes JL, Bourne T, et al. 2005. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.*; 202:1051-6.

Afuwape a O, Turner MW, Strobel S. 2004. Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clinical and experimental immunology*; 136(1):40–8.

Bencze M, Negroni E, Butler-Browne G, Savino W, Mouly V, Riederer I. 2012. Proinflammatory macrophages enhance the regenerative capacity of human myoblasts by modifying their kinetics of proliferation and differentiation. *Mol Ther.*; 20(11):2168-79.

Billingham R, Brent L, Medawar P. 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*; 3:172(4379):603-6.

Bogdanovich S, et al. 2004. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*; 82(2):102–15.

Brandtzaeg P. 1998. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutrition reviews*; 56:S5–18.

Brandtzaeg P. 2009. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scandinavian journal of immunology*; 70(6):505–15.

Camirand G, Rousseau J, Tremblay JP, et al. 2008. Central tolerance to myogenic cell transplants does not include muscle neoantigens. *Transplantation*; 2785(12):1791-801.

Clegg CH, Hauschka SD. 1987. Heterokaryon analysis of muscle differentiation: regulation of the postmitotic state. *J Cell Biol.*; 105(2):937-47.

Collins CA, Morgan JE. 2003. Duchenne muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol.*; 84(4):165-72.

Coombes JL, Siddiqui KR, Hall J, Sun CM, et al. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.*; 204:1757-64.

Cooper RN, Irintchev A, Partridge TA, Butler-Browne GS, Mouly V, Wernig A. 2001. A new immunodeficient mouse model for human myoblast transplantation. *Hum Gene Ther.*; 12(7):823-31.

Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. 1988. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol.*; 114(1):53-70.

Crabbe, P, Nash, D, Bazin, H. 1969. Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral or parenteral immunization with ferritin. *The Journal of experimental medicine*; 130(4):723-44

Davies KE, Nowak KJ. 2006. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature reviews. Molecular cell biology*; 7(10):762–73.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.*; 44:1928–42.

Eagle M, et al. 2007. Managing Duchenne muscular dystrophy: the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscular disorders*; 17(6):470–5.

Edom F, Fiszman MY, Butler-Browne GS, et al. 1994. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. *Developmental Biological*; 164(1):219-29

Gang EJ, Darabi R, Kyba M, Perlingeiro RC, et al. 2009. Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Exp. Cell Res.*; 315(15):2624–2636.

Emery, AE. 2002. The muscular dystrophies. *Lancet*; 359(9307):687–95.

Faria AM, Weiner HL. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev.*; 206:232-259.

Faria AM, Mucida D, McCaffert DM, Tsuji NM, Verhasselt V. 2012. Tolerance and Inflammation at the Gut Mucosa. *Clinical & Dev Immunol.*; 2012:738475.

Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, et al. 1998. Muscle regeneration by bonemarrow-derived myogenic progenitors. *Science*; 279:1528–30.

Garza-Rodea AS, Van Der Velde I, Knaän-Shanzer S. 2011. Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice. *Cell Transplant.*; 20(2):217-31

Goldin BR, Gorbach SL. 2008. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin. Infect. Dis.*; 46:S96-S100.

Grounds MG. 2008. Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci.*; 65:1621-25.

Gussoni E, Pavlath GK, Steinman L, et al. 1992. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*; 356:435–438.

Hawker TJ, Garry DJ. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.*; 91(2):534-51.

Hayes J, Veyckemans F, Bissonnette B. 2008. Duchenne muscular dystrophy: an old anesthesia problem revisited. *Paediatric anaesthesia*; 18(2):100–6.

Heslop L, Morgan JE, Partidge TA. 2000. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci.*; 113:2299-308.

Holzapfel HW, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*; 73:365S-373S.

Jeong JO, Han JW, Yoon YS, et al. 2011. Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. *Circulation Research*; 108(11):1340-7.

Lebeer S, Vanderleyden J, Keersmaecker SCJ. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*; 8:171-84.

Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.*; **52**:925-30.

Ley RE, Peterson D, Gordon JI. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*; 124(4):837–48.

Lim LE, Duclos F, Broux O, et al. 1995. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet.*; 11(3):257-65.

Mattingly JA, Waksman BH. 1978. Immunologic suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. *The Journal of Immunology*; 121(5):1878–1883.

Matsumura K, Ohlendieck K, Burghes AH, et al. 1993. The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.*; 3(5-6):533-5

Mauro A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.*;9:493-5.

