

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAMILA SANCHES OLIVEIRA GOMES

Estudo da expressão e função das isoformas de laminina na proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos humanos em modelos *in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Ingo Riederer
Prof. Dr. Wilson Savino

RIO DE JANEIRO
2018

Gomes, Camila Sanches Oliveira.

Estudo da expressão e função das isoformas de laminina na proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos humanos em modelos *in vitro* e *in vivo* / Camila Sanches Oliveira Gomes. - Rio de Janeiro, 2018.

xiv, 61f. f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

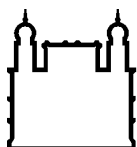
Orientador: Ingo Riederer.

Co-orientador: Wilson Savino.

Bibliografia: f. 54-61

1. Mioblastos. 2. Laminina. 3. Regeneração Muscular. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Camila Sanches Oliveira Gomes

ESTUDO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DAS ISOFORMAS DE LAMININA NA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E FUSÃO DE MIOBLASTOS HUMANOS EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO

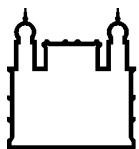
**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Ingo Riederer
Prof. Dr. Wilson Savino**

Aprovada em: 06/09/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso/ Instituto Oswaldo Cruz, RJ - **Presidente**
Prof. Dr. Claudia Farias Benjamim/ Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ
Prof. Dr. Tatiana Sampaio/ Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ
Prof. Dr. Daniel Pedra Adesse/ Instituto Oswaldo Cruz, RJ
Prof. Dr. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira/ Instituto Oswaldo Cruz, RJ

Rio de Janeiro, 6 de setembro de 2018

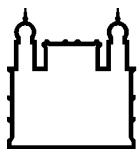


Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que, de corações esperançosos,
têm fé em seus trabalhos e se propõem a fazer
Ciência no Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Muito além das bancadas, a jornada que me trouxe até aqui esculpiu a resiliência que eu *achava* que tinha, me mostrou uma coragem que eu *nem desconfiava* ser dona e me deu de presente companheiros queridos de caminhada pelos quais serei sempre *muito, muito grata*.

Com profundo respeito à fé de quem por ventura me leia nesse momento, preciso iniciar meus agradecimentos à força maior que me permitiu estar aqui, encerrando uma etapa de incontáveis desafios dentro e fora da vida acadêmica. Para mim, a Ciência sempre foi uma das coisas mais bacanas que *Ele* criou...

De todos os títulos que eu possa ter nessa vida, ser filha de Mauro e Ivani sempre vai ser o que eu mais terei orgulho. Pelo apoio de sempre em mais essa etapa e pela compreensão nas horas de ausência, muito obrigada, pai, mãe e Vitor, meu irmão.

Por todo amor em forma de compreensão e cuidado, companheirismo e paciência, motivação e genuína torcida: muito obrigada, Davi. Ser namorado de mestrandia não é das tarefas mais simples, eu sei. Mas você cumpriu *com maestria*, por assim dizer. Não posso deixar de mencionar o imenso apoio e carinho que recebi dos meus sogros, Vera e Jorge, que foram tão importantes para que eu chegasse até aqui.

Pela inspiração, carinho, dedicação e – muita – paciência: obrigada, Ingo. Se só cumprisse com desvelo seu papel de orientador, eu já teria *muito* o que agradecer. Mas a verdade é que o pacote de ser uma aluna do Ingo (ou, carinhosamente, “Inguete”) é muito mais amplo e eu sou realmente grata por tudo que aprendi nesses últimos anos.

Por falar em “Inguete”, eu não estaria aqui sem a ajuda de vocês. Um grupo como esse deixa qualquer trabalho mais fácil (e olha que não faltou lamínula de vidro quebrando pra dificultar): Mari, Rafa, Aline, Rebecca, Bia, Arnon e, mais recentemente, Cássia. Obrigada de verdade, gente! Agradeço também ao Savino, segundo orientador, sempre tão querido e solícito, cujo legado é merecidamente admirado por todos.

Desde a Iniciação Científica até então, o Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, nosso querido LPT, serviu de escola e casa. Experimento que funciona é bom, mas se sentir em casa entre tanta gente querida **jamais caberá no Lattes**. Aos corações amigos –

fisicamente presentes ou não – que fizeram ou fazem esse lugar ser tão bacana, muito obrigada! Com muito carinho, agradeço pela oportunidade do convívio com vocês. Representando tanta gente especial, cito, além das Inguetes, Julia, Lari, Carol, Raquel, Dina, Lu, Lia, Camila, Cister, Pedro, Rômulo, Marina, Jairo, Andrés, Rhaissa, Colômbia... Aos pesquisadores, sempre solícitos, meu respeito e admiração: Dumith, Vini, Dani, Rafael, Rudi, Bonomo, Juliana, Déa, Désio, obrigada! E fora da bancada tem muita gente que faz os dias ficarem melhores também. Não posso deixar de agradecer: Elaine, Valmir, Verônica, Sheila, Jacy, Rosângela, Vera... Muito obrigada, gente!

Mas se agradecemos aqueles de convívio diário, precisamos agradecer também aqueles cujo convívio foi reduzido pelos experimentos e/ou estudos em horários fora do expediente convencional que todo mestrando/doutorando adota vez ou outra, especialmente na reta final. Aos queridos familiares e amigos, obrigada pela compreensão e torcida. Dentre os amigos queridos, não posso deixar de agradecer em especial: Carol, Cíntia, Fernanda, Jéssica, Juju, Juninho, além de Dona Nancy e Seu Manoel, representando aqui todos os corações amigos da Casa de Ornellas. Presentes que a vida me deu em diferentes ocasiões e que fazem a jornada ser mais leve. Obrigada pelo apoio de sempre.

Agradeço imensamente à Aline e Mariana Waghabi, pela gentileza de me permitirem usar o microscópio de fluorescência.

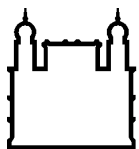
Ao Samuel Horita e Daniela Gois Beghini, do laboratório da Dra. Andréa Henriques-Pons, por gentilmente cederem a cardiotoxina.

À Julimar, secretária da BCM, tão prestativa e solícita, obrigada!

À Capes, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca Pedro Paulo, Cláudia Benjamim, Tatiana Sampaio, Daniel Adesse e Ana “Tininha” Nogueira, por aceitarem o convite e contribuírem para o final de um ciclo que será guardado com muito carinho na minha memória.

Muito obrigada!



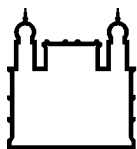
Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

EPÍGRAFE

“Ganhamos força, coragem e confiança a cada experiência em que verdadeiramente
paramos para enfrentar o medo”

Eleanor Roosevelt



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

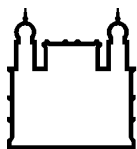
ESTUDO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DAS ISOFORMAS DE LAMININA NA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E FUSÃO DE MIOBLASTOS HUMANOS EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Sanches Oliveira Gomes

O músculo esquelético adulto é composto majoritariamente por fibras musculares e por uma população minoritária de células progenitoras indiferenciadas (células satélites). Após trauma ou dano, tais células são ativadas e proliferam (mioblastos), fusionando entre si ou com fibras pré-existentes, promovendo restauração do músculo. Essas células têm sido utilizadas em estratégias de terapia celular para o tratamento de doenças musculares, mas ainda sem resultados expressivos em ensaios clínicos. A morte massiva, proliferação e migração limitadas, além de diferenciação precoce das células injetadas têm sido consideradas como as principais limitações envolvendo esta estratégia. Dentre os componentes do nicho dessas células, estão moléculas da matriz extracelular, como a laminina (LM), principal componente da membrana basal da fibra muscular, fundamental para integridade e função das fibras musculares. No músculo maduro, somente as isoformas LM-211 e 221 são encontradas na membrana basal das fibras. Porém, resultados preliminares do nosso grupo indicavam que outras isoformas poderiam estar presentes durante o processo de regeneração. Além disso, o tratamento com LM-111 tem demonstrado resultados promissores na melhora do processo de regeneração em modelos animais, sugerindo que outras isoformas de LM, além das LMs 211 e 221, possam ter papel relevante na biologia do músculo. Os objetivos deste trabalho foram: i) identificar a presença de cadeias de LM em mioblastos humanos, em proliferação e diferenciação *in vitro*; ii) realizar ensaios funcionais de proliferação e diferenciação de mioblastos humanos na presença de isoformas de LM. Observamos, por PCR e imunofluorescência, que mioblastos humanos expressam, na proliferação e na cinética diferenciação de mioblastos humanos em cultura, de forma não simultânea, a cadeia $\alpha 2$ (que forma as isoformas LM211 e 221), mas também as cadeias $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ de LM. Em ensaios funcionais *in vitro*, utilizando LMs recombinantes e anticorpos monoclonais bloqueadores, observamos que a interação do mioblasto com as LMs modula a proliferação, diferenciação e fusão desses progenitores musculares. Nossos dados sugerem uma possível hierarquia na expressão de isoformas de LM na diferenciação de mioblastos, e indicam que estas moléculas possam ter papéis específicos em diferentes fases do processo de regeneração muscular. A caracterização das isoformas de LM presentes no nicho da célula satélite visa fornecer informações relevantes para uso destas células em terapia celular futuramente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

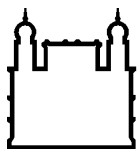
ESTUDO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO DAS ISOFORMAS DE LAMININA NA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E FUSÃO DE MIOBLASTOS HUMANOS EM MODELOS IN VITRO E IN VIVO

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Sanches Oliveira Gomes

Adult skeletal muscle is composed mostly of muscle fibers and a rare population of undifferentiated progenitor cells (satellite cells). After damage or injury, these cells are activated, proliferate (at this point, they are called myoblast) and fuse between them or with preexisting fibers, promoting muscle regeneration. These cells have been used in cell therapy strategies for treatment of muscular diseases, but still with no significant results in clinical trials. Massive death, limited proliferation and migration, and early differentiation of injected cells have been considered the main limitations of this strategy. Among the components of cells' niche are extracellular matrix molecules, such as laminin (LM), the main component of the basement membrane of the muscle fiber, fundamental for the integrity and function of muscle fibers. In mature muscle, only LM-211 and LM-221 isoforms are found in basement membrane of the fibers. Nevertheless, preliminary results from our group indicated other isoforms could be present during the regeneration process. In addition, treatment with LM-111 has shown promising results in improving regeneration process in animal models, suggesting that other LM isoforms (besides LMs 211 and 221) may play a relevant role in muscle biology. The objectives of this work were: i) to identify the presence of LM chains in human myoblast proliferation and *in vitro* differentiation; ii) perform functional assays of proliferation and differentiation of human myoblasts in the presence of LM isoforms. We observed by PCR and immunofluorescence that human myoblasts express, in the proliferation and kinetic differentiation of human myoblasts in culture, non-simultaneously, the $\alpha 2$ chain (which forms the LM211 and 221 isoforms), but also $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ chains of LM. In *in vitro* functional assays using recombinant LMs and blocking monoclonal antibodies, we observed that the interaction of the myoblast with LMs modulates the proliferation, differentiation, and fusion of these muscle progenitors. Our data suggest a possible hierarchy in the expression of LM isoforms in the differentiation of myoblasts and indicate these molecules may have specific roles in different phases of the muscle regeneration process. Characterization of LM isoforms present in the satellite cell niche is intended to provide relevant information for the use of these cells in future cell therapy.



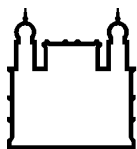
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

SUMÁRIO

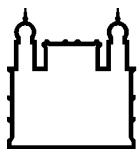
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.a Músculo esquelético e células satélites	1
1.b Células Satélites e Terapia Celular	5
1.c Matriz extracelular e lamininas	6
1.d Músculo e lamininas	10
1.d.1 Modelos de estudo da interação entre músculo e laminina	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.a Cultivo celular	14
3.b Identificação das cadeias de lamininas por imunofluorescência	15
3.c Identificação das cadeias de lamininas por RT-PCR	16
3.d Ensaio de proliferação com coating de lamininas	17
3.e Ensaio de diferenciação com coating de lamininas	19
3.f Bloqueio da cadeia de laminina.....	19
3.g Análise Estatística	20
4. RESULTADOS	21
4.a Proliferação e diferenciação de mioblastos humanos <i>in vitro</i>	23
4.b Identificação das cadeias de lamininas por imunofluorescência	24
4.c Identificação das cadeias de lamininas por RT-PCR	30
4.d Ensaio funcionais de proliferação na presença de diferentes isoformas de LM	32
4.e Ensaio de diferenciação com coating de lamininas	38
4.f Bloqueio da cadeia de laminina $\alpha 5$	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. PERSPECTIVAS	51
6.a Estudo in vivo da regeneração muscular	51
6.b Modelo tridimensional de diferenciação (<i>Engineered Muscle Tissue</i> , EMT)	52
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54



ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Fig. 1.1:</u> Fibra muscular esquelética.	1
<u>Fig. 1.2:</u> Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular.	3
<u>Fig. 1.3:</u> Ativação da célula satélite e sua progressão dentro do programa miogênico.	4
<u>Fig. 1.4:</u> Desenho esquemático dos principais componentes da matriz extracelular.	7
<u>Fig. 1.5:</u> Desenho esquemático da laminina com seus principais ligantes.	8
<u>Fig. 1.6:</u> Desenho esquemático do modelo de interação tridimensional das lamininas.	9
<u>Fig. 1.7:</u> Desenho esquemático dos principais receptores de lamininas.	10
<u>Fig. 4.1.</u> Expressão de cadeias de LM (em verde) e espectrina humana (vermelho) em músculo TA de camundongos imunodeficientes após 21 dias do transplante de mioblastos humanos.	22
<u>Fig. 4.2.</u> Determinação da miogenicidade e potencial de fusão das células CHQ.	24
<u>Fig. 4.3:</u> Expressão de diferentes cadeias de LM em CHQ.	25
<u>Fig. 4.4:</u> Expressão de diferentes cadeias de LM em células da linhagem imortalizada CI25.	28
<u>Fig.4.5:</u> Expressão de diferentes cadeias de LM em célula muscular imortalizada LHCN-M2.	30
<u>Fig. 4.6:</u> Expressão de lamininas e receptores via RT-PCR em CI25.	32
<u>Fig. 4.7.</u> Proliferação de mioblastos CHQ cultivados sobre as isoformas de LM.	33
<u>Fig. 4.8.</u> Identificação de mioblastos humanos em fase proliferativa após dois dias de cultivo sobre isoformas de LM recombinante humana.	34
<u>Fig. 4.9:</u> Quantificação de mioblastos CHQ Ki-67 ⁺ após dois de cultivo sobre isoformas de LM.	35
<u>Fig. 4.10:</u> Proliferação de mioblastos CI25 cultivados sobre as isoformas de LM.	36
<u>Fig. 4.11:</u> Células CI25 na fase de síntese do ciclo celular, cultivadas sobre isoformas de LM.	37
<u>Fig. 4.12:</u> Quantificação de mioblastos CI25 EdU ⁺ após 2 e 5 dias de proliferação sobre isoformas de LM.	38

<u>Fig. 4.13:</u> Células CHQ em 7 dias de diferenciação plaqueadas em LM 221.	39
<u>Fig. 4.14:</u> Índice de diferenciação de CHQ.	40
<u>Fig. 4.15:</u> Análise da capacidade de fusão de miotubos após 7 dias de diferenciação de células CHQ em diferentes condições de <i>coating</i>	41
<u>Fig. 4.16:</u> Células CI25 em 2 dias de diferenciação plaqueadas em LM-121.	42
<u>Fig. 4.17:</u> Índice de diferenciação de CI25.....	42
<u>Fig. 4.18:</u> Percentual de células marcadas com cadeia pesada da miosina (MyHC) após tratamento com anticorpos monoclonais anticadeia $\alpha 5$ de LM (clone 4c7) em diferentes momentos da diferenciação.....	43
<u>Fig. 6.1:</u> Marcação com Hematoxilina-Eosina de músculo <i>Tibialis Anterior</i> (TA) pós-lesão com cardiotoxina em diferentes tempos de regeneração	60
<u>Fig. 6.2:</u> Visualização de EMTs.....	61
<u>Fig. 6.3:</u> Microscopia confocal do EMTs obtidos após 7 dias de diferenciação	61

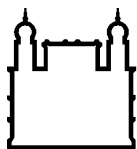


Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ÍNDICE DE TABELAS

<u>Tab. 3.1:</u> Composição do Meio KMEM utilizado para células musculares em proliferação.	15
<u>Tab. 3.2:</u> Relação dos anticorpos primários utilizados na identificação das cadeias de laminina (LM).....	16
<u>Tab. 3.3:</u> Descrição dos <i>primers</i> utilizados.	17
<u>Tab. 3.4:</u> Relação das isoformas de lamininas comercializadas pela BioLamina utilizadas neste trabalho	18
<u>Tab. 3.5:</u> Organização do tratamento com anticorpos monoclonais anticadeia $\alpha 5$ de LM (clone 4c7).	20



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ABREVIATURAS E SIGLAS

CTX: Cardiotoxina

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol, emite forte fluorescência quando se liga ao DNA

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne, do inglês, *Duchenne Muscular Dystrophy*

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dubelco, do inglês, *Dulbecco's modified Eagles medium*

ECM: Matriz extracelular, do inglês, *extracellular matrix*

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine, composto que se liga ao DNA recém-sintetizado

FGF: Fator de crescimento de fibroblasto, do inglês, *Fibroblast growth factor*

GAM: Anticorpo feito em cabra, anticamundongo, do inglês, *goat antimouse*

HGF: Fator de crescimento de hepatócito, do inglês, *Hepatocyte growth factor*

LAMA: Nomenclatura que define gene e proteína de cada cadeia α de laminina

LAMB: Nomenclatura que define gene e proteína de cada cadeia β de laminina

LAMC: Nomenclatura que define gene e proteína de cada cadeia γ de laminina

LM: Laminina

MB: Membrana basal

MFRs: Fatores reguladores miogênicos, do inglês, *myogenic regulatory factors*

MRF 4: Fator de regulação miogênico 4, do inglês, *Myogenic fator 4*

Myf 5: Fator de regulação miogênico 5, do inglês, *Myogenic fator 5*

MyoD: Fator de determinação miogênico 1, do inglês, *Myogenic determination factor 1*

Pax3/Pax7: Fatores de transcrição da família *paired box*

RT-PCR: Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*

SC: Células satélites, do inglês, *satellite cells*

TA: *Tibialis Anterior*

1. INTRODUÇÃO

1.a Músculo esquelético e células satélites

Com peso correspondente a aproximadamente 35% da massa total de um corpo humano (Jansen *et al.* 2000), o músculo esquelético faz parte de um sistema que fornece ao indivíduo locomoção, reserva de energia e termorregulação (Frontera *et al.* 2014; Rowland *et al.* 2014). As células desse tipo de músculo são chamadas de **fibras musculares** (ou **miofibras**), por causa de sua forma altamente alongada. Cada uma é um sincício, contendo muitos núcleos dentro de um citoplasma comum (Figura 1.1) (Alberts *et al.* 2010).

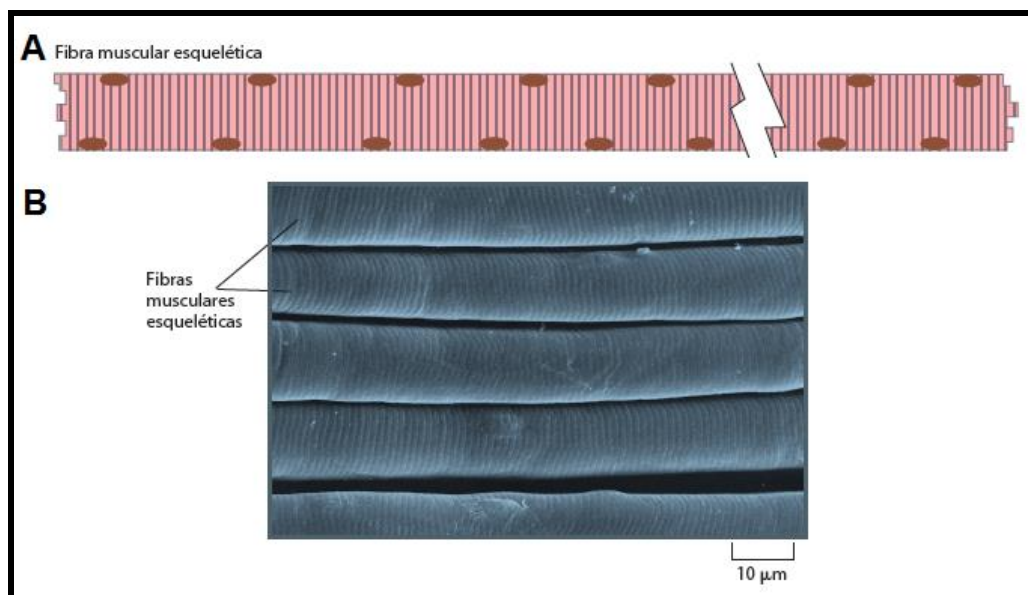


Fig. 1.1: Fibra muscular esquelética. Desenho esquemático de uma fibra muscular esquelética (A) e sua eletromicrografia de varredura (B). Fonte: Alberts *et al.* 2010 (com adaptações da autora).