Melamed D, Friedman A. 1994. In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *European journal of immunology*; 1974–1981.

Mendell JR, Mosley RT, Gilder B, et al. 1989. Randomized, Double-Blind Six-Month Trial of Prednisone in Duchenne's Muscular Dystrophy. *N Engl J Med.*; 320:1592-1597.

Mendell JR, Kissel JT, Prior TW, et al. 1995. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.*; 333:832–838.

Meng J, Adkin CF, Arechavala-Gomez V, Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. 2010. The contribution of human synovial stem cells to skeletal muscle regeneration. *Neuromuscul Disord.*; 20(1):6-15

Miller A, Lider O, Weiner HL. 1991. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *The Journal of experimental medicine*; 174(4):791–8.

Monaco P, et al. 1987. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. *Human genetics*; 75(3):221–7.

Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, Barcinski MA, Bonomo A. 2005. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood.*; 105(4):1484-91

Nasef A, et al. 2008. Leukemia inhibitory factor: role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol.*; 253(1–2):16–22.

Negróni E, Vallese D, Vilquin JT, Butler-Browne G, Mouly V, Trollet C. 2011. Current advances in cell therapy strategies for muscular dystrophies. *Expert Opin Biol Ther.*; 11(2):157-76.

Neish AS. 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*; 136(1):65–80.

Nesti LJ, Jackson WM, Shanti RM, et al. 2008. Differentiation potential of multipotent progenitor cells derived from war-traumatized muscle tissue. *J. Bone Joint Surg Am.*; 90(11):2390-8

Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Takeda S, et al. 2012. Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy*; 20(1): 168-77.

Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. 1989. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*; 337: 176–179.

Pastoret C, Sebillé A. 1993. Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord.*; 3(5-6):471-5.

Petrof BJ, et al. 1993. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90(8):3710–4.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284(5411):143-7

Qin J, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*; 464(7285):59–65.

Ray P, Bauer E, Iyer M, et al. 2001. Monitoring gene therapy with reporter gene imaging. *Semin Nucl Med.*; 31(4):312-20.

Rezende, Rafael M, Oliveira, Weiner HL, Ana MC, et al. 2012. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity*; 1-13

Rothberg R, Kraft S. 1967. Similarities between rabbit antibodies produced following ingestion of bovine serum albumin and following parenteral immunization. *The Journal of Immunology*; 98(2):386-95.

Riederer I, Negroni E, Savino W, Mouly V, et al. 2012. Slowing down differentiation of engrafted human myoblasts into immunodeficient mice correlates with increased proliferation and migration. *Mol Ther.*; 20(1):146-54.

Round JL, Mazmanian SK. 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*; 9:313-23.

Schultz E, Gibson MC, Champion T. 1978. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool.*; 206(3):451-6.

Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, et al. 1992. An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics*; 13(1):115–21.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*; 244(4912):1578-80.

Smits HH, van Kooyk Y, Kapsenberg ML, et al. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10 producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol.*; 115:1260-67.

Silva-Barbosa Suse D, Savino W, Mouly V, et al. 2008. Human Myoblast Engraftment is Improved in Laminin-Enriched Microenvironment. *Transplantation*; 85(4):566-575.

Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. 1974. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol*; 69(1-2):91-5.

Thomas HC, Parrott MV. 1974. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology*; 27(4):631–9.

Tremblay JP, Bouchard JP, Satoh A, et al. 1993. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant*; 2:99–112.

Van Huynegem K, Loos M, Steidler L. 2009. Immunomodulation by genetically engineered lactic acid bacteria. *Front Biosci.*; 14:4825-35.

Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. 1982. Incorporation of donormuscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci.*; 57:319–331

Weiner HL. 1999. Induction of oral tolerance to the acetylcholine receptor for treatment of myasthenia gravis. *The Journal of clinical investigation*; 104(12):1667–8.

Willmann R, Possekel S, Dubach-Powell J, Meier T, Ruegg MA. 2009. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*; 19(4):241-9.

Xu J, et al. 2007. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS biology*; 5(7):156.

Zheng B, Cao B, Crisan M, et al. 2007. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol.*; 25(9):1025-34

Zhu CH, et al. 2007. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging cell*; 6(4):515–23.

Zucconi E, Vainzof M, Zatz M, et al. 2011. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J Biomed Biotechnol.*; 2011:715251.