A fibra muscular possui a maquinaria responsável pela contração muscular. Isso ocorre porque cada fibra muscular contém de centenas a milhares de miofibrilas, que são compostas por filamentos de **miosina** e de **actina**. O mecanismo de contração muscular ocorre através do deslizamento desses filamentos (GUYTON; HALL, 2011).

Além dos componentes moleculares da contração, o citoplasma da fibra muscular é preenchido por diversas moléculas, também responsáveis pela manutenção da estrutura da fibra e pela interação do citoesqueleto com a matriz extracelular (ECM) que envolve a fibra. Dentre essas proteínas, podemos destacar os filamentos intermediários. Essas estruturas não têm participação direta na contração celular, nem nos movimentos de organelas, sendo primordialmente elementos estruturais. Ao contrário dos microtúbulos e dos filamentos de actina, que, em todas as células, são constituídos pelas proteínas globulares tubulina e actina, respectivamente, os filamentos intermediários são formados por diversas proteínas fibrosas

dependendo do tipo celular: queratina em células epiteliais, vimentina em fibroblastos, proteína ácida fibrilar da glia em astrócitos e **desmina**, com expressão restrita em células musculares (Junqueira e Carneiro 2005).

Os mioblastos são precursores das fibras musculares esqueléticas e são originados dos somitos, estruturas embrionárias formadas a partir da segmentação do mesoderma paraxial (Buckingham *et al.* 2003; Musumeci *et al.* 2015). O comprometimento para se tornar esse tipo de célula depende da expressão de proteínas reguladoras de genes de pelo menos duas famílias: um par de proteínas, **Pax 3 e Pax 7** (do inglês, *paired-box*), e a família **MyoD** de proteínas hélice-volta-hélice (em inglês, *basic helix-loop-helix*, bHLH) (Alberts *et al.* 2010).

Em determinado momento, a massiva proliferação dos **mioblastos** é interrompida e essas células, ainda uninucleadas, começam a se diferenciar e são chamadas de **miócitos**. Estes se fusionam, formando **miotubos** multinucleados que, mais tardiamente, ao amadurecerem e se fusionarem entre si, formam as **miofibras**. Esse processo é denominado **diferenciação**. A fusão envolve moléculas de adesão célula-célula específicas que medeiam o reconhecimento entre os mioblastos recém-diferenciados e as fibras (Alberts *et al.* 2010).

A diferenciação miogênica é um processo complexo, cujos protagonistas são os chamados fatores transcricionais de regulação miogênica (em inglês, *myogenic regulatory factors* ou MRFs): **MyoD**, **Miogenina**, **Myf5** e **MRF4**. Os fatores primários – MyoD e Myf5 – são expressos na fase de proliferação dos mioblastos, enquanto os fatores secundários – Miogenina e MRF4 – são expressos em mioblastos nas fases de diferenciação e fusão (Figura 1.2) (Murre *et al.* 1989; Watabe 1999; Rescan 2001; Cao *et al.* 2006).

Além dos MRFs, existe outra a família de fatores transcricionais também está envolvida na ativação de genes músculo-específicos: fator 2 de aumento de miócitos ou MEF2 (em inglês, *myocyte enhancer factor-2*) (Naya e Olson 1999). Existe uma ação interdependente entre a família MEF2 e os MRFs no controle da diferenciação do músculo esquelético (Naidu *et al.* 1995; Silva e Carvalho 2007).

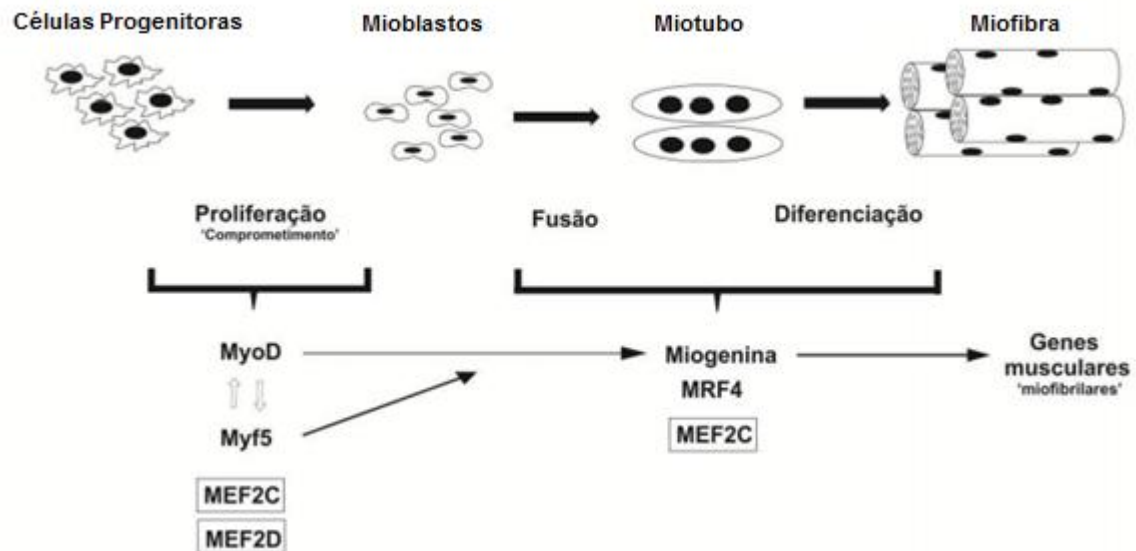


Fig. 1.2: Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular. MRFs e MEF2 atuam em diferentes etapas do processo miogênico. Fonte: Watabe 1999 (adaptado por Mareco, 2012 e pela autora).

É razoável inferir que, para a sustentação da morfologia e funcionalidade do músculo esquelético durante a vida de um indivíduo, esse processo de formação de novas fibras não poderia ocorrer apenas na embriogênese. Crescemos ainda na fase fetal e após o nascimento, e diversas lesões podem ocorrer durante a vida, sejam elas devido a disfunções neurológicas, doenças congênitas, laceração ou intensa atividade física. De todo modo, a ausência de reparo dessas lesões pode levar à perda de massa muscular, deficiência na locomoção ou morte (Chargé e Rudnicki 2004).

Mas, tratando-se de células diferenciadas, como isso seria possível? Os núcleos das fibras musculares são pós-mitóticos e não possuem a capacidade de entrar em ciclo celular em caso de necessidade de reparo tecidual pós-trauma ou lesão. As respostas começaram a surgir no início da década de 60, quando Alexander Mauro observou um grupo de células mononucleadas na periferia de miofibras do músculo esquelético adulto através da microscopia eletrônica. Essas células foram denominadas **células satélites** e estão localizadas entre o sarcolema (membrana plasmática da fibra muscular) e a membrana basal, porção especializada da ECM, que circunda cada fibra (Mauro 1961). Tratam-se das **células-tronco** presentes no músculo.

O crescimento de fibras musculares esqueléticas pós-natal é substancialmente dependente de células satélites. Essas células induzem crescimento muscular tanto pela fusão a miofibras pré-existent (hipertrofia) ou, menos comumente, pela fusão entre si formando novas miofibras (hiperplasia) (Allouh *et al.* 2012; Allouh *et al.* 2012; Allouh *et al.* 2008).

As células satélites existem em estado quiescente. São células **indiferenciadas** e **mononucleadas**, possuindo grande atividade mitogênica cuja contribuição inclui, além do crescimento muscular pós-natal, o reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto (Rantanen *et al.* 1995; Foshini *et al.* 2004). Quando o músculo recebe o estímulo adequado, essas células são ativadas para proliferarem e se fusionarem, acarretando a reparação ou substituição das células musculares lesionadas (Alberts *et al.* 2010).

O programa miogênico via MRFs, no caso da ativação das células satélites no músculo pós-natal, ocorre de modo semelhante ao processo observado na embriogênese: durante a proliferação, as proteínas Myf5 e MyoD são expressas; com o comprometimento com a diferenciação, observamos Miogenina e MRF4 (Negroni *et al.* 2011; Chargé e Rudnicki 2004). Na figura 1.3, observamos um modelo esquematizado ilustrando o início desse processo.

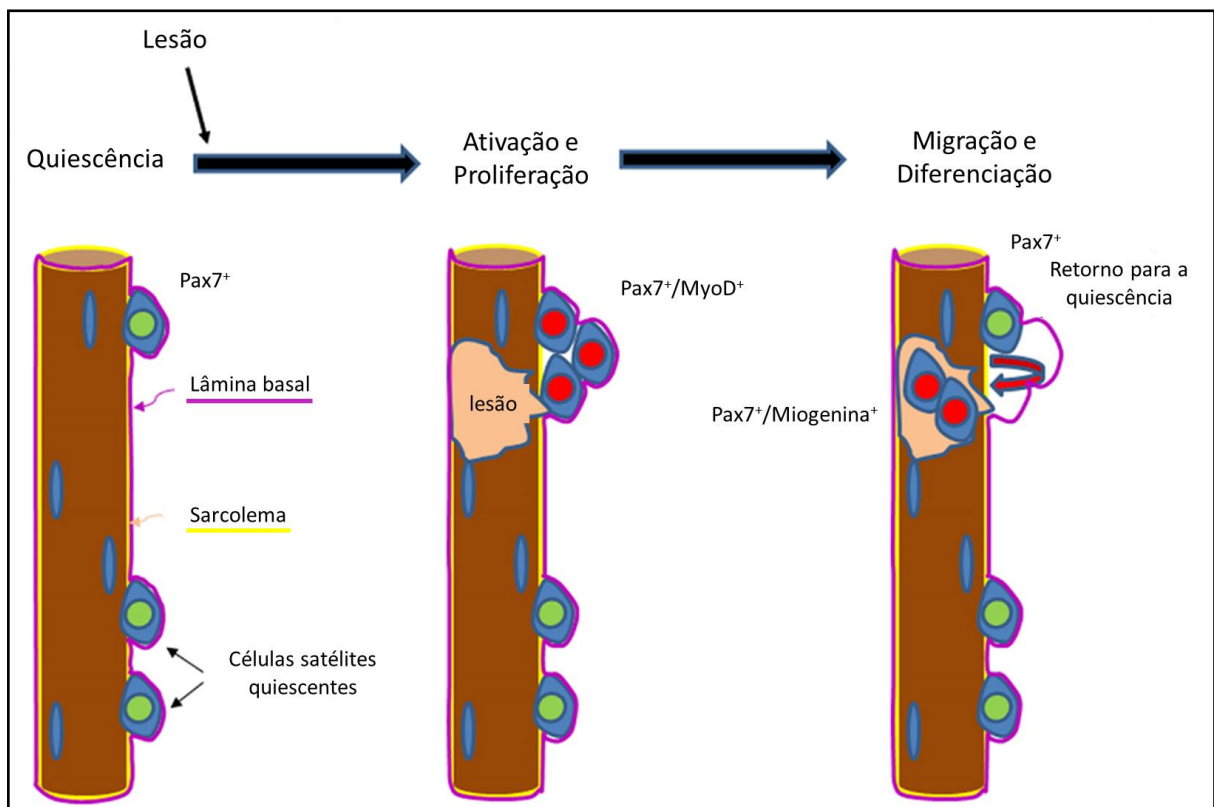


Fig. 1.3: Ativação da célula satélite e sua progressão dentro do programa miogênico. Células satélites estão posicionadas entre a lâmina basal (estrutura mais interna da membrana basal, em roxo) e o sarcolema (em amarelo). Estado quiescente (verde), essas células expressam Pax7. Após estímulo, essas células são ativadas e proliferam (vermelho), expressando Pax7 e MyoD. Algumas das células que proliferam voltam ao estado quiescente para manutenção do “pool” dessas células, outras migram para o local da lesão, onde fusionam com fibras existentes. Fonte: Adaptado de Alway *et al.* 2014

Naturalmente, as células satélites foram tradicionalmente associadas ao reparo e manutenção muscular. Entretanto, por sua natureza enquanto célula-tronco muscular,

aplicações em terapia celular vêm sendo cogitadas e estudadas, especialmente no que se refere a tratamento de distrofias musculares, como a Distrofia Muscular de Duchenne e outras doenças neuromusculares (Lindström e Thornell 2009).

1.b Células Satélites e Terapia Celular

A perda de função muscular crônica e debilitante é um problema que afeta a população mundial por diferentes motivos: pode ser resultado de **atrofia** (refere-se à redução da massa de músculos genotipicamente normais, por diversas causas possíveis) ou **distrofia** (perda de músculo funcional devido, usualmente, a defeito genético). Outro motivo de perda funcional muscular pode ser uma extensa lesão traumática por qualquer razão, gerando perda muscular volumétrica (Grogan e Hsu 2011).

Uma das causas mais recorrentes de atrofia é a chamada sarcopenia, perda muscular funcional relacionada majoritariamente ao envelhecimento, mas também sendo decorrente de diversos fatores como: distúrbios de inervação, diminuição da atividade física, anormalidades metabólicas e alterações na ativação das células satélites (Rocha *et al.* 2009; Doherty 2003).

Uma das mais severas e comuns distrofias musculares é a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que afeta meninos (1 a cada 3.600 a 7.000 nascidos vivos), ocasionada pela falta da proteína distrofina. É uma doença extremamente debilitante e fatal, com óbitos na jovem idade de 20 a 30 anos por problemas cardiorrespiratórios (Bladen *et al.* 2015; O'Brien e Kunkel 2001).

Existem possíveis estratégias terapêuticas para promover a regeneração muscular e a terapia celular é uma bastante promissora. Essa estratégia envolve a entrega de células capazes de gerar novas fibras em áreas afetadas. Essas células devem, evidentemente, possuir a capacidade de migrar ao local desejado e se diferenciarem. Nesse sentido, tanto os mioblastos como as células satélites seriam candidatos aceitáveis. De fato, ainda no final da década de 80, Partridge e colaboradores viram que mioblastos transplantados, em modelos animais, foram capazes de fundir com aqueles residentes, sugerindo a possibilidade de reparo em fibras defeituosas (Partridge *et al.* 1978). Entretanto, estudos clínicos em humanos na década de 90 não obtiveram resultados esperados (Gussoni *et al.* 1992; Huard *et al.* 1992; Karpati *et al.* 1993, Skuk e Tremblay 2015).

Como revisado por Briggs e Morgan (2015), alguns fatores são atribuídos ao insucesso da empreitada: morte massiva das células transplantadas, baixa capacidade migratória e rejeição do transplante pela falta da imunossupressão (Negróni *et al.* 2011).

Além disso, a diferenciação precoce dos mioblastos injetados também foi apontada como uma das causas de redução da eficácia do transplante dessas células (Riederer *et al.* 2012).

Montarras e colaboradores (2005) constataram que mioblastos em cultura geralmente reduzem consideravelmente sua capacidade regenerativa, em comparação com as células satélites (Montarras *et al.* 2005). Entretanto, como revisado por Bareja e Billin, o percentual existente de células satélites em adultos é baixo (aproximadamente 4% em humanos e murinos) e, adicionado ao fato que a população de células do músculo esquelético é bastante heterogênea, a eficácia do isolamento das células satélites é questionável (Bareja e Billin, 2013). Sabe-se que determinados perfis de subpopulações de células satélites murinas parecem ser mais eficazes que outros (Montarras *et al.* 2005; Collins *et al.* 2007).

Entretanto, é difícil mimetizar em cultura o comportamento das células-tronco de modo geral (incluindo as células satélites) em partes devido à compreensão limitada que possuímos sobre o nicho dessas células e da sua consequente influência *in vivo*. O “nicho” das células-tronco, entendamos como o conjunto de fatores determinantes para a evolução da terapia, sejam eles bioquímicos (fatores de crescimento, citocinas etc.) ou biofísicos (rigidez da matriz, topografia, temperatura, pH, oxigenação etc.) (Gilbert e Blau 2011).

Tendo em mente a localização das células satélites – entre a membrana da miofibrila (**sarcolema**) e a **membrana basal (MB)** – e próximas aos vasos sanguíneos e à junção neuromuscular, esse ambiente específico é considerado o nicho dessas células. Mais especificamente, nos atentaremos a partir de agora à importância da **matriz extracelular (ECM)** e um dos seus principais componentes: a glicoproteína **laminina (LM)**.

1.c Matriz extracelular e lamininas

A matriz extracelular (ECM) é um importante componente estrutural nos diversos tecidos e regula o crescimento, a proliferação, o movimento e a diferenciação das células que vivem no seu interior. Sua síntese e degradação acompanham a morfogênese, a regeneração, a cura de feridas, os processos fibróticos crônicos, a invasão e a metástase de tumores (Robins e Cotran 2010).

Os múltiplos componentes da matriz são secretados, principalmente, por células do tecido conjuntivo e dividem-se em dois tipos: 1) aqueles constituídos por moléculas proteicas alongadas, que se agregam formando estruturas fibrilares ou fibrosas; e 2) os constituintes que se agregam, mas não formam fibrilas ou fibras, e que, por sua vez, podem ter dois subtipos, a saber: a) glicoproteínas alongadas e b) glicosaminoglicanas e proteoglicanas (Junqueira e Carneiro 2005). Essas moléculas se organizam para formar duas formas básicas de ECM:

matriz intersticial e membranas basais (Robins e Cotran 2010) (Figura 1.4). A matriz intersticial consiste principalmente em colágeno fibrilar e não fibrilar, elastina, fibronectina, proteoglicanos e hialurona. As MBs estão intimamente associadas às superfícies celulares e consistem em colágeno não-fibrilar (principalmente do tipo IV), LM, heparan-sulfato e proteoglicanos (Lebleu *et al.* 2007).

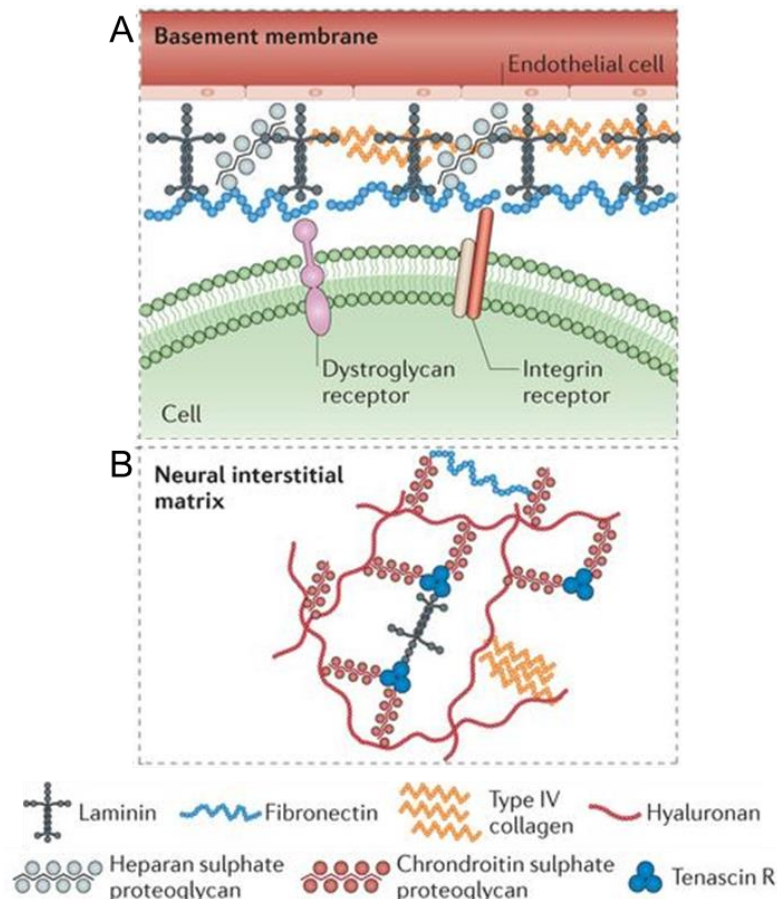


Fig. 1.4: Desenho esquemático dos principais componentes da matriz extracelular. Na parte A, esquema da membrana basal; em B, matriz intersticial. Fonte: Adaptado de Lau *et al.* 2010.

Dentre os componentes da MB, as LMs têm papel fundamental como principais proteínas adesivas e medeiam a adesão celular à MB (Nishiuchi *et al.* 2006). As LMs constituem uma família de grandes glicoproteínas heterotriméricas com multidomínios e compostas por 3 cadeias, α , β e γ (Aumailley *et al.* 2005; Miner e Yurchenco 2004) que, em vertebrados, existem em cinco, três e três formas geneticamente distintas, respectivamente. As possíveis combinações entre essas cadeias são denominadas isoformas e, até o momento, 18 foram descritas (Durbeej 2010). A nomenclatura das LMs é baseada na composição de suas cadeias. Por exemplo, a chamada “LM 111” é composta pelas cadeias $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ (ou LAMA1, LAMB1, LAMC1, de acordo com a nomenclatura das proteínas derivadas dos respectivos genes) (Aumailley *et al.* 2005). Uma representação de LM pode ser observada na Figura 1.5.

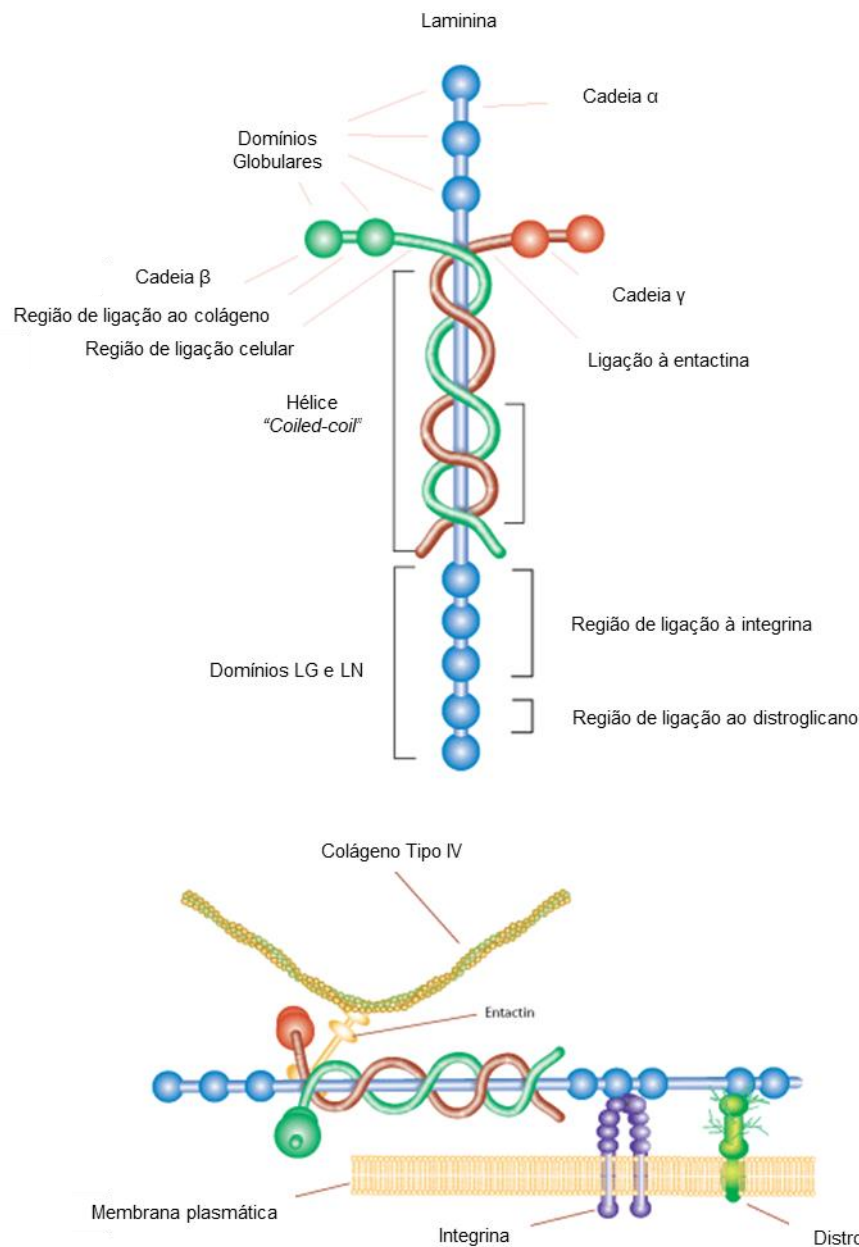


Fig. 1.5: Desenho esquemático da laminina (acima) com seus principais ligantes (abaixo). Em forma de cruz, a molécula é constituída por 3 polipeptídeos (cadeias α , β e γ) com seus respectivos domínios. Fonte: Adaptado de <<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/laminin.html>>

Na figura anterior (1.5), podemos observar a representação dos domínios. Na parte “basal” da cadeia α , o chamado “domínio G” é composto pelos resíduos de aminoácidos no carbono terminal e trata-se da maior porção para adesão celular da LM (são 5 domínios “G-like”, LG). Os “braços curtos” são compostos por domínio distal de LM N-terminal (LN), essenciais para polimerização da LM e organização da MB (vide figura 1.6). A estrutura central, de onde emergem as 3 pontas, é um motivo estrutural denominado hélice “superenrolada” (em inglês, *coiled-coil*) (Lebleu *et al.* 2007). Essa estrutura é caracterizada pela junção de 2 a 7 α -hélices que são enroladas como fios de uma corda (Liu *et al.* 2006).

No espaço tridimensional, a LM exibe a forma de um trevo de três folhas, onde as folhas (braços curtos) se projetam num plano ortogonal ao da haste (braço longo), como visto na figura 1.6. Esta estrutura 3D é particularmente adequada para favorecer a formação do polímero laminar que inicia a montagem das MBs *in vivo*. Nela, os três braços curtos interagem simultaneamente uns com os outros dentro de um único plano espacial, enquanto que o braço longo é deixado disponível para interagir com a superfície de células contíguas (Honester e Yurchenco 2013).

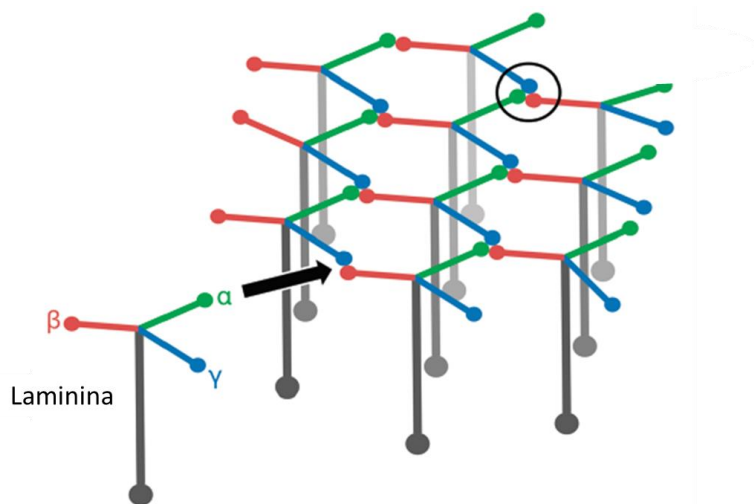


Fig. 1.6: Desenho esquemático do modelo de interação tridimensional das lamininas. Fonte: Adaptado de Honester e Yurchenco 2013

A expressão das LMs – assim como suas funções – são específicas de acordo com o tipo de célula e tecido, tais como adesão, migração e diferenciação. Células respondem a LMs, ou seja, estas influenciam nas vias de sinalização celular, através da ativação de receptores de membrana celular (Dubej 2010). As interações das células com LMs são mediadas por diversos receptores, classificados entre não-integrinas e integrinas. Dentre os do tipo não-integrina, encontram-se os sindecanos, distroglicano e glicoproteína do grupo sanguíneo Lutheran. (Dubej 2010) (Figura 1.7). Dentre esses receptores, integrinas desempenham papel principal na adesão celular a LMs. Integrinas são compostas por 2 subunidades (α e β) associadas de modo não-covalente. Até o momento, 24 tipos de heterodímeros integrinas foram identificados em vertebrados (Humphries 2002) e, dentre elas, as que se mostraram com capacidade de ligação às LMs foram: integrina **$\alpha 6 \beta 4$** , 6 membros da família de $\beta 1$ -integrina ($\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, **$\alpha 3 \beta 1$** , **$\alpha 6 \beta 1$** , **$\alpha 7 \beta 1$** , $\alpha 9 \beta 1$), e ainda 3 membros com sub-unidade αv ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 8$) (Belkin e Stepp 2000). A marcação em negrito realça as integrinas que possuem essa capacidade mais específica.

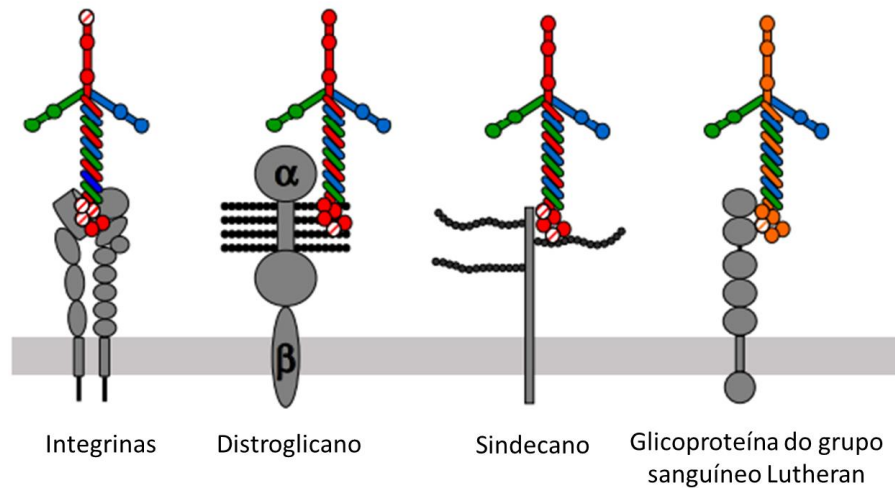


Fig. 1.7: Desenho esquemático dos principais receptores de lamininas. Fonte: Adaptado de Durbeej 2010.

1.d Músculo e lamininas

Nos músculos estriados esqueléticos, as LMs estão presentes na lâmina interna da MB, a lâmina basal que envolve cada fibra muscular. As principais isoformas de LM expressas no tecido muscular em torno nas fibras e nas junções neuromusculares são as LMs 211 e 221, ambas contendo a cadeia $\alpha 2$ (Colognato e Yurchenco, 2000).

Como bem revisado por Domogatskaya (2012), a isoforma **LM-211** é crucial para desenvolvimento e funcionamento de músculos. Fibras esqueléticas são cobertas por uma fina camada de MB que é fortemente ligada ao sarcolema. Na fase embrionária, a MB muscular contém cadeia $\alpha 2$ (Sanes *et al.* 1990), assim como, em menor quantidade, as cadeias de LM $\alpha 4$ e $\alpha 5$ (Patton *et al.* 1999). Em adultos, a LM211 é a isoforma majoritariamente presente no músculo, mas não a única. Trata-se de órgão ricamente vascularizado, e a MB das células endoteliais possui as isoformas 411 e 511 como principais componentes (Hallmann *et al.* 2005). Além disso, a sinapse neuromuscular, que é a junção entre a placa motora e a fibra muscular, possui as cadeias de LM $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\beta 2$ (Nishimune *et al.* 2017). Assim, durante o processo de regeneração muscular, quando todos os componentes do musculo precisam se “reconstruir” (miogênese, recuperação motora, angiogênese, entre outros), é possível que as diferentes isoformas presentes nesse tecido possam se ligar a mioblastos em proliferação e diferenciação.

Além disso, células do músculo esquelético expressam receptores de LM do tipo integrina $\alpha 6\beta 1$ (ou VLA6) e $\alpha 7\beta 1$ (ou VLA7), além do complexo distroglicano. Foi também demonstrado que $\alpha 7\beta 1$ participa na integridade e função do músculo esquelético (Burkin *et al.* 1999; 2001).

Mutações na cadeia $\alpha 2$ da LM (LAMA2) são responsáveis por 50% das distrofias musculares congênitas que cursam com a perda progressiva da força e capacidade de contração da musculatura esquelética (Carmignac e Durbeej 2012).

Para que haja mais compreensão acerca da expressão e função de LMs sobre músculo, modelos de estudo apropriados são necessários.

1.d.1 Modelos de estudo da interação entre músculo e laminina

Em 2005, um pesquisador do nosso laboratório em pós-doutorado, sob a orientação dos pesquisadores Gillian Butler-Browne e Vincent Mouly (Instituto de Miologia/UPMC, Paris, França), participou de um projeto que desenvolveu um novo modelo de camundongos imunodeficientes, $Rag2^{-/-} \gamma C^{-/-} C5^{-/-}$, onde mioblastos humanos transplantados não eram rejeitados, e eram capazes de se diferenciar e formar fibras humanas, e também fibras mistas (murina/humana) no músculo do camundongo receptor, de forma superior a outros modelos de camundongos imunodeficientes (Cooper *et al.* 2011; Guigal *et al.* 2002; Silva-Barbosa *et al.* 2005; Mouly *et al.* 2005).

A partir desses trabalhos, uma colaboração entre nosso laboratório e o grupo francês foi iniciada, estreitada e mantida até o presente momento. Como o LPT já possuía uma expertise no estudo da ECM, particularmente sobre o papel da LM em diversos eventos biológicos do sistema imunológico, foi decidido avaliar a expressão e papel funcional da LM no modelo humanizado acima citado. Nesse estudo, Silva-Barbosa e colaboradores (Silva-Barbosa *et al.* 2008), submeteram o músculo *Tibialis Anterior* (TA) de camundongos imunodeficientes $Rag2^{-/-} \gamma C^{-/-} C5^{-/-}$, à criolesão ou irradiação local e, logo em seguida, mioblastos humanos foram injetados nos músculos lesionados. Foi então observado que as células humanas transplantadas se localizavam em áreas ricas em LM, momento importante para a trajetória de todo estudo. Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que LM é capaz de aumentar a sobrevivência destes precursores, sua capacidade proliferativa e sua resposta migratória (Silva-Barbosa *et al.* 2008).

Funcionalmente, foi ainda observado por Goudenege e colaboradores (2010) que a transplantação de mioblastos com LM-111 em camundongos denominados “mdx” (modelo murino para distrofia de Duchenne) aumentou o potencial miogênico das células transplantadas (com mais fibras oriundas dos mioblastos transplantados quando comparados aos controles injetados sem essa LM). *In vitro*, os mesmos autores demonstraram que esta molécula aumentou a proliferação e migração dos mioblastos murinos, o que explicaria o maior número de fibras um mês após o transplante.

Mais recentemente, estudos foram realizados em modelos murinos e observaram que, ativadas, as células satélites modificam seu nicho de matriz extracelular através da produção de enzimas que catalisam o remodelamento da MB e, em seguida, promovendo a síntese de LAMA1 e LAMA5 (Rayagiri *et al.* 2018), sendo essas duas subunidades de LM sabidamente associadas à miogênese embrionária (Anderson *et al.* 2009).

Entretanto, apesar de diversos estudos correlacionarem a LM a relevantes funções celulares, pouco foi estudado sobre suas diversas isoformas e a importância no complexo processo de regeneração muscular. A ECM não somente forma um arcabouço estrutural para a fibra muscular, mas também estimula sinais intracelulares aos tipos celulares em contato, como a LM, que modula a sobrevivência, adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, que também são eventos fundamentais na miogênese (Riederer *et al.* 2015). Além disso, a ECM é capaz de sequestrar fatores solúveis como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, ampliando ou regulando os efeitos destas moléculas. Um maior conhecimento da expressão qualitativa, quantitativa e temporal dessa molécula durante a miogênese poderá fornecer novas informações sobre o processo de diferenciação e fusão muscular, mas também pode encontrar novos candidatos terapêuticos para as estratégias de terapia celular no tratamento de distrofias musculares.

2. OBJETIVOS

2.a Objetivo Geral

- Avaliar a expressão e função das isoformas de LM na proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos humanos em modelos *in vitro*.

2.b Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a expressão de diferentes isoformas de LM na proliferação, diferenciação e fusão dos mioblastos humanos;
- Avaliar *in vitro* o papel de diferentes isoformas de LM na proliferação, diferenciação e fusão dos mioblastos humanos, tratando as culturas celulares com isoformas de LM recombinantes;
- Avaliar a diferenciação de mioblastos humanos *in vitro* após o bloqueio de cadeia de LM com anticorpo monoclonal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.a Cultivo celular

Utilizamos três diferentes células musculares neste trabalho, todas gentilmente cedidas pelo laboratório do grupo colaborador francês (*Thérapie des maladies du muscle strié/Institut de Myologie UM76, Université Pierre et Marie Curie, INSERM-U974; CNRS-UMR7215, Paris, França*). São elas:

- a) CHQ: Mioblastos humanos obtidos a partir de explantes. Células CHQ são consideradas jovens até um terço do total de divisões (Mouly *et al.* 2005), e utilizamos em nosso estudo mioblastos CHQ com até 35 divisões. São células obtidas de cultura primária cuja “pureza miogênica” deve ser controlada devido à contaminação natural por fibroblastos. Esse controle é feito a partir da marcação de desmina por imunofluorescência, uma das proteínas que constituem o filamento intermediário de células musculares. Todos os experimentos foram realizados com células cuja miogenicidade estivesse acima de 75%. As células CHQ são cultivadas em meio denominado “KMEM” sem dexametasona com 20% de soro fetal bovino (SBF). A composição do meio KMEM encontra-se na tabela 3.1.
- b) Clone 25 (C125): Essas células foram obtidas do mesmo doador da CHQ e imortalizadas. Seu meio de cultivo é o “KMEM” com dexametasona e 20% de SBF. Todos os componentes estão discriminados na tabela 3.1.
- c) LHCN-M2: Assim como as “C125”, as LHCN-M2 são células musculares imortalizadas cujo meio de cultivo é o “KMEM” com dexametasona e 20% de SBF.

Componente	Concentração	Fabricante e catálogo
Meio DMEM High Glucose	4 partes	Gibco; 10566
Meio 199	1 parte	LGC; BR30006-05
Fetuína	25 µg/mL	Gibco; 10344-026
bFGF recombinante humana	0,5 ng/mL	Gibco; PHG0024
EGF recombinante humana	5 ng/mL	Gibco; PHG0311
Insulina	5 µg/mL	Sigma; 91077C-1G
Dexametasona	0,2 µg/mL	Sigma; D4902-100mg
Gentamicina	50µg/mL	ThermoFisher; 15750060
Soro Fetal Bovino	20%	Gibco; 12657029

Tab.3.1: Composição do Meio KMEM utilizado para células musculares em proliferação.

Para que ocorra a **diferenciação** desses 3 tipos de células musculares, ou seja, para os mioblastos em cultura se diferenciem em miotubos, são necessárias condições específicas de cultivo. São elas: i) confluência adequada, superior a 90%; ii) ausência de soro fetal bovino e iii) meio DMEM high glucose com adição de insulina a 10 µg/mL.

3.b Identificação das cadeias de lamininas por imunofluorescência

3.b.1 *In situ*, nas lâminas com músculos transplantados com precursores miogênicos

Anteriormente a este trabalho, no laboratório de Vincent Mouly, músculos *Tibialis Anterior* (TA) de camundongos imunodeficientes Rag2^{-/-} γC^{-/-} C5^{-/-} foram lesionados por criolesão ou irradiação e, em seguida, transplantados com mioblastos humanos CHQ. Após o tempo determinado previamente no desenho da cinética de regeneração, o camundongo foi apropriadamente eutanasiado, o TA foi congelado, cortado em criostato e o corte foi aderido à lâmina.

Realizamos a marcação por imunofluorescência de alguns dos cortes importados para o Brasil no tempo de 21 dias pós-lesão. As lâminas, armazenadas a -80°C, foram fixadas e marcadas. Foram usados os anticorpos anticadeia α1, α4 e α5 (informações na tabela 3.2), além de anti-espectrina humana (Spec 1). Todas as marcações foram fotografadas posteriormente em microscópio de fluorescência.

3.b.1 *In vitro*, nas culturas celulares de CHQ, CI25 e LHCN-M2

Para identificarmos as cadeias de LMs presentes em diferentes estágios do cultivo celular, cultivou-se as células (CHQ, CI25 e LHCN-M2) em LabTeks de permanox nas

condições ideais de proliferação e diferentes tempos de diferenciação (24h, 3d, 5d e 7d). Para proliferação, plaqueou-se 5×10^3 células/poço em meio de proliferação (KMEM 20% SBF com ou sem adição de dexametasona, dependendo do tipo celular). Já para os pontos de diferenciação, as células foram plaqueadas em maior confluência (10^4 células/poço) em meio de proliferação também, e, após atingirem confluência superior a 90%, o meio foi trocado para o apropriado para diferenciação (DMEM High Glucose com adição de insulina a $10 \mu\text{g/mL}$), sendo este dia considerado o “dia 0” de diferenciação.

Após o período discriminado, as células foram fixadas com etanol P.A. durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para a posterior marcação, utilizamos a técnica de imunofluorescência indireta, cujos anticorpos primários estão listados na tabela 3.2. Todas as marcações foram fotografadas em microscópio de fluorescência.

Anticorpo Primário	Fabricante e Catálogo
LAMA1, clone AL-4 (anticadeia $\alpha 1$ de laminina)	R&D Systems; MAB4656
LAMA2, clone 5H2 (anticadeia $\alpha 2$ de laminina)	Millipore; MAB1922
LAMA4, clone 3H2 (anticadeia $\alpha 4$ de laminina)	Santa Cruz; Sc16592
LAMA5, clone 4c7 (anticadeia $\alpha 5$ de laminina)	Millipore; MAB1924

Tab. 3.2: Relação dos anticorpos primários utilizados na identificação das cadeias de laminina (LM).

3.c Identificação das cadeias de lamininas por RT-PCR

Para identificarmos as cadeias de LMs via RT-PCR, cultivamos as células C125 em placas de 150mm de diâmetro (maiores que o tamanho usualmente utilizado para expansão, de 100mm). As células foram plaqueadas em triplicata numa quantidade aproximada de 10^6 /placa nas seguintes condições: proliferação e diferenciação nos tempos de 24h, 3d, 5d e 7d. Em todas as condições, as células foram inicialmente plaqueadas em meio KMEM com 20% de SFB (meio de proliferação). Entretanto, as placas destinadas à diferenciação tiveram seus meios de proliferação substituídos por meio de diferenciação (DMEM High Glucose com insulina a $10 \mu\text{g/mL}$) quando a confluência atingiu 90% das placas. Este foi considerado o “dia 0” de diferenciação.

Após o tempo previsto em cultivo de cada condição, as células foram recolhidas através da tripsinização. Após lavagens e centrifugações, as células, depositadas em tubos Eppendorf autoclavados, foram alocadas em freezer a -80°C .

Foi realizado o isolamento do RNA através do “RNeasy Mini Kit” (Qiagen), quantificação via NanoDrop, síntese de DNA complementar (cDNA) e, então, o RT-PCR foi realizado com Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no Sistema de PCR em Tempo Real Super Script. As sondas moleculares foram previamente projetadas através do programa Primer Express (Applied Biosystems) e suas sequências encontram-se discriminadas na tabela 3.3 abaixo.

Gene	Sequência do <i>Primer</i>
LAMA1 (F)	TGGAGTACGTTCCCGGCGCT
LAMA1 (R)	AGGCGAACGTGCGGATGCTT
LAMA2 (F)	GGGCTCAGGAATGGCTTCCGTTG
LAMA2 (R)	TTCTCAGCGTTGGCAGGCCAC
LAMA3 (F)	CCGGACGGTGTGTTCCCTGC
LAMA3 (R)	CACAGTGCTCTCCCGCGGTG
LAMA4 (F)	AGCAGAAGCGACCTGCAAGCA
LAMA4 (R)	GTTCCGGCCGCTTCACAGGG
LAMA5 (F)	GGCCTGGAGTACAACGAGGTCAAC
LAMA5 (R)	CCAGGGGCACGATGCGTGAGT
LAMB1 (F)	TCCGAGTGCCTGAAGGGGCT
LAMB1 (R)	CACACCGGCCGAGGAAGGAC
LAMB2 (F)	TTGTGCAGCGTCCAGGGCCT
LAMB2 (R)	AGGGAGTCTCAGGCTGGGCAC
LAMC1 (F)	GCCGTGGAGGAGGGCAACTG
LAMC1 (R)	CCCCCATGGCCAGTGGAACG
LAMC2 (F)	ACAACCTCCGGACGGTGCAGC
LAMC2 (R)	CCTGCGATGCCAGCTGGGTC
LAMC3 (F)	CAGACGCAAGCCACGCTCCA
LAMC3 (R)	GACCCAGCCTGGCAAGCAG
ITGA6 (F)	GGCCATGCACGCGGATCGA
ITGA6 (R)	CGACCTTGCCCCCTGGACCTT
ITGA7 (F)	GGTGAGGGGCGAGAGAGCCA
ITGA7 (R)	CTTTCTGCCAGGCCCTGC

Tab. 3.3: Descrição dos *primers* utilizados. “F”, do inglês *forward*; “R”, do inglês *reverse*.

3.d Ensaio de proliferação com coating de lamininas

Para analisarmos a proliferação de CHQ e C125 frente a diferentes isoformas de LMs, realizamos o tratamento das isoformas (*coating*) em lamínulas de vidro *overnight* a 4°C na concentração de 10µg/mL. Essas lamínulas são de 13mm de diâmetro (Knittel Glass) e foram previamente autoclavadas, tratadas e alocadas em placas de cultivo de 24 poços.

As isoformas de LMs humanas recombinantes utilizadas, todas comercializadas pela BioLamina, estão relacionadas na tabela 3.4.

Isoforma	Catálogo	Concentração utilizada
111	LN111-03	10µg/mL
121	LN121-02	
211	LN211-02	
221	LN221-02	
411	LN411-02	
421	LN421-02	
511	LN511-03	
521	LN521-02	

Tab. 3.4: Relação das isoformas de lamininas comercializadas pela BioLamina utilizadas neste trabalho. As lamininas foram diluídas em DPBS com cálcio e magnésio (Gibco).

Além das isoformas de LMs, foram utilizadas **lamínulas controle** nas seguintes condições: a) apenas vidro; b) *coating* com BSA a 10 µg/mL; c) *coating* com gelatina e d) *coating* com LM111 murina.

Após o tratamento com as isoformas humanas, a LM111 murina e o controle BSA, as lamínulas foram lavadas com DPBS com Ca e Mg (Gibco) e armazenadas a 4°C. O *coating* com gelatina foi realizado à temperatura ambiente por 2 horas. As células foram então plaqueadas em duplicata nas lamínulas tratadas e alocadas em placas de 24 poços (5x10³ células/poço de C125 ou 7x10³ de CHQ) para o tempo de proliferação de 2 dias.

Para avaliarmos a proliferação, utilizamos estratégias diferentes para CHQ e C125. Para a célula primária CHQ, utilizamos a marcação com o anticorpo anti-Ki67 (Abcam; catálogo: AB833) e antidesmina (Clone D33, DBS, catálogo: Mob060), sendo o percentual de mioblastos em proliferação considerado como células Ki-67⁺ dentre as células Desmina⁺.

No caso da célula imortalizada C125, foi utilizado o kit “Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit” (Thermofisher, catálogo: C10337). O EdU (*5-ethynyl-2'-deoxyuridine*) é incorporado ao DNA recém-sintetizado (Salic e Mitchison 2008) e a quantificação da proliferação celular foi dada pelo percentual de células EdU⁺ dentre todos os núcleos quantificados (corados, em ambas situações, com DAPI). Foram analisadas células C125 em proliferação após 2 e 5 dias, sendo o EdU adicionado no final do experimento, na janela de tempo mais adequada antes de fixar a placa (2 horas antes em proliferação de 2 dias e 5 horas antes, no caso de 5 dias). Dessa forma, temos um “retrato” de células em síntese no final do ponto da cinética específico.

Em ambas estratégias, as células foram fotografadas em microscópio de fluorescência (no mínimo, 5 campos aleatórios) e quantificadas com o auxílio do software Image J (Broken Symmetry Software versão 1.4.3.67).

3.e Ensaio de diferenciação com coating de lamininas

De modo semelhante à metodologia do item “3.d”, as células Cl25 e CHQ foram plaqueadas em lamínulas de vidro previamente tratadas. As condições foram as mesmas: somente vidro, BSA, gelatina, LM111 murina e as isoformas de LM humana recombinante: 111, 121, 211, 221, 411, 421, 511 e 521 (vide tabela 3.4).

A quantidade de célula plaqueada por poço foi de 3×10^4 em meio DMEM High Glucose com insulina a 10 $\mu\text{g/mL}$. No caso das células Cl 25, os tempos de diferenciação foram: 2 e 5 dias. Já as células CHQ, foram: 3, 5 e 7 dias.

Após o tempo discriminado, as células foram fixadas com etanol P.A. e marcadas via imunofluorescência indireta. Para mensurar a formação de miotubos em cultura, utilizamos o índice de diferenciação através da marcação da cadeia pesada da miosina em miotubos (em inglês, *myosin heavy chain*, MyHC – clone MF20. R&D Systems; catálogo MAB4470).

As células foram fotografadas em microscópio de fluorescência (no mínimo, 5 campos aleatórios) e quantificadas com o auxílio do software Image J (Broken Symmetry Software versão 1.4.3.67).

3.f Bloqueio da cadeia de laminina

Para avaliar o papel da cadeia de LM na diferenciação, tratamos as células CHQ com anticorpos anticadeia $\alpha 5$ de LM (clone 4c7, Millipore, catálogo: MAB1924) na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Para controle, foi utilizado tratamento com imunoglobulinas murinas purificadas (Ig purif, BD, catálogo: 557273), além de um dos poços não receber nenhuma intervenção.

As células foram plaqueadas em LabTeks permanox de 8 poços na quantidade de 10^4 /poço em meio de proliferação e deixadas a 37°C até atingirem confluência desejada de 90% (geralmente, de 3 a 5 dias depois). Na confluência adequada, o meio é trocado para a diferenciação e o esquema de tratamento se inicia (dia 0). De acordo com o tratamento recebido, o poço da LabTek foi identificado da seguinte maneira:

- Co: poço controle, apenas meio de diferenciação
- Ig: tratamento com Ig murina purificada

- Condição (5D): tratamento com anticorpos mantidos em todos os dias de diferenciação.
- Condição (2D+3D-): anticorpos mantidos em cultura somente nos dois primeiros dias de diferenciação.
- Condição (3D-2D+): anticorpos mantidos nas culturas durante os dois últimos dias de diferenciação.

Na tabela 3.4 abaixo, encontra-se o esquema com a cinética de tratamento.

Identificação poço LabTek	Dias										Fixar em Etanol	
	0		1		2		3		4			5
	M	AC	M	AC	M	AC	M	AC	M	AC		
Controle (Co)	X				X							
Ig		X			X							
5D		X				X						
2D+3D-		X			X							
3D-2D+	X							X				

Tab. 3.5: Organização do tratamento com anticorpos monoclonais anticadeia $\alpha 5$ de LM (4c7). M = somente meio de diferenciação; AC = meio de diferenciação com anticorpo diluído a 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Identificação poço: Controle (Co) = sem tratamento, apenas adição de meio. Ctrl Ig= tratamento com Ig controle. Condição “5D”= tratamento com anticorpos mantidos em todos os dias de diferenciação. Condição (2D+3D-)= anticorpos mantidos em cultura somente nos dois primeiros dias de diferenciação. Condição (3D-2D+)= anticorpos mantidos nas culturas durante os dois últimos dias de diferenciação.

Após a fixação no dia 5 de diferenciação com etanol P.A., as LabTeks foram marcadas via imunofluorescência indireta com o anticorpo anticadeia pesada de miosina em miotubos (em inglês, *myosin heavy chain*, MyHC – clone MF20. R&D Systems; catálogo MAB4470) e DAPI.

As células foram fotografadas em microscópio de fluorescência (no mínimo, 5 campos aleatórios) e quantificadas com o auxílio do software Image J (Broken Symmetry Software versão 1.4.3.67).

3.g Análise Estatística

Os valores obtidos foram compilados em tabelas de Excel e a análise descritiva foi realizada através de média amostral e desvio padrão (média \pm DP). Os cálculos foram feitos com auxílio do software GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

Além da cadeia $\alpha 2$, dados na literatura já haviam demonstrado a expressão transitória de diferentes cadeias de LM durante o processo de regeneração muscular em modelo animal (Sorokin *et al.* 2000; Ringelmann *et al.* 1999). Decidimos investigar se outras isoformas **humanas** poderiam estar presentes no processo de regeneração.

Utilizando amostras de músculo TA de camundongos imunodeficientes Rag2^{-/-} γ C^{-/-} C5^{-/-} transplantados com mioblastos humanos CHQ, confirmamos com o uso de anticorpos específicos humanos, por imunofluorescência, a presença das cadeias de LM $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$, em torno de mioblastos e fibras humanas (em verde), indicando a possível presença de outras isoformas de LM, além das 211 e 221, durante o processo de regeneração muscular. As fibras humanas foram identificadas pela marcação do anticorpo anti-espectrina humana, sendo sua visualização mais favorável nos aumentos de 200x. Podemos notar que ocorre uma co-localização de espectrina, em vermelho, com as diferentes cadeias de LM (em verde), mostrando a marcação dessas cadeias em torno da fibra. Em aumento menor da marcação de $\alpha 1$ (100x), identificamos com clareza a marcação mais expressiva de LM no sítio de injeção das células humanas, mas que é negativa nas áreas onde as células humanas não estão presentes (Figura 4.1)

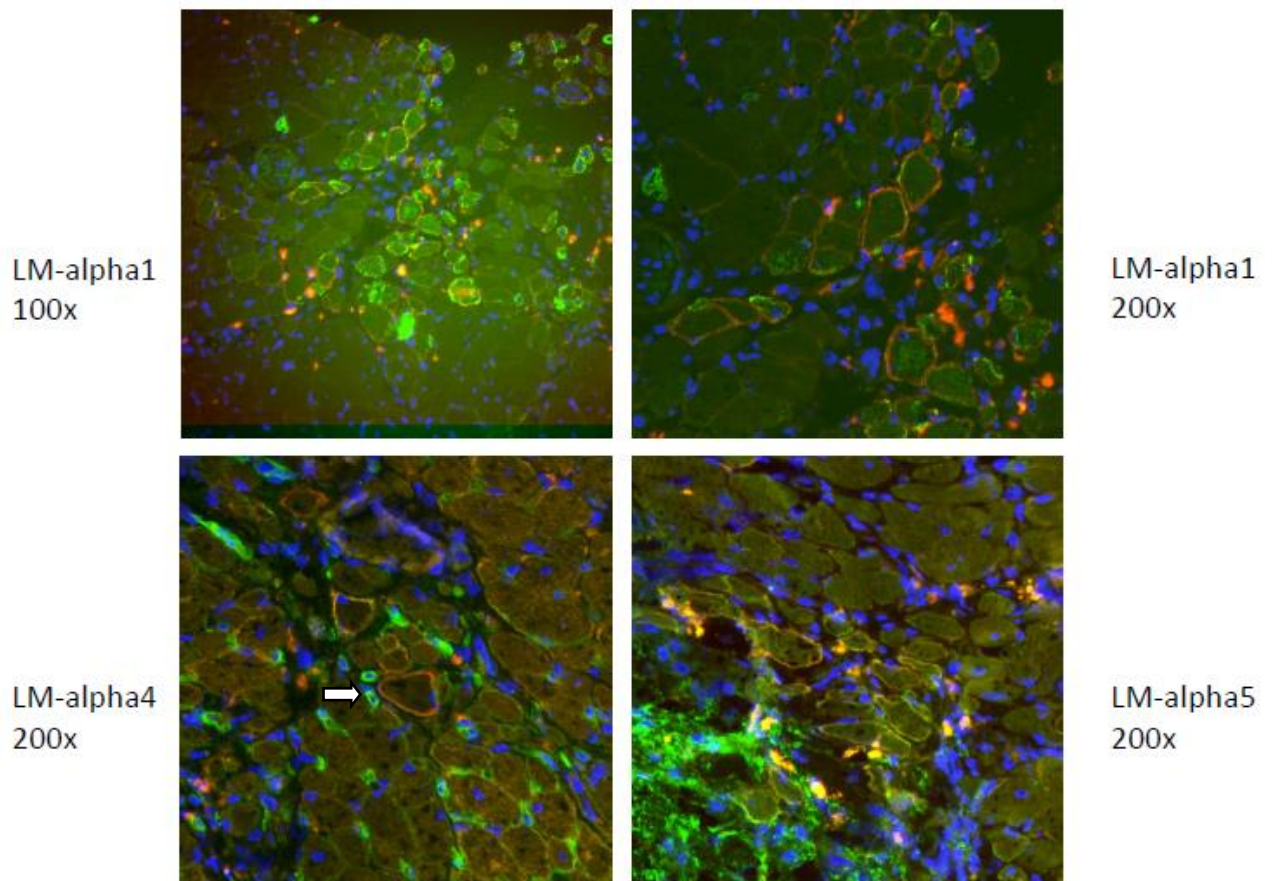


Fig. 4.1. Expressão de cadeias de LM (em verde) e espectrina humana (vermelho) em músculo TA de camundongos imunodeficientes após 21 dias do transplante de mioblastos humanos. Em lâminas congeladas contendo cortes de músculo TA de camundongos Rag2^{-/-} γC^{-/-} C5^{-/-} transplantados com mioblastos humanos CHQ foram marcadas com anticorpo anti-LM para as cadeias α1, α4 e α5, além do anticorpo anti-espectrina humana. Os cortes foram fotografados em microscópio de fluorescência nos aumentos de 100 e 200x. “Seta branca” em LM α4 indicando marcação desta cadeia em localização periférica às fibras musculares.

Esses resultados confirmam dados ainda não publicados do nosso grupo, que mostraram a presença das cadeias α1 e α5, além da cadeia α2, na região de mioblastos humanos transplantados. Além disso, também demonstramos a presença da cadeia α4, tanto em volta das fibras musculares, quanto positivas em células localizadas próximas às fibras musculares, semelhante à posição anatômica das células satélites (vide seta branca na figura 4.1). Uma combinação de anticorpos será necessária para definir se as células LM α4⁺ são mioblastos humanos em posição satélite.

A demonstração da expressão das cadeias α4 e α5 de LM *in situ* corroborou os dois únicos trabalhos que mostraram a presença de outras cadeias de LM, além da cadeia α2, durante a regeneração muscular em modelo murino (Sorokin *et al.* 2000; Ringelmann *et al.* 1999). Nesses dois trabalhos, apesar da presença de outras cadeias de LM nas fibras formadas nos músculos de camundongos em regeneração, não é possível excluir a possibilidade de que

essas LMs pudessem estar sendo produzidas por outras células do microambiente e posteriormente aderidas/ligadas às células humanas através de receptores específicos.

No nosso modelo, os anticorpos usados para detectar as cadeias de LM são humanos-específicos, descartando a possibilidade de que outras isoformas de LM (produzidas na junção neuromuscular e pelas células endoteliais, por exemplo) pudessem ser ligadas à superfície dos mioblastos humanos. Por outro lado, os mioblastos humanos CHQ usados no experimento da figura 4.1 não são puros, apresentando um natural percentual de fibroblastos (discutido adiante de modo mais aprofundado). Essas células, conhecidas produtoras de ECM, poderiam estar produzindo as LMs.

Para verificar se as cadeias de LM $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$, co-localizadas com mioblastos e miotubos humanos em músculos TA de camundongos imunodeficientes $Rag2^{-/-} \gamma C^{-/-} C5^{-/-}$, como demonstrado pelo nosso grupo (e visto na figura 4.1) eram de fato produzidos pelos progenitores musculares, resolvemos investigar a expressão dessas cadeias na proliferação e diferenciação de mioblastos humanos *in vitro*.

4.a Proliferação e diferenciação de mioblastos humanos *in vitro*

Neste trabalho, utilizamos três linhagens de mioblastos humanos que foram gentilmente cedidas pelo nosso colaborador francês Dr. Vincent Mouly. A linhagem CHQ, que foi a célula utilizada nos estudos acima citados, é derivada de uma cultura primária obtida pela técnica de explantes de biópsias musculares (Edom *et al.* 1994). Essas células foram mantidas em cultura somente quando apresentavam miogenicidade (relação de mioblastos sobre células não-miogênicas, majoritariamente fibroblastos) igual ou maior que 75%. Para esse controle, identificamos células miogênicas presentes na cultura CHQ através principalmente da técnica de imunofluorescência com o uso do anticorpo antidesmina. Para a detecção dos miotubos, utilizamos o anticorpo anticadeia pesada de miosina (MyHC).

À esquerda da figura 4.2 (A), observamos células CHQ em proliferação marcadas com anticorpo antidesmina. O percentual da quantidade de núcleos pertencentes a células desmina+ em relação à quantidade total de núcleos (marcados com DAPI) nos fornece a miogenicidade dessas células. À direita (Figura 4.2B), observamos miotubos que, após serem devidamente estimulados (elevada confluência celular e meio sem soro), se diferenciaram e fusionaram, sendo marcados positivamente com anticorpo que reconhece MyHC (cadeia pesada da miosina).

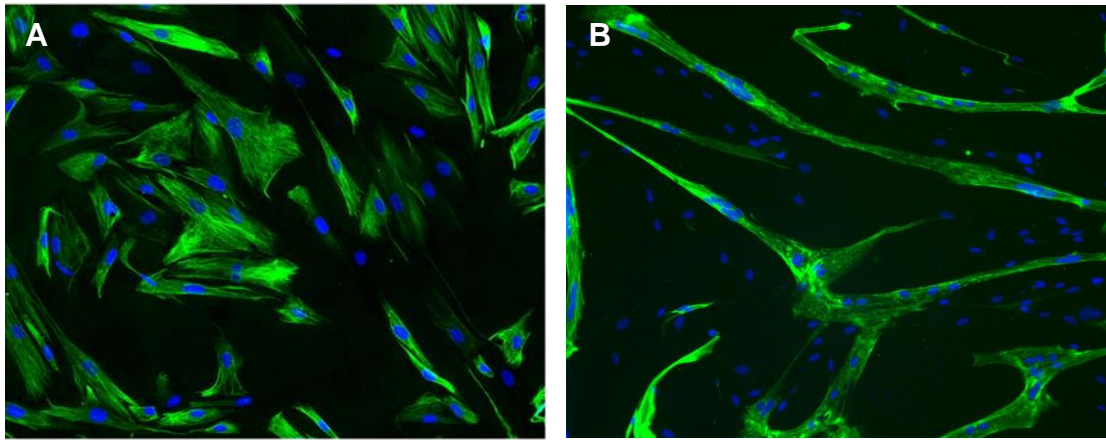


Fig. 4.2. Determinação da miogenicidade e potencial de fusão das células CHQ. A imagem 4.2a mostra a identificação das células miogênicas (mioblastos) em culturas de CHQ em proliferação (em verde, anticorpo antidesmina). A imagem à direita, 4.2b mostra células miogênicas fusionadas após a indução da diferenciação em cultura (em verde, anticadeia pesada da miosina, MyHC). Os núcleos foram marcados com DAPI. N>10. Aumento = 100x.

4.b Identificação das cadeias de lamininas por imunofluorescência

Para investigarmos a expressão de isoformas de LM nas CHQ *in vitro*, utilizamos anticorpos monoclonais específicos para diferentes cadeias alfas de LM através da técnica de imunofluorescência (Figura 4.3). Na fase de proliferação, somente a cadeia $\alpha 1$ foi observada. No ponto 24h da cinética de diferenciação, a mesma cadeia continuava sendo observada. No dia 3, quando a fusão é mais evidente nas CHQs, observamos a expressão das cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$. Interessante notar que a expressão da $\alpha 5$ foi observada principalmente nos miotubos. Por fim, a cadeia $\alpha 2$, que é expressa na MB das fibras maduras, foi detectada mais tardiamente, em miotubos mais maduros, notoriamente a partir de 7 dias de diferenciação.

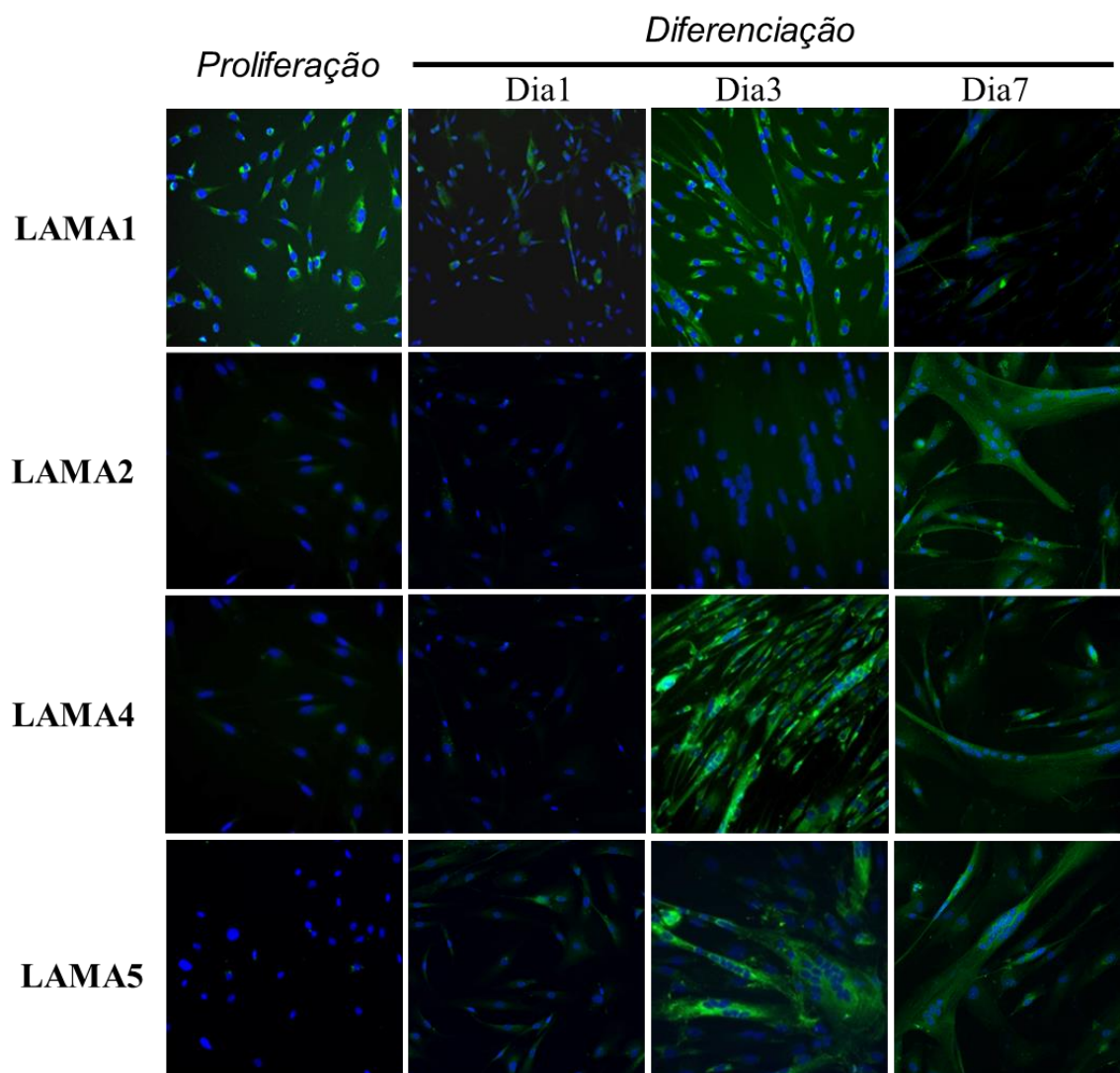


Fig. 4.3: Expressão de diferentes cadeias de LM em CHQ. As células foram mantidas em meio de proliferação e, quando a cultura se tornou confluenta, o meio de diferenciação foi adicionado. Em proliferação e nos dias 1, 3 e 7 após indução da diferenciação, as culturas foram fixadas. Em verde podemos observar a imunomarcação para as cadeias de LM α 1, 2, 4 e 5. Os anticorpos primários foram revelados com o uso do secundário GAM-AF488. Os núcleos podem ser observados em azul (DAPI). N=3. Aumento: 100x.

Como já visto, as células CHQ são mioblastos humanos derivados de cultura primária e por isso, a cultura não é pura, apresentando uma parcela importante de fibroblastos (Edom *et al.* 1994). Assim, apesar de observarmos mioblastos e miotubos positivos para as cadeias de LM, não é possível excluir a possibilidade de que essas isoformas possam estar sendo produzidas pelos fibroblastos e posteriormente adsorvidas e aderidas às membranas das células musculares via receptores que essas células possuem. Para resolver essa questão, utilizamos a linhagem imortalizada C125, derivada da cultura primária CHQ. A C125, ao contrário da CHQ, apresenta uma miogenicidade de 100% (todas as células são desmina positivas), e se diferenciam em miotubos nas condições de cultura ideais.

Com um perfil semelhante às células CHQ, as culturas de CL25 expressaram todas as cadeias α testadas na cinética de diferenciação. Observamos que a cadeia $\alpha 5$ foi detectada em todos os pontos da cinética de diferenciação, sendo que essa última apresentou uma expressão discreta nos dias 1 e 2 pós-diferenciação. A partir do dia 3, todas as cadeias foram observadas, tanto nas células indiferenciadas quanto nos miotubos (Figura 4.4). Como essas culturas são puras, confirmamos que mioblastos produzem essas cadeias, indicando que diferentes isoformas de LM possam estar sendo produzidas e secretadas pelos progenitores musculares humanos em proliferação e quando diferenciados. Porém, uma análise mais detalhada é necessária para demonstrar que tanto mioblastos, quanto miotubos podem produzir as LMs.

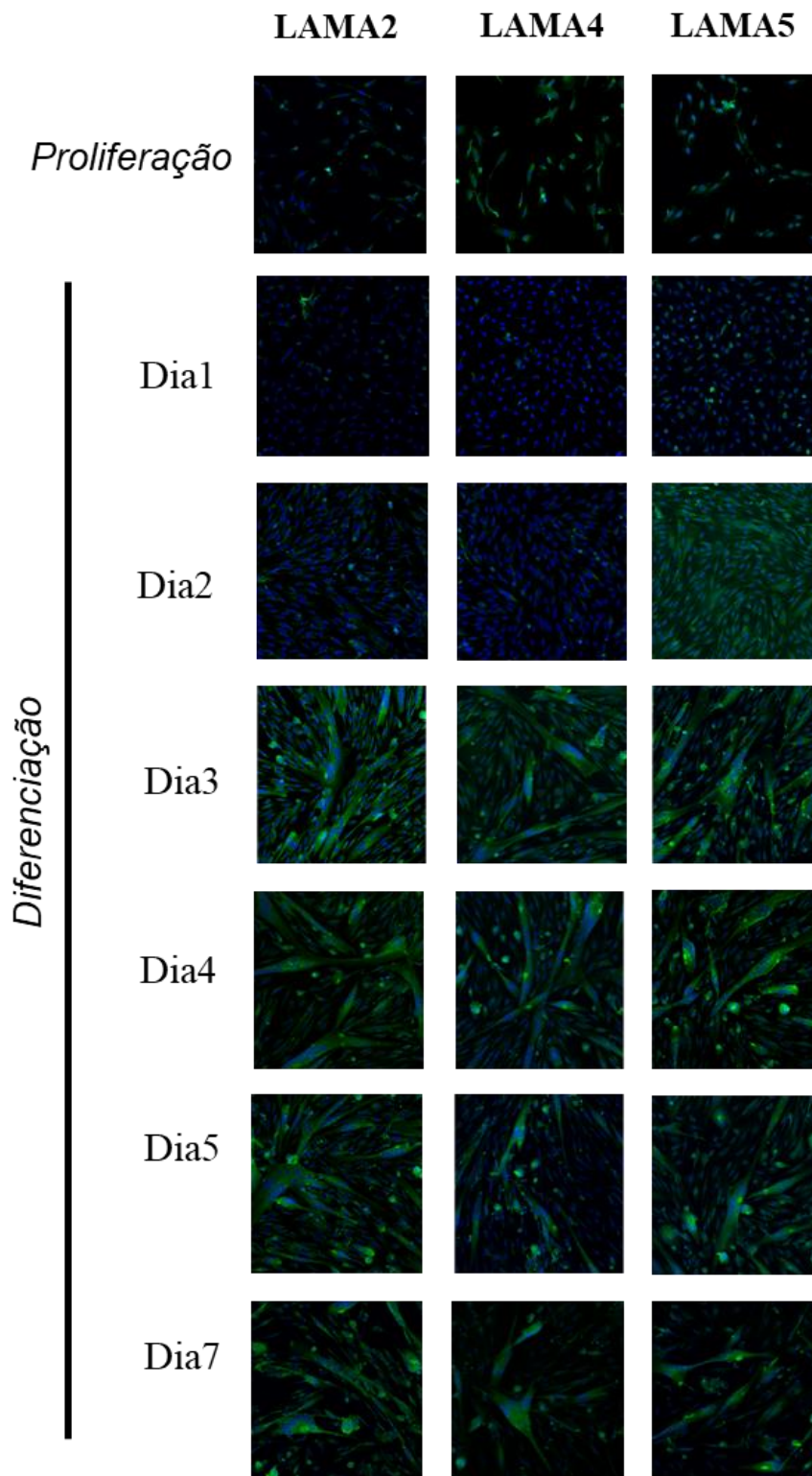


Fig. 4.4: Expressão de diferentes cadeias de LM em células da linhagem imortalizada C125. Em proliferação e nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 7 após indução da diferenciação, as culturas foram fixadas. Em verde podemos observar a imunomarcagem para as cadeias de LM $\alpha 2$, 4 e 5. Os anticorpos primários foram revelados com o uso do secundário GAM-AF488. Os núcleos podem ser observados em azul (DAPI). N=2. Aumento: 100x.

Como abordado anteriormente, no músculo maduro, as isoformas de LM encontradas são as 211 e 221. Entretanto, na embriogênese, outras isoformas, como a 111, também são

observadas (Miner *et al.* 2004). Como as células acima citadas foram obtidas a partir de biópsias de um doador jovem, com o músculo ainda em fase de crescimento (Edom *et al.* 1994), é possível que durante essa fase, com o músculo ainda em fase de maturação, outras LMs poderiam estar sendo expressas pelas CHQs e CL25. Nesse sentido, decidimos analisar a linhagem de mioblastos humanos LHCN-M2 obtida a partir de uma biópsia de um doador adulto (Zhu *et al.* 2007). Assim como a CL25, essa linhagem é 100% miogênica e se funde formando miotubos.

Observamos, de maneira semelhante às outras linhagens testadas, a expressão das cadeias de LM $\alpha 4$ e $\alpha 5$ (além da cadeia $\alpha 2$) durante a cinética de diferenciação. Interessante notar que assim como a CL25, essa linhagem parece expressar de forma discreta as cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ na proliferação (Figura 4.5).

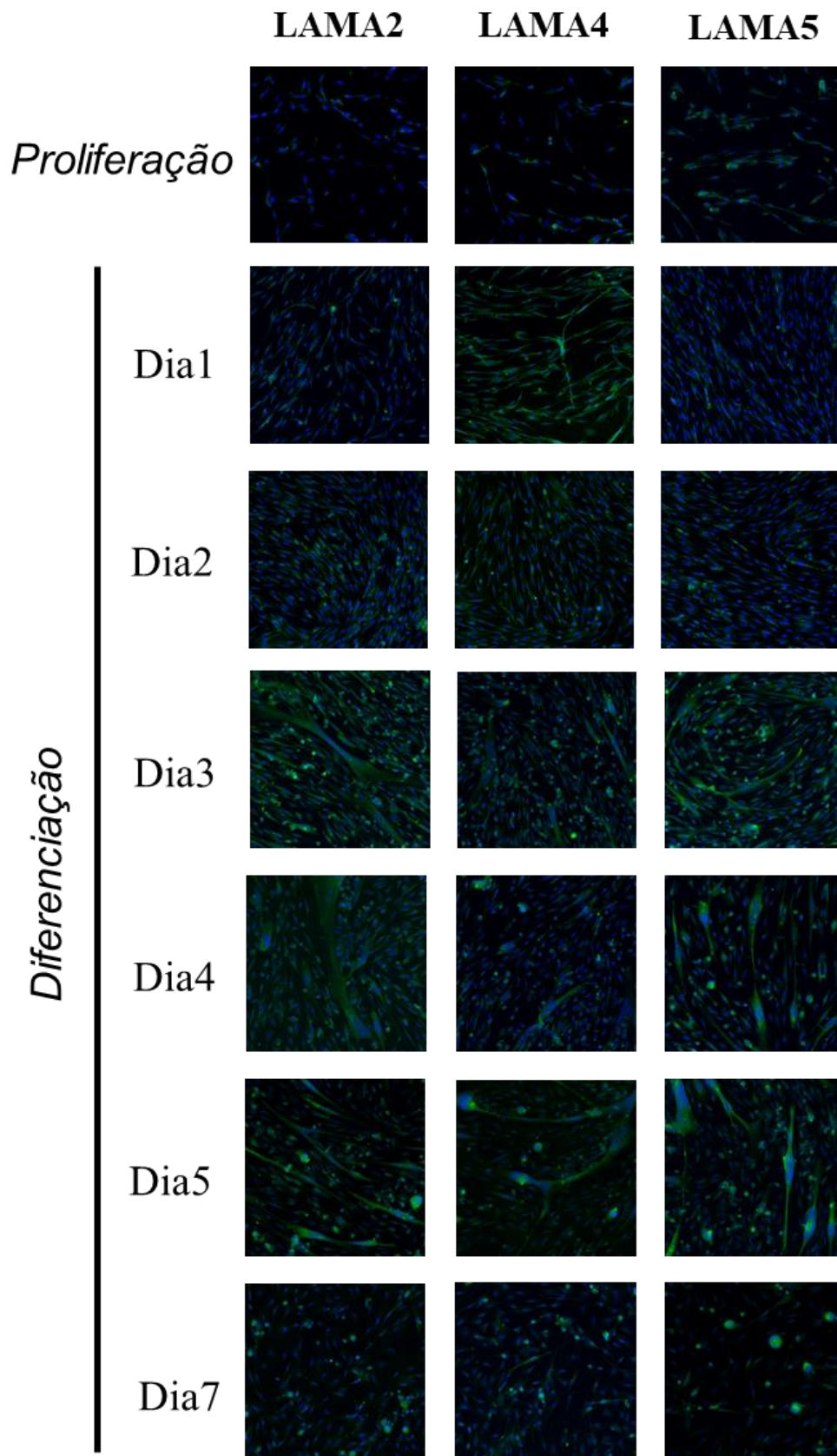


Fig.4.5: Expressão de diferentes cadeias de LM em célula muscular imortalizada LHCN-M2. Em proliferação e nos dias 1, 2, 3, 4, 5 e 7 após indução da diferenciação, as culturas foram fixadas. Em verde podemos observar a imunomarcagem para as cadeias de LM α 2, 4 e 5. Os anticorpos primários foram revelados com o uso do secundário GAM-AF488. Os núcleos podem ser observados em azul (DAPI). N=1. Aumento: 100x.

4.c Identificação das cadeias de lamininas por RT-PCR

Para confirmar os achados da expressão de cadeias de LM por imunofluorescência nas células CL25, a expressão gênica de cadeias de LM e das integrinas $\alpha 6$ (VLA6) e $\alpha 7$ (VLA7) foi quantificada através da técnica de RT-PCR. As amostras foram recolhidas em 5 diferentes perfis: proliferação, diferenciação 1, 3, 5 e 7 dias. O resultado preliminar da quantificação do RNAm dessas amostras pode ser observado na Figura 4.6. Observamos que não só as cadeias $\alpha 1$, 2, 4 e 5 estão presentes e moduladas na proliferação e cinética de diferenciação, mas também outras cadeias como a $\alpha 3$ e as cadeias β e γ , o que indica que diferentes isoformas (trímeros) estejam sendo produzidos. Interessante notar que a expressão das cadeias de LM $\alpha 1$, 4 e 5 aumentaram de forma importante durante a cinética de diferenciação, corroborando os achados da imunofluorescência.

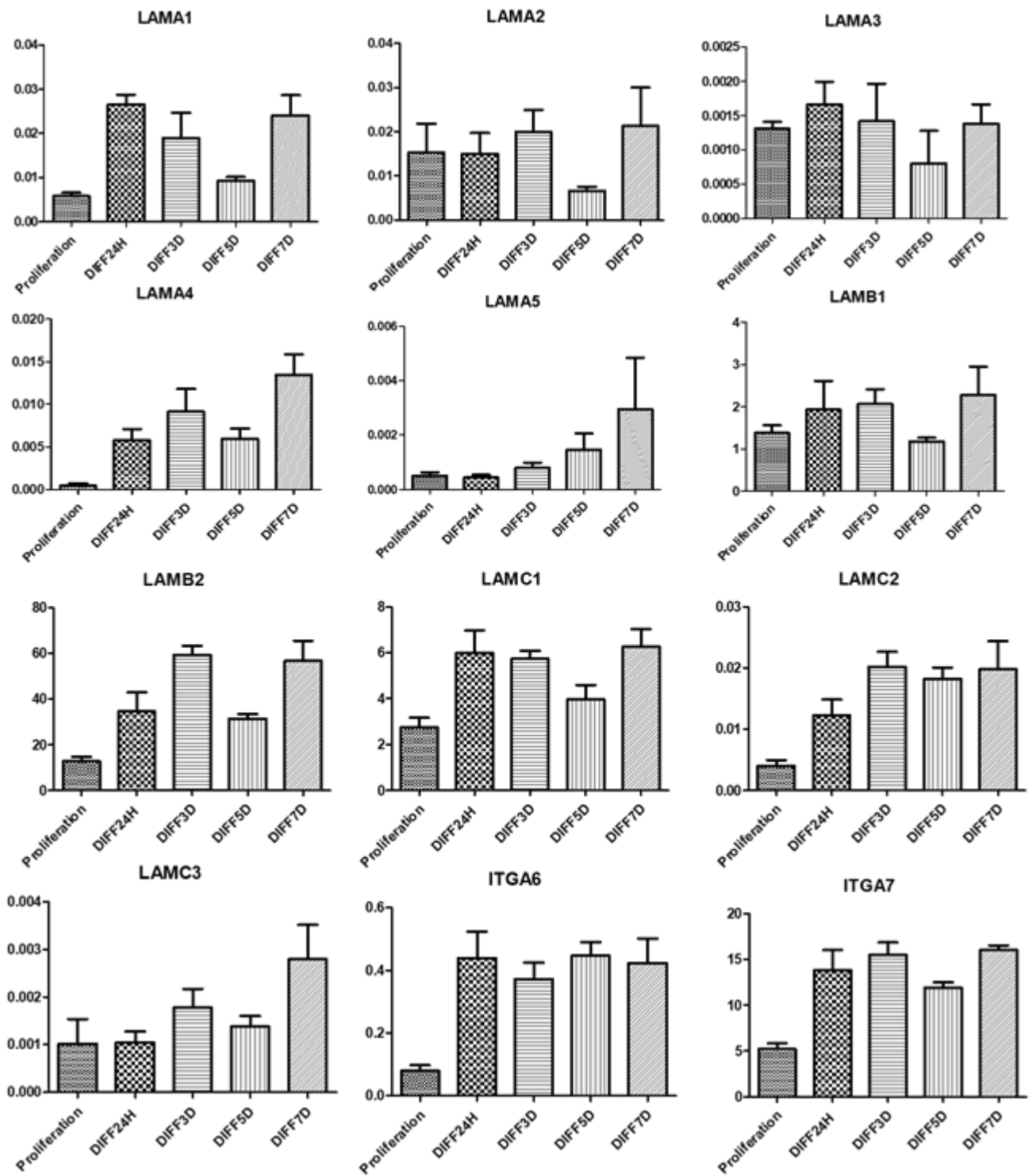


Fig. 4.6: Expressão de lamininas e receptores via RT-PCR em C125. Foram analisadas cadeias de lamininas (LAMA = α , LAMB = β e LAMC = γ) e integrinas $\alpha 6$ e $\alpha 7$ em C125. RT-PCR realizado em células nas seguintes condições: proliferação e diferenciação 24h, 3, 5 e 7 dias. Dados obtidos de uma mesma cultura plaqueada em triplicata em um experimento e representados como média \pm DP.

4.d Ensaios funcionais de proliferação na presença de diferentes isoformas de LM

Uma vez demonstrado que mioblastos humanos expressam diferentes cadeias de LM na proliferação e diferenciação, decidimos realizar ensaios funcionais para avaliar se esses fenômenos biológicos poderiam ser modulados na presença das isoformas de LM recombinantes humanas. Primeiramente, avaliamos a proliferação das células CHQ. Para tal, plaqueamos as células sobre as isoformas de LM e, após 2 dias de cultura, o número de células foi contado. Nossos dados mostram que isoformas de LM não parecem estimular a proliferação após dois dias de cultura (Figura 4.7). De forma preliminar, observamos que parece haver uma leve tendência de aumento do número de células nos poços com LM-211 pois, quando comparamos à contagem obtida com *coating* de BSA, as contagens aparentam estar por volta de 10 células/campo acima do controle. Devido ao grande desvio padrão, a mesma especulação não pode ser feita com a contagem no poço com LM 111.

Por outro lado, ocorre uma diminuição evidente na contagem das células plaqueadas em LMs 421 e 511. Comparando com o controle BSA, parece haver uma diminuição de aproximadamente 10 células/poço na contagem com essas isoformas.

Outros dados do nosso grupo (artigo em preparação) mostram que as isoformas 111, 211 e 511 não estimulam a proliferação de mioblastos humanos em *dois dias* de cultura quando comparadas com o controle BSA. É importante que mais experimentos sejam realizados para verificar o efeito das outras isoformas.

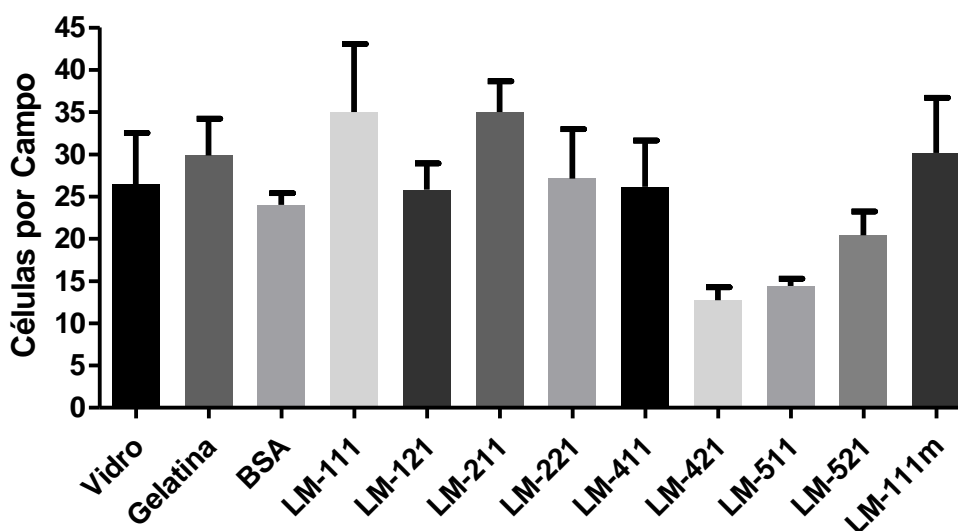


Fig. 4.7. Proliferação de mioblastos CHQ cultivados sobre as isoformas de LM. Células CHQ foram cultivadas sobre placas de cultura cobertas por isoformas de LM recombinantes humanas durante dois dias. Os núcleos corados com DAPI foram contados. Foram fotografados e quantificados 5 campos aleatórios em um experimento. Dados representados como média \pm DP.

Para nos certificarmos que a alteração na contagem das células CHQ tem como causa a influência das LM na proliferação, utilizamos o marcador KI67, que está presente nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, mas ausente da fase G0 (Scholsen 2000). Em mioblastos, essa análise é importante pois a saída do ciclo celular (G0), pode significar a volta à quiescência (ou seja, refazer o *pool* de células progenitoras) ou entrada no processo de diferenciação e, neste caso, saída definitiva do ciclo celular. Para isso, marcamos as culturas CHQ com anti-KI-67 e antidesmina (imagem representativa Figura 4.8), e a taxa proliferativa dos mioblastos foi obtida através da contagem das células desmina⁺ki-67⁺ (Figura 4.9). Observamos que, após 2 dias em cultura, as LMs 111, 221, 411, 511 e 521 parecem aumentar o número de mioblastos humanos na fase proliferativa do ciclo celular. Apesar desse experimento específico ter sido realizado uma vez, dados do nosso grupo, corroborados pelos dados dessa figura (artigo em preparação), mostram o aumento significativo de mioblastos humanos CHQ Ki-67⁺ quando cultivados sobre as isoformas de LM-111 e 511, mas não da isoforma 211. Esse efeito é mais evidente após 4 dias em cultura. Esses dados corroboram a literatura, que mostra a capacidade da LM-111 em estimular a proliferação de diferentes tipos celulares, incluindo mioblastos (Silva-Barbosa *et al.* 2008; Riederer *et al.* 2015). Além disso, esses dados mostram que outras isoformas, além da 111, também estimulam a proliferação dos progenitores musculares humanos, como a LM-511 e 521 (Figura 4.9).

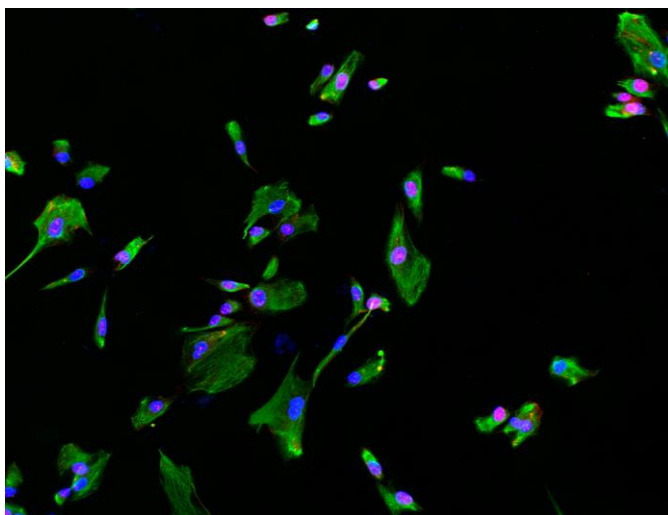


Fig. 4.8. Identificação de mioblastos humanos em fase proliferativa após dois dias de cultivo sobre isoformas de LM recombinante humana. Na imagem representativa, observamos células CHQ em proliferação plaqueadas em LM-411. Em azul, marcação nuclear com DAPI; em verde, desmina (proteína do filamento intermediário presente somente em células musculares); em vermelho, marcação nuclear com Ki67 nos mioblastos cultivados em meio de proliferação. Aumento de 100x.

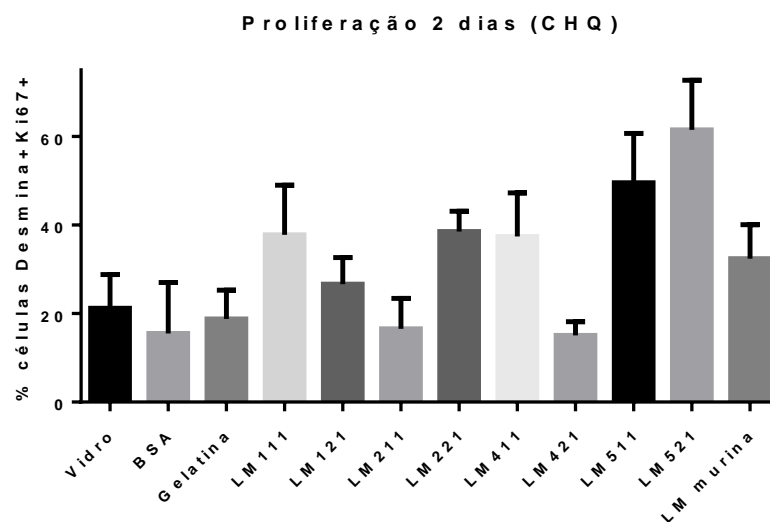


Fig. 4.9: Quantificação de mioblastos CHQ Ki-67⁺ após dois de cultivo sobre isoformas de LM. Células CHQ foram plaqueadas em diferentes condições em meio de proliferação e, após 2 dias de cultivo, fixadas e marcadas para desmina e Ki-67. Foram fotografados e quantificados 5 campos aleatórios em um experimento. Dados representados como média ± DP.

Para nos certificarmos que qualquer efeito observado seria devido aos mioblastos – e não uma consequência da presença dos fibroblastos – realizamos ensaios funcionais com o mioblasto humano imortalizado C125.

De modo semelhante à CHQ, realizamos *coating* de diferentes isoformas e quantificamos o total de células por campo em 2 e 5 dias de proliferação (Figura 4.10). Em 2 dias de proliferação, a contagem de células existentes no campo tende a ser maior quando em *coating* de LM-121, comparando ao BSA. Enquanto as isoformas 411 e 421 não parecem exercer influência nesse estágio. Entretanto, são dados preliminares e o desvio padrão das contagens não favorece leituras mais conclusivas.

Ainda na figura 4.10, observamos a contagem de núcleos após 5 dias de proliferação. Todas as isoformas possuem contagens equivalentes, entre 200 e 300 núcleos por campo, com exceção dos poços contendo as isoformas: 211, 411 e 421. Nesses casos, a contagem se manteve entre 100 em 200 núcleos por campo. Aparentemente, em relação à quantidade de célula quantificada por campo no modelo de C125, as isoformas de LM de cadeia $\alpha 4$ parecem não contribuir para o aumento da contagem.

De modo semelhante ao estudo da proliferação com CHQ, realizamos com a C125 ensaios para nos certificarmos que o fenômeno de aumento ou diminuição da quantidade de célula em determinado poço foi devido à proliferação, e não outro evento biológico, como a apoptose, por exemplo.

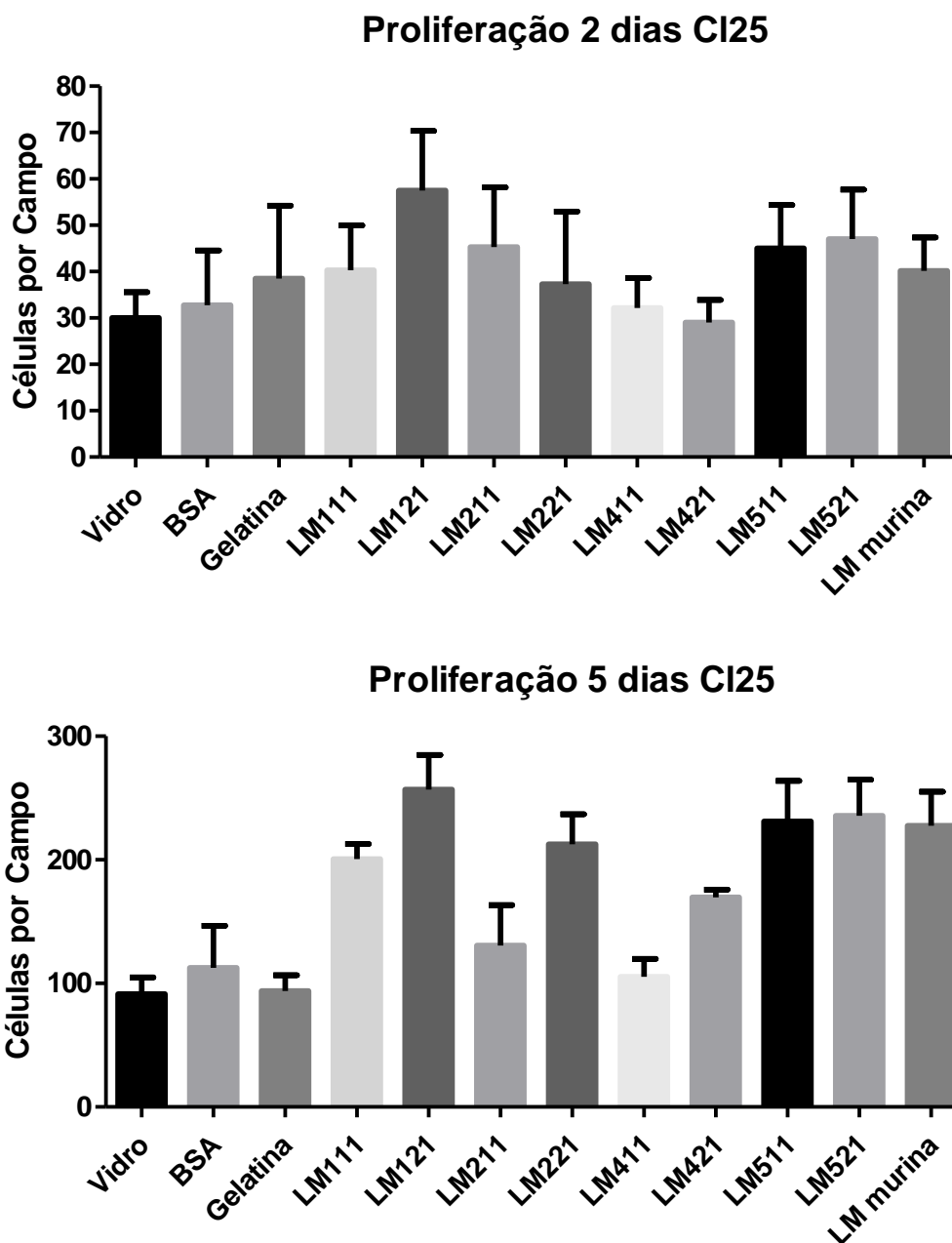


Fig. 4.10: Proliferação de mioblastos CI25 cultivados sobre as isoformas de LM. Células CI25 foram cultivadas sobre placas de cultura cobertas por isoformas de LM recombinantes humanas durante dois e 5 dias. Os núcleos corados com DAPI foram contados. Foram fotografados e quantificados 5 campos aleatórios em um experimento. Dados representados como média \pm DP.

Para analisarmos a proliferação em CI25 de outra forma, utilizamos EdU (*5-ethynyl-2'-deoxyuridine*), que se liga ao DNA sintetizado (Salic e Mitchison 2008) e observamos os pontos de 2 e 5 dias de proliferação.

A figura 4.11 mostra mioblastos CL25 EdU⁺ cultivados sobre BSA e LM-111, como exemplo, após 2 e 5 dias de cultivo. Essas imagens mostram o aumento do número de células não só entre os dias 2 e 5, mas também quando há o coating de LM.

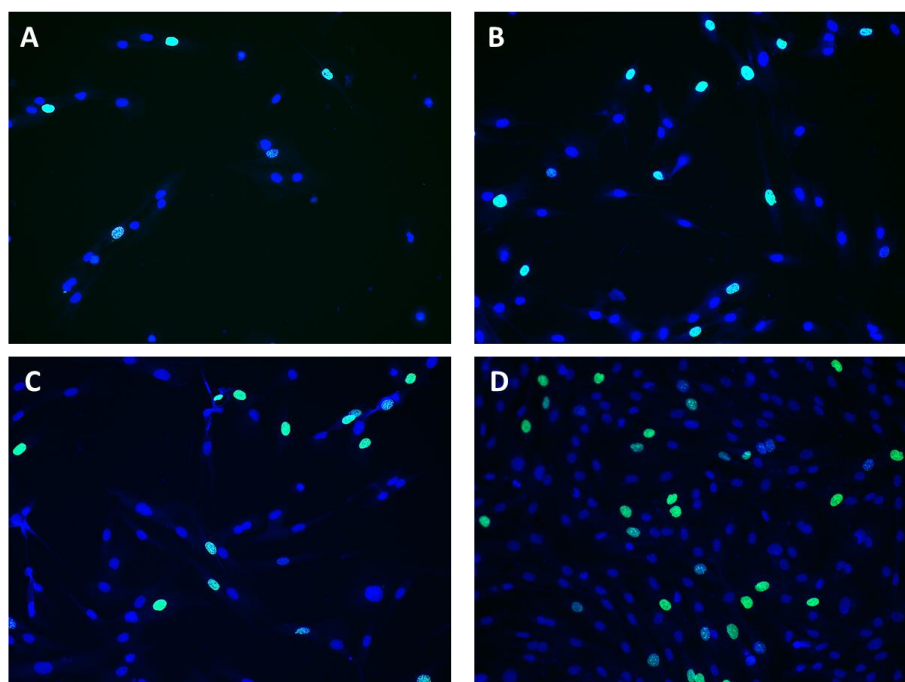


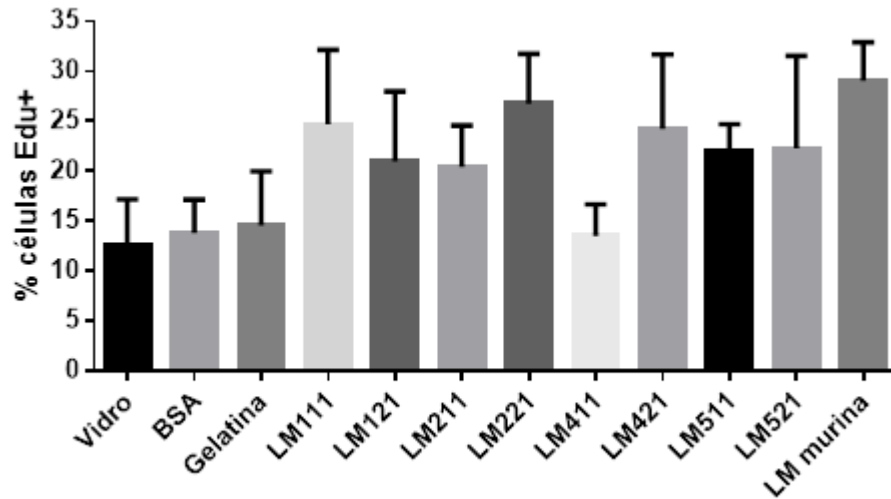
Fig. 4.11: Células C125 na fase de síntese do ciclo celular, cultivadas sobre isoformas de LM. A) e B) mostram células CL25 após 2 dias de proliferação, e as imagens C), e D) mostram células CL25 após 5 dias em proliferação. Os painéis à esquerda são células plaqueadas sobre BSA. Painéis à direita, células plaqueadas sobre LM-111. Em azul, marcação nuclear com DAPI; em verde, EdU. N=1. 200x

Ao quantificarmos as células EdU^+ após dois dias em cultura, observamos uma tendência de aumento de células em síntese quando plaqueadas sobre a maioria das LMs, quando comparamos com o BSA, especialmente: 111, 121, 211, 221 e a LM murina. Todas essas isoformas aumentaram, em relação ao BSA, cerca de 5 a 10% a quantidade de células marcadas com EdU. Cabe ressaltar que, de modo semelhante ao resultado encontrado na contagem total dos núcleos, a LM-411 também não contribuiu para a célula entrar em fase de síntese, o que corroboraria a falta de aptidão desta isoforma para as questões de proliferação (Figura 4.12).

Quando analisamos EdU após 5 dias em cultura, não observamos diferenças entre a maioria das LMs, exceto pela isoforma 211. Pelo gráfico (Figura 4.12), podemos observar que, entre esta isoforma e o restante das LMs e controles, existe uma diferença de, pelo menos, 5% a mais de células EdU^+ . Além disso, o percentual de EdU observado após 5 dias em cultura foi menor que o observado no após 2 dias. Esse resultado não é surpreendente visto que a maioria das culturas após 5 dias estavam com uma confluência alta (Figura 4.11).

A fim de aprimorarmos esse modelo, percebemos, em razão dos resultados aqui descritos, a necessidade de iniciarmos a cultura com um número menor de células. Essa medida possivelmente acarretaria em uma melhor observação do efeito das isoformas da LM no fenômeno de proliferação após 5 dias.

Proliferação 2 dias (CI25)



Proliferação 5 dias (CI25)

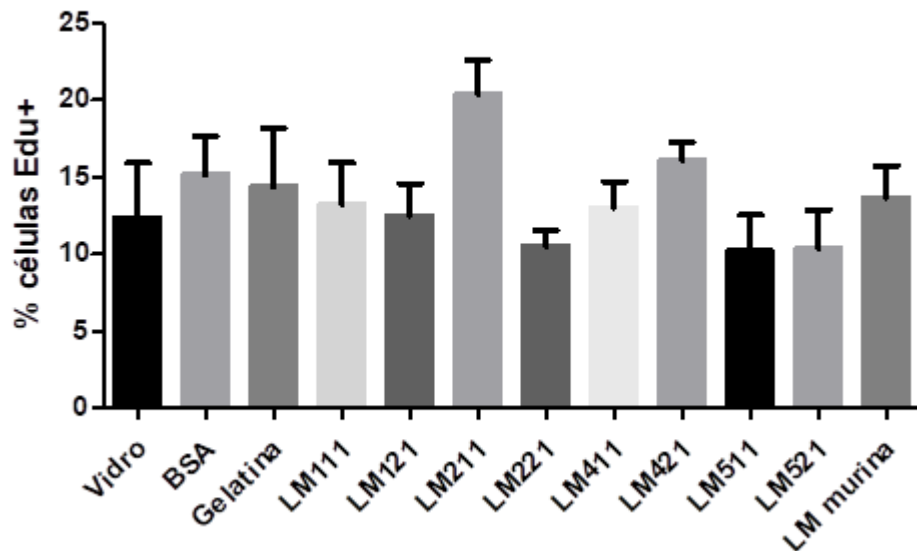


Fig. 4.12: Quantificação de mioblastos CI25 Edu⁺ após 2 e 5 dias de proliferação sobre isoformas de LM. Células CI25 foram plaqueadas em diferentes condições em meio de proliferação e, após 2 ou 5 dias de cultivo, tratadas com EdU (2h de tratamento para 2 dias e 5h para 5 dias), fixadas e marcadas utilizando Kit “Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit”. Células foram fotografadas e quantificadas em 5 campos aleatórios em um experimento. Dados representados como média \pm DP.

4.e Ensaio de diferenciação com *coating* de lamininas

Para análise da diferenciação, também realizamos ensaios com CHQ e CI25, ambas marcadas com cadeia pesada da miosina (MyHC). Ao quantificarmos núcleos de células com marcação positiva para MyHC e os núcleos totais (marcação com DAPI), temos o percentual denominado índice de diferenciação.

Células CHQ foram fixadas e marcadas após 3, 5 e 7 dias de diferenciação (imagem representativa na Figura 4.13).

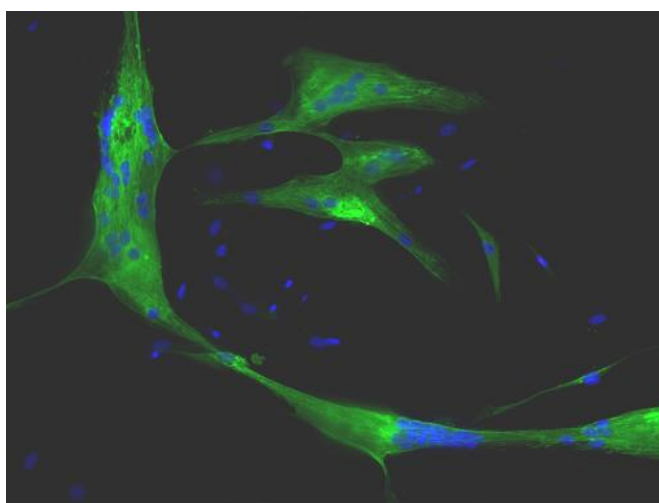


Fig. 4.13: Células CHQ em 7 dias de diferenciação plaqueadas em LM 221. Imagem representativa da marcação de uma miofibrila com diversos mionúcleos. Em azul, marcação nuclear com DAPI; em verde, cadeia pesada de miosina (MyHC). Aumento de 100x.

Na Figura 4.14, observamos a eficácia da diferenciação em CHQ para 3, 5 e 7 dias. No ponto de 3 dias de diferenciação, comparando com o controle BSA, percebemos a eficácia das cadeias $\alpha 5$ (isoformas 511 e 521). Apesar do desvio padrão, essas duas isoformas parecem ter contribuído para um aumento aproximado de 10 a 20% do índice de diferenciação. Já em 5 dias, todas as isoformas parecem ter propiciado diferenciação melhor do que os controles, ressaltando-se a LM murina, que parece sobressair nesse ponto da cinética. Após 7 dias de diferenciação, o índice de diferenciação geral não está maior do que os anteriores, mas destacam-se, em relação ao BSA, as isoformas LM-121 e LM-111 murina.

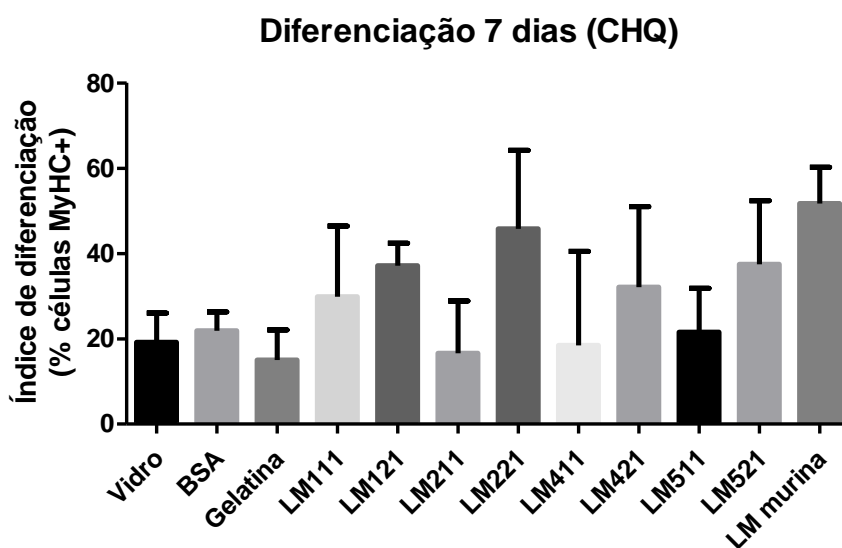
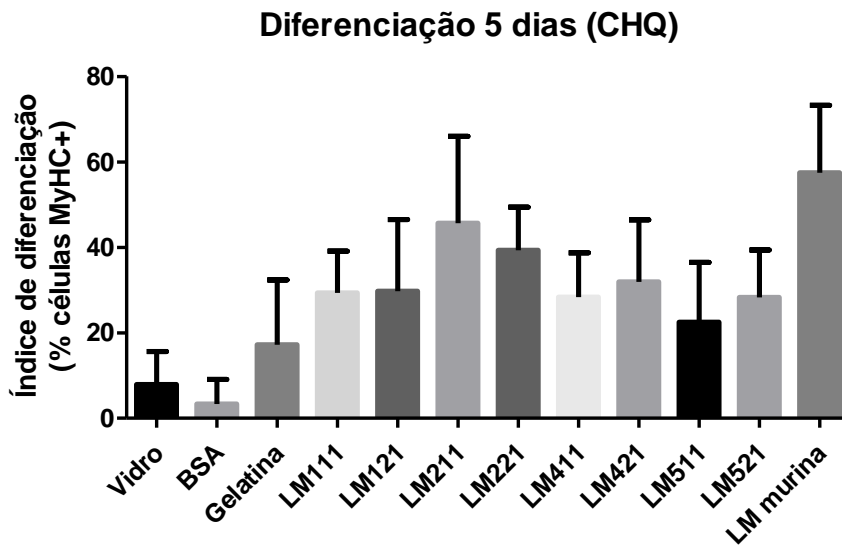
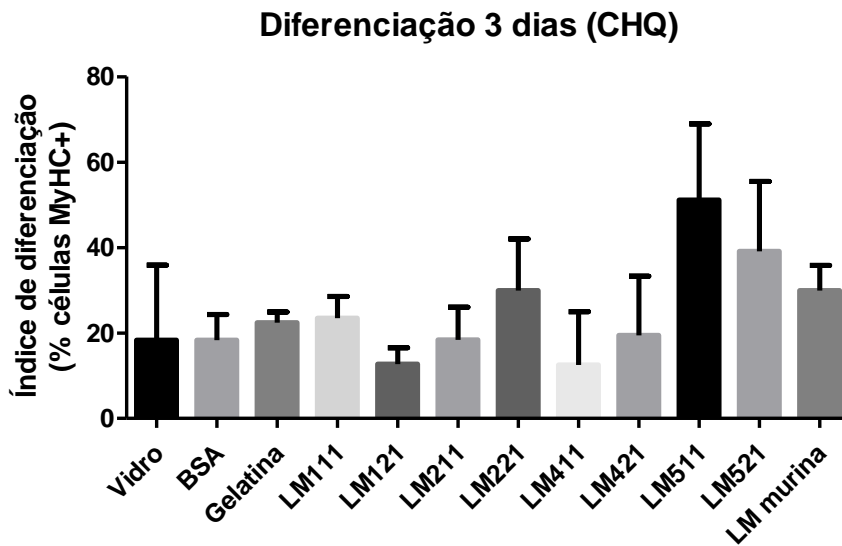


Fig. 4.14: Índice de diferenciação de CHQ. Quantificação do percentual de células MyHC+ (cadeia pesada da miosina positivas) em diferentes condições de cultivo por cinética de diferenciação definida: 3, 5 e 7 dias. Células foram fotografadas e quantificadas em 5 campos aleatórios em um experimento. Dados representados como média \pm DP.

Ainda com o objetivo de avaliar a capacidade das isoformas de LM em modular a diferenciação, analisamos também a capacidade de fusão dos miotubos após 7 dias de diferenciação. Foi quantificado o número de núcleos em cada fibra diferenciada e separados por grupos, indicando de 1, 2, 3 ou ≥ 4 núcleos por fibra. Foi realizada a média de núcleos desses grupos por cada condição de *coating*, gerando os dados apresentados na Figura 4.15. Quanto maior a quantidade de núcleos por fibra após 7 dias de diferenciação, maior a capacidade de fusão desses miotubos. Observamos uma destacada prevalência de miotubos com 4 ou mais núcleos nas condições de *coating* de LM-511 e LM-111 murina, além da LM-221 apresentar um perfil bastante variado quanto ao número de núcleos em seus miotubos. Esse resultado mostra que, nas condições utilizadas nesses experimentos, a diferenciação é bastante limitada, sendo a maioria dos miotubos mononucleares, sem ocorrer a fusão.

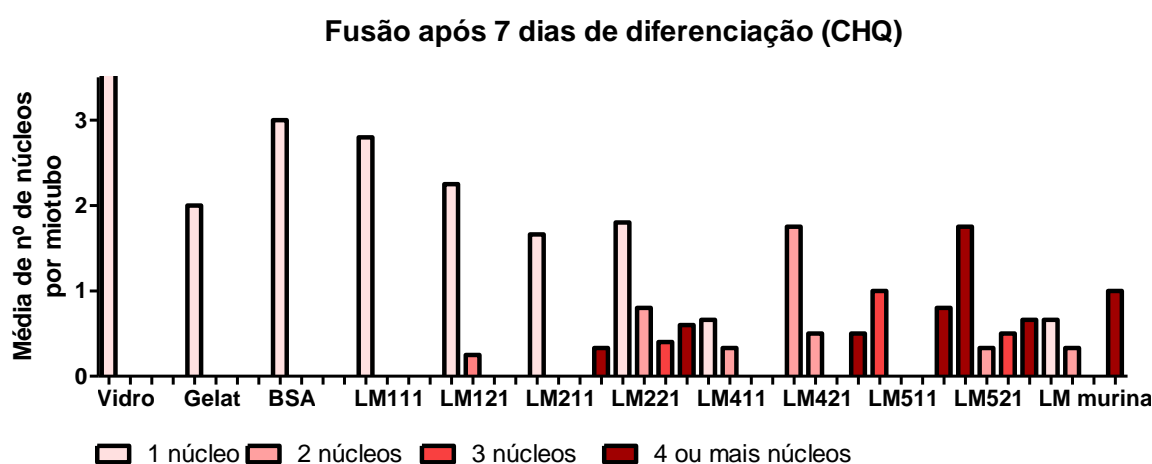


Fig. 4.15: Análise da capacidade de fusão de miotubos após 7 dias de diferenciação de células CHQ em diferentes condições de *coating*. Neste experimento preliminar, cada miotubo/miofibra teve seus núcleos quantificados e agrupados pela média em categorias de 1, 2, 3, 4 ou mais núcleos.

Analisamos igualmente a diferenciação utilizando células C125 nos tempos de 2 e 5 dias (imagem representativa na Figura 4.16). O índice de diferenciação foi obtido pelo percentual de células MyHC+ (positivas para cadeia pesada da miosina) em relação ao número total de células (Figura 4.17).

Em 2 dias de diferenciação de C125, apesar do caráter preliminar e elevado desvio padrão para algumas quantificações, destaca-se o baixo índice de diferenciação das células plaqueadas sobre a LM-411. Ao analisarmos as células em diferenciação por 5 dias, observamos índices de diferenciação ainda menores que os encontrados em 2 dias, indicativo de intercorrências durante o processamento da amostra.

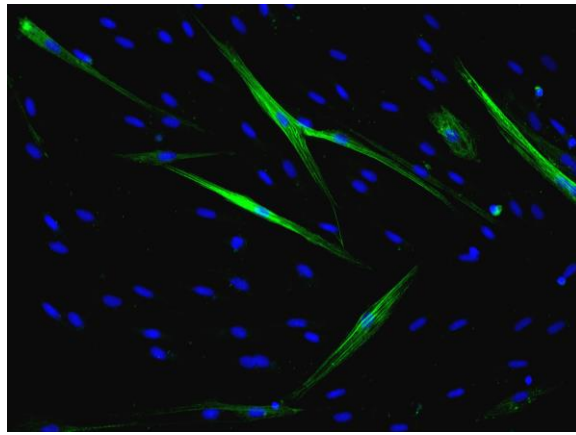


Fig. 4.16: Células C125 em 2 dias de diferenciação plaqueadas em LM-121. Foto representativa: em azul, marcação nuclear com DAPI; em verde, cadeia pesada de miosina (MyHC). Aumento de 100x.

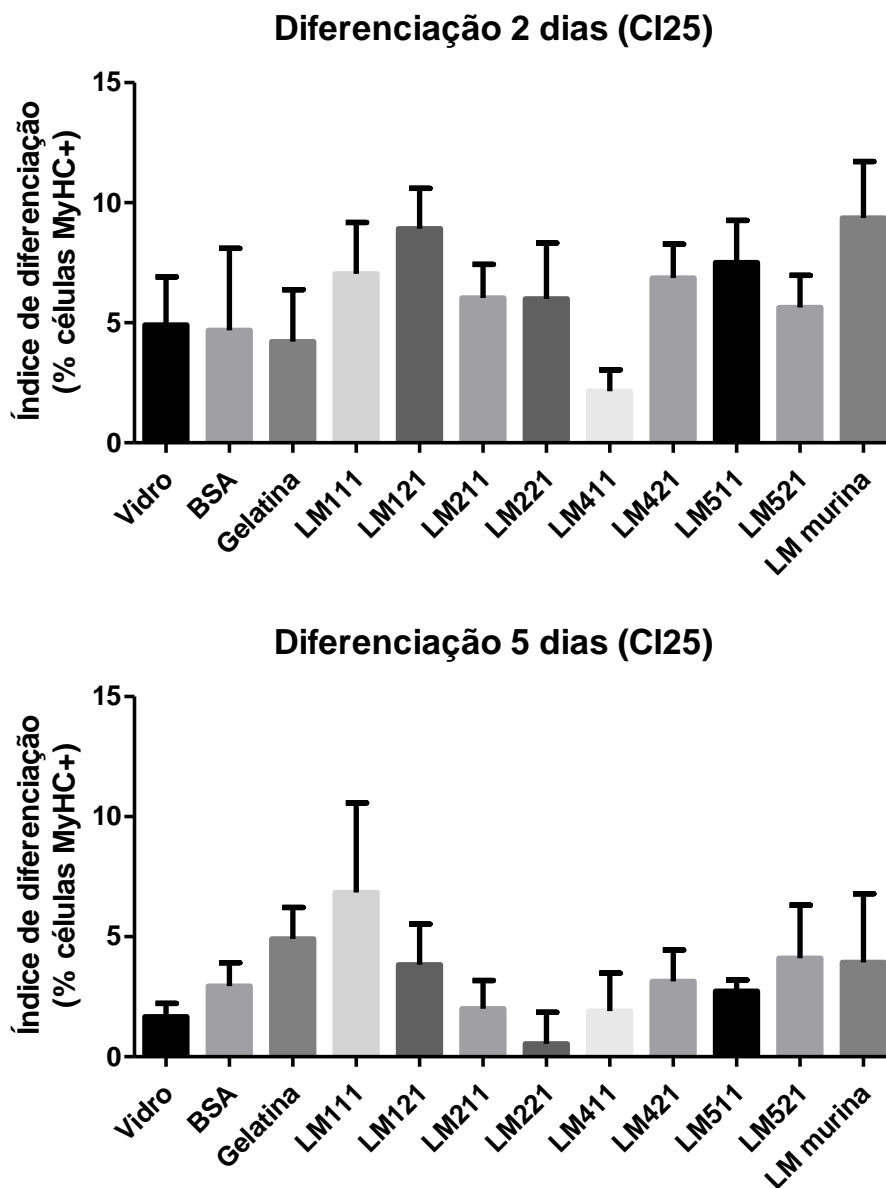


Fig. 4.17: Índice de diferenciação de C125. Quantificação do percentual de células MyHC+ (cadeia pesada da miosina positivas) em diferentes condições de cultivo por cinética de diferenciação definida: 2 e 5 dias. Células foram fotografadas e quantificadas em 5 campos aleatórios em um experimento. Dados representados como média \pm DP.

4.f Bloqueio da cadeia de laminina $\alpha 5$

Como a cadeia $\alpha 5$ é particularmente detectada nos mioblastos fusionados (miotubos), e que as isoformas recombinantes 511 e talvez a 521 aumentem a fusão dessas células, resolvemos investigar se o tratamento com anticorpo monoclonal anticadeia $\alpha 5$ de LM poderia modular a diferenciação em mioblastos humanos CHQ.

Nossos resultados preliminares indicam uma tendência de diminuição da diferenciação em todos os modelos de tratamento, especialmente quando ele é realizado no terceiro dia de diferenciação (3D-2D+). Em contrapartida, adicionar o anticorpo logo no início da diferenciação (5D+ ou 2D+3D-), apesar de diminuir o percentual de células que se diferenciam ao compararmos com os controles, não parece ser tão prejudicial (Figura 4.18).

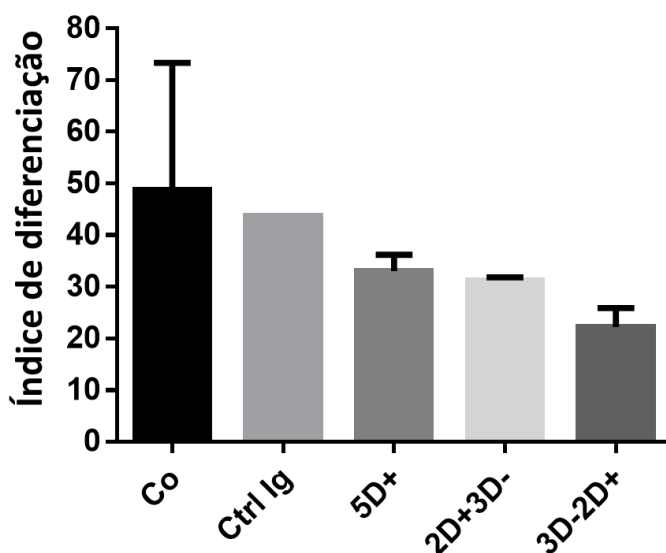


Fig. 4.18: Percentual de células marcadas com cadeia pesada da miosina (MyHC) após tratamento com anticorpos monoclonais anticadeia $\alpha 5$ de LM (clone 4c7) em diferentes momentos da diferenciação. Informações do eixo “x”: Controle (Co) = sem tratamento, apenas adição de meio. Ctrl Ig= tratamento com Ig controle. Condição “5D”= tratamento com anticorpos mantidos em todos os dias de diferenciação. Condição (2D+3D-)= anticorpos mantidos em cultura somente nos dois primeiros dias de diferenciação. Condição (3D-2D+)= anticorpos mantidos nas culturas durante os dois últimos dias de diferenciação. Células foram fotografadas e quantificadas em 5 campos aleatórios em um experimento. Dados representados como média \pm DP.

5. DISCUSSÃO

A condição ideal para uma estratégia de terapia celular para o tratamento de doenças musculares é que as células transplantadas sobrevivam, proliferem em grande número, migrem no sítio de injeção e, após estes processos, diferenciem no sentido de regenerar o músculo danificado. Mas esses mesmos fenômenos também devem ocorrer de forma eficiente durante o processo fisiológico de regeneração muscular. Durante o envelhecimento e depois de lacerações mais graves, o músculo enfrenta maiores dificuldades de cura. Como já descrito na literatura, a LM está envolvida em todos esses fenômenos biológicos (proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação) em diferentes tipos celulares (De Souza *et al.* 1991; Belkin e Stepp 2000; Savino *et al.* 2004; Cotta-de-Almeida *et al.* 2003). Entretanto, são escassos os dados mostrando o papel das diferentes isoformas de LM sobre os mioblastos *in vitro* e no processo de regeneração muscular *in vivo*.

Este trabalho foi pensado e desenvolvido com o genuíno intento de colaborar com a alavancagem de conhecimento nessa área e, futuramente, por consequência, contribuir para a sobrevivência de pacientes por enquanto restritos a poucas opções terapêuticas.

Em 2008, Silva-Barbosa e colaboradores demonstraram que mioblastos humanos transplantados em músculos de camundongos imunodeficientes estavam localizados em áreas ricas em LM e que, além disso, uma maior deposição de LM estava correlacionada com uma maior capacidade regenerativa desses progenitores musculares (Silva-Barbosa *et al.* 2008). Esse trabalho, desenvolvido pelo nosso grupo (com a participação dos nossos colaboradores franceses), inspirou o grupo liderado pelo Dr. Tremblay, responsável pela maioria dos ensaios clínicos de terapia celular com mioblastos para o tratamento de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) até agora realizados (Skuk, Tremblay 2017), a usar a LM-111 como adjuvante no transplante de mioblastos humanos em modelo animal. Interessante ressaltar que Silva-Barbosa e colaboradores mostraram que, além dos dados acima descritos, o tratamento com a LM-111 aumentou a proliferação, migração e sobrevivências dos mioblastos humanos *in vitro*, quando comparado com o controle (BSA), mas também quando comparado à LM-211 (Silva-Barbosa *et al.* 2008). A LM-111 utilizada é isolada a partir do carcinoma murino EHS, e é a LM mais utilizada comercialmente na literatura. Porém, essa isoforma não é encontrada no músculo, ao contrário da LM-211 que, juntamente com a LM-221, são as únicas LMs presentes em torno das fibras musculares (Riederer, et al 2015). Dois trabalhos haviam demonstrado que as cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ estavam transitoriamente expressas em

miotubos durante o processo de regeneração muscular em modelo animal (Sorokin *et al.* 2000; Ringelmann *et al.* 1999). Nesse contexto, o grupo ficou interessado em verificar se as células humanas injetadas estavam produzindo LM, ou se a LM presente no sítio de injeção era somente de origem do tecido do camundongo. Os dados iniciais detectaram, com o uso de anticorpos anti-LM específicos humanos, a presença de LM humana, além da própria LM murina. Além disso, como esses anticorpos eram também específicos para diferentes cadeias α de LM, foram observadas outras cadeias de LM (além da cadeia $\alpha 2$) no processo de regeneração após o transplante de mioblastos humanos em músculos de camundongos imunodeficientes.

Neste trabalho, demonstramos a expressão das cadeias de LM $\alpha 1$ e $\alpha 5$, corroborando os achados anteriores do grupo. Além disso, demonstramos a expressão da cadeia $\alpha 4$. Essas marcações foram realizadas em músculos 21 dias após o transplante de mioblastos humanos, quando diversas fibras humanas já foram formadas. A espectrina (específica humana) foi utilizada para detectar as fibras humanas já diferenciadas. Essa proteína é um componente da porção intracelular do sarcolema (Berthier, Blaineau 1997). Observamos que praticamente todas as fibras espectrina-positivas (humanas) estavam envolvidas (co-localizadas) pelas cadeias de LM humanas $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$, além da $\alpha 2$ (dado previamente obtido pelo grupo). Isso indica que outras isoformas de LM, além das 211 e 221, estariam presentes em progenitores musculares humanos participantes do processo de regeneração muscular em camundongos imunodeficientes. Também observamos marcações de LM difusas entre as fibras em regeneração, provavelmente secretadas, e também em torno de estruturas menores, como células, possivelmente marcando as células humanas transplantadas não diferenciadas. Negroni e colaboradores mostraram que mioblastos humanos transplantados não só se diferenciam em fibras no músculo do receptor murino, mas também voltam ao estado quiescente, se localizando no nicho da célula satélite e expressando Pax7 (Negróni *et al.*, 2009). Dessa forma, é possível que mioblastos humanos em posição satélite também estejam envolvidos por essas isoformas de LM. Experimento com marcadores específicos humanos de células em estado de quiescência, por exemplo Pax7, poderiam nos informar se células humanas que retornaram ao estado progenitor também estejam expressando diferentes cadeias de LM. Nesse sentido, é importante destacar a forte marcação da cadeia $\alpha 4$ nas células mononucleares.

Essas marcações abriram precedentes para estudarmos a presença e o papel das LMs no processo de regeneração muscular, inicialmente, investigando a proliferação, diferenciação e fusão de mioblastos humanos *in vitro*. Os mioblastos CHQ são células

derivadas de cultura primária, devemos atentar ao fato da pureza miogênica não ser 100%. Existe um percentual natural de fibroblastos na cultura (no nosso caso, controlamos para que não excedesse 25%), que são conhecidos produtores de ECM (Kendall, Feghali-Bostwick 2014). No modelo de transplante de progenitores musculares acima descrito as células humanas utilizadas foram os mioblastos CHQ. Dessa forma, os fibroblastos poderiam estar produzindo as LMs, e estas poderiam se ligar aos mioblastos. De fato, todos os mioblastos nesse trabalho expressam diferentes integrinas capazes de se ligar a diferentes isoformas de LM. Gonzales e colaboradores demonstraram que as células CHQ, LHCN-M2 e CL25 expressam as cadeias de integrinas $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ e $\beta 1$, podendo formar os dímeros $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 7\beta 1$ (Gonzales *et al.* 2017). Além disso, resultados preliminares do nosso grupo indicam que esses mioblastos expressam o receptor (não-integrina) Lutheran, que reconhece mais especificamente as isoformas contendo a cadeia de LM $\alpha 5$, como as LMs 511 e 521 (Kikkara *et al.* 2011).

Portanto, apesar da CHQ ser um valioso modelo *in vitro* para estudo da interação LM-mioblasto, ficou claro que não poderia ser o único a ser utilizado. Além da questão da contaminação natural por fibroblastos, vale ressaltar como fatores limitantes: i) crescimento mais lento, comparado a células imortalizadas; ii) atinge o quadro denominado “senescência”, então não utilizamos depois que chegam a aproximadamente 40 divisões (a menos, é claro, que haja interesse no estudo de algum aspecto relacionado à senescência muscular, como é o caso de alguns estudos do grupo); e iii) resultados baseados num único modelo celular não têm a mesma confiabilidade, dificultando a publicação futura.

Realizar os testes com células imortalizadas e, portanto, miogenicamente puras, exclui qualquer possibilidade de os efeitos observados não serem protagonizados pelos mioblastos. Iniciamos, então, experimentos com 2 outras células musculares, ambas imortalizadas (C125 e LHCN-M2) também cedidas pelo grupo colaborador francês. Concentramos nossos estudos principalmente com a C125, para reforçar os resultados obtidos com a CHQ.

Inicialmente, buscamos **identificar a expressão de cadeias de LM** por imunofluorescência *in vitro* nos três tipos celulares (CHQ, C125 e LHCN-M2) em proliferação e diferentes estágios de diferenciação. Cabe aqui ressaltar que a análise de tempos mais longos de diferenciação em lamínula de vidro, notoriamente a partir do quinto dia, é dificultada pois a adesão de miotubos tende a diminuir, restando após a fixação apenas os menores miotubos e as células mononucleares não diferenciadas. Para contornar essa questão, realizamos *coating* de gelatina, método que auxiliou na adesão, mas não resolveu

completamente o problema, já que, no caso de CHQ, não foi possível fotografar com 10 dias de diferenciação por quase não haver fibras aderidas. De todo modo, até o sétimo dia de diferenciação, confirmamos a expressão tardia da cadeia $\alpha 2$ (mais evidente no dia 7), o início da expressão de $\alpha 4$ e $\alpha 5$ aconteceu no dia 3 e, durante a proliferação, somente $\alpha 1$ foi observada. No músculo estriado esquelético, isoformas de LM contendo as cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ também são encontradas, mas presentes na vasculatura e nas junções neuromusculares (Hallmann *et al.* 2005; Nishimune *et al.* 2017), enquanto as LMs contendo a cadeia $\alpha 2$ (211 e 221) são as únicas presentes na fibra madura. Recentemente foi demonstrado que outras cadeias de LM estão presentes no nicho de das células satélites durante a regeneração de musculo de camundongo. Além disso fibras musculares expressavam as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 5$ *in vitro* (Rayagiri *et al.* 2018). Nosso trabalho mostra, de forma semelhante, mas com células humanas, a expressão de cadeias distintas de LM, além da LM $\alpha 2$, na proliferação e diferenciação de mioblastos, tanto *in vitro*, quando *in vivo*, após o transplante dessas células em camundongos imunodeficientes.

Nossos resultados mostram que as 3 linhagens expressam as cadeias de LM $\alpha 1$, 2, 4 e 5, com o passar do tempo do processo de maturação do miotubo em cultura. É importante ressaltar que as linhagens imortalizadas (CL25 e LHCN-M2) apresentam uma taxa de proliferação mais elevada do que as células derivadas de cultura primária CHQ. De acordo com a plataforma de imortalização celular do nosso grupo colaborador francês (gerenciada por Anne Bigot e Kamel Mamchaoui), as células imortalizadas diferenciam-se mais rapidamente e, por conseguinte, soltam-se com ainda mais facilidade da placa após formação das fibras. Por este motivo, realizamos a fixação dessas células em pontos menos espaçados para checar se há correspondência com a CHQ quanto à expressão das cadeias. Uma proliferação mais rápida poderia acelerar a diferenciação, o que poderia explicar os resultados divergentes, por exemplo a LM $\alpha 2$ na CHQ, que aparece mais tardiamente, por volta do dia 5-7. Por outro lado, nas duas linhagens imortalizadas, a LM $\alpha 2$ aparece mais cedo, no terceiro dia pós indução da diferenciação.

Além da identificação por imunofluorescência, decidimos quantificar as expressões dos genes via RT-PCR das cadeias α e β , além de receptores integrina $\alpha 6$ e $\alpha 7$ nas células CL25. Analisados em conjunto com a imunofluorescência, a quantificação de RNAm em diferentes etapas da diferenciação nos mostrou, por exemplo, a quase completa ausência de LAMA4 na proliferação, sendo sua expressão mais proeminente no terceiro dia e no sétimo. Observando o gráfico referente à LAMA5, observamos maior expressão na diferenciação, especialmente na tardia, dado condizente com as imagens observadas com a

imunofluorescência. De um modo geral, a RT-PCR confirma que as células CL25 podem expressar diferentes isoformas de LM. Esse dado também corrobora a RT-PCR em CHQ realizada pelo nosso grupo, que apresenta uma modulação de cadeias de LM semelhante aos mioblastos CL25.

Por outro lado, a LAMA2 não foi modulada na diferenciação quando comparada com a fase de proliferação por PCR, o que contradiz os resultados de imunofluorescência, que demonstram uma expressão dessa molécula de forma mais tardia na diferenciação das CHQ (que é mais evidente somente a partir do dia 7). Além disso, nas CHQ transplantadas no músculo TA de camundongos imunodeficientes, essa cadeia foi observada somente 7 dias após injeção (dados ainda não publicados do nosso grupo). Esse resultado indica que essa cadeia possa estar sendo regulada/controlada em nível de RNA, por um RNA de interferência, por exemplo. Nosso grupo tem o interesse de avaliar se a cadeia $\alpha 2$ é regulada negativamente durante a proliferação e início da diferenciação nos mioblastos, assim como outras cadeias. O aparecimento sequencial de cadeias de LM durante a fase de diferenciação, com a cadeia $\alpha 2$ (cadeia da isoforma definitiva no músculo maduro) sendo expressa mais tardiamente, e de forma regulada, sugere uma hierarquia de aparecimento de isoformas durante a miogênese. E, ainda mais, sugere que possa haver um papel biológico fundamental na regeneração muscular.

A fim de investigarmos esse papel das LMs na regeneração muscular, decidimos realizar **ensaios funcionais de proliferação e diferenciação** de mioblastos humanos na presença de diferentes isoformas de LM humanas.

Considerando que a baixa proliferação celular configura uma das barreiras de uma eficaz terapia celular com precursores miogênicos, assim como a morte massiva, baixa migração e diferenciação precoce (Riederer *et al.* 2011; Negroni *et al.* 2011), iniciamos os estudos funcionais com as isoformas de LMs na proliferação de mioblastos. Para estudarmos a proliferação, existem várias técnicas disponíveis. Dentre elas, a marcação anti- Ki-67 é uma das mais conhecidas. Sua aplicação enquanto marcador de proliferação respalda-se no fato de não estar presente em células que estão fora do ciclo celular, na fase “G0” (Gerdes *et al.* 1984). Inegavelmente, apenas marcar toda e qualquer célula que não esteja na fase “G0” não garante muita especificidade a um método de proliferação celular. Dentre as alternativas mais avançadas, encontramos o EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), que se liga ao DNA durante a fase da síntese (Salic e Mitchison 2008), garantindo uma especificidade maior à marcação de células em proliferação.

Neste trabalho, utilizamos ki-67 e EdU, de acordo com a disponibilidade local no momento. Para CHQ, utilizamos marcação de Ki-67 e desmina para analisarmos somente os mioblastos em proliferação (e não a contaminação natural de fibroblastos). Comparando a quantificação de Ki-67+ com a de células por campo, é possível que, em dois dias, as LMs não tenham tido capacidade de induzir divisões celulares, o que parece acontecer quando avaliamos a proliferação, através da contagem do número núcleos por campo, após dois dias cultivados sobre as isoformas de LM. Porém, um maior número de células em ciclo, poderia ter um efeito mais tardio na replicação. Experimentos em pontos de cinética mais tardios poderiam confirmar essa hipótese.

Pelo fato de a CHQ não possuir a “pureza miogênica” de 100%, é razoável cogitarmos que o efeito das LMs poderia ser indireto, via fibroblastos. As LMs poderiam estimular essas células a produzirem fatores que estimulariam os mioblastos. É conhecido que fatores produzidos por fibroblastos estimulam a proliferação de mioblastos (Quinn *et al.* 1990), e a LM pode modificar a morfologia e motilidade dos fibroblastos (Lin e Bertics 1995). Dessa forma, decidimos avaliar a proliferação dos mioblastos CL25, imortalizados e 100% miogênicos, sobre as isoformas recombinantes de LM.

Quanto à análise da proliferação das células CL25, escolhemos como pontos de análise 2 e 5 dias. Isso se deve pela maior disponibilidade dessas células, além do interesse na análise da proliferação em tempos mais tardios. Utilizamos o método EdU e, no início da proliferação, destaca-se o decréscimo do percentual de células proliferando com coating de LM-411. Porém, a maioria das outras isoformas parece induzir aumento de células em síntese. Em períodos maiores de proliferação, observamos que as células plaqueadas com *coating* de

LM apresentam taxas de positividade para o EdU semelhantes aos controles. Esses dados podem estar relacionados à elevada confluência que essas células atingiram após 5 dias de cultivo, o que favoreceria a inibição por contato. Porém, a contagem do número absoluto de células por campo parece indicar fortemente um aumento da proliferação dos mioblastos, principalmente após 5 dias em cultura. Esses dados confirmam o papel estimulador da LM-111 na proliferação celular, mas indica que outras isoformas possuem esse potencial.

Quanto ao efeito na **diferenciação**, devemos salientar que as células não são plaqueadas com soro bovino fetal, sabidamente importante para a adesão celular, nem há etapa de crescimento em proliferação até atingir a confluência ideal para a posterior troca de meio, como é mais indicado para melhor diferenciação. Com isso, limitamos os fatores favoráveis à diferenciação unicamente à elevada confluência e *coating* utilizado.

Isto posto, ao observarmos os gráficos de **diferenciação de CHQ**, vemos que no estágio de diferenciação mais precoce (3 dias), a condição que mais favoreceu a diferenciação foi o *coating* com LM 511. Este resultado corrobora a importância da cadeia $\alpha 5$ para o início da diferenciação. Também utilizando a CHQ, decidimos realizar o bloqueio da cadeia $\alpha 5$ com anticorpo monoclonal (clone 4c7). Ao escolhermos 3 momentos diferentes de tratamento, tivemos por objetivo investigar se algum ponto da cinética seria mais importante para o efeito de isoformas contendo a LM $\alpha 5$ na diferenciação. Um dos esquemas de tratamento proposto consistiu em adicionar o anticorpo bloqueador no dia 3 de diferenciação, em tese, coincidindo com o período previsto para a expressão da $\alpha 5$ pelos mioblastos. Os outros 2 tratamentos com os anticorpos eram adicionar no dia 0 (um deles para manter por 5 dias; outro para manter pelos 2 primeiros dias). Entretanto, em nenhum dos casos o tratamento foi tão prejudicial quanto a adição no dia 3. Outras estratégias de bloqueios são cogitadas para melhor compreendermos os papéis das cadeias de LM na diferenciação, como, por exemplo, RNA de interferência.

Quanto à **diferenciação de CI25**, foram definidos pontos de 2 e 5 dias para análise. Entretanto, ao observarmos o índice de diferenciação desses dois pontos, claramente percebemos a baixa diferenciação no ponto de 5 dias. Como essas células diferenciam-se mais rapidamente que a CHQ e, tendo em mente que, quanto maior o miotubo, mais facilmente se descolará da lamínula, nossa hipótese é que o resultado de 5 dias não seja condizente com a realidade pelo fato dos miotubos terem se descolado durante a fixação ou na troca de meio.

Neste trabalho, observamos uma modulação de expressão de cadeias de LM principalmente durante a cinética de diferenciação. Mostramos que diferentes isoformas de

LM parecem modular a proliferação de mioblastos humanos, possivelmente interferindo no ciclo celular. Além disso, observamos que a LM-511 aumenta a diferenciação de mioblastos humanos, e que outras isoformas também parecem modular esse processo.

No processo fisiológico, poderíamos imaginar que as LMs poderiam estimular a sobrevivência das células, como já observado para a LM-111. Também poderiam estar envolvidos com a entrada ou saída da célula satélite em seu nicho, posteriormente estimulando a proliferação dos mioblastos. Posteriormente, poderiam participar na decisão dessas células em voltar ao estado satélite progenitor (autorrenovação), ou seguir para a diferenciação terminal, envolvidas na fusão dos mioblastos.

6. PERSPECTIVAS

6.a Estudo *in vivo* da regeneração muscular

Tivemos a oportunidade de iniciar o estudo *in vivo* da regeneração muscular, mas que não pôde ser concluído devido a dificuldades técnicas relacionadas aos anticorpos murinos previstos. Não obstante, realizamos os experimentos iniciais com os camundongos, incluindo o aprendizado do manejo desses animais, lesão com cardiotoxina, remoção dos músculos *Tibialis Anterior* (TA) das duas patas (sendo um reservado para PCR e outro para as marcações). Os pontos recolhidos para análise da cinética de regeneração foram: 0h, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 21 e 30 dias. No tempo predeterminado, o T.A. de uma das patas é coletado (congelado via isopentano) para marcação por imunofluorescência e o outro é congelado com nitrogênio líquido para RT-PCR, ambos procedimentos com a finalidade de identificação das cadeias de LM nas etapas diversas da regeneração muscular.

Pudemos ainda verificar a eficácia das injeções de cardiotoxina através da marcação de Hematoxilina-Eosina em pontos específicos (Figura 6.1). Observamos nos pontos iniciais (até 24h) infiltrado inflamatório e desorganização tecidual. Em contrapartida, especialmente a partir do dia 5, observamos características marcantes de fibras recém-formadas que são: 1) tamanho notoriamente reduzido, quando comparadas às adjacentes; e 2) núcleos localizados no centro da fibra (e não periféricamente, como notamos em fibras maduras). Essas características nos asseguram que as injeções foram bem realizadas e os músculos que armazenamos a -80°C foram bem conservados para as marcações que faremos do nicho lesionado. O processamento das amostras deverá ser realizado em momento oportuno.

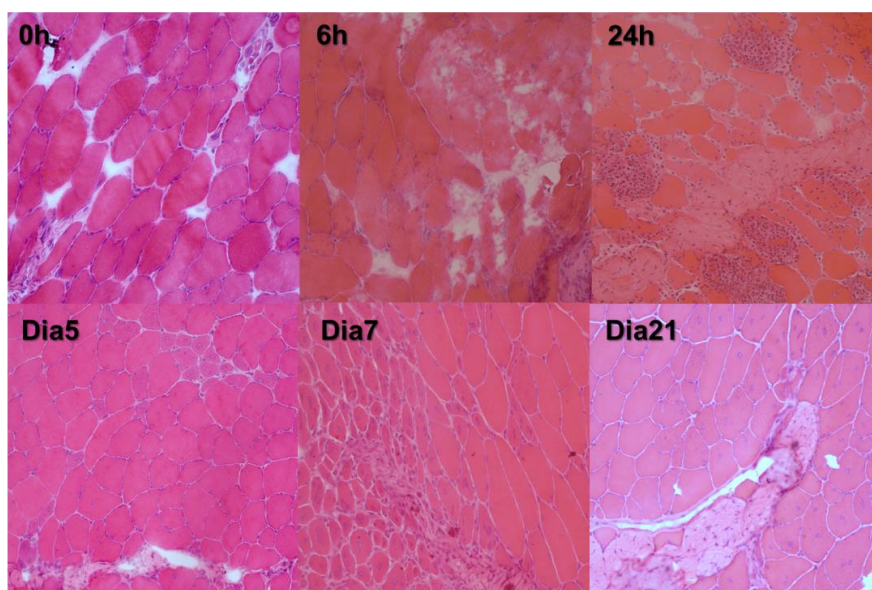


Fig. 6.1: Marcação com Hematoxilina-Eosina de músculo *Tibialis Anterior* (TA) pós-lesão com cardiotoxina em diferentes tempos de regeneração: 0h, 6h, 24h, 5 dias, 7 dias e 21 dias.

6.b Modelo tridimensional de diferenciação (*Engineered Muscle Tissue*, EMT)

No laboratório do grupo colaborador francês, tivemos a oportunidade de realizar experimento piloto para aprendizado da técnica de diferenciação de mioblastos em 3D. Na figura 6.2, observamos o aspecto dos EMTs pós polimerização do gel, que é composto, além das células, por fibrinogênio e trombina. Na figura 6.2B podemos observar a placa de 24 poços com o aparato necessário para a formação do gel.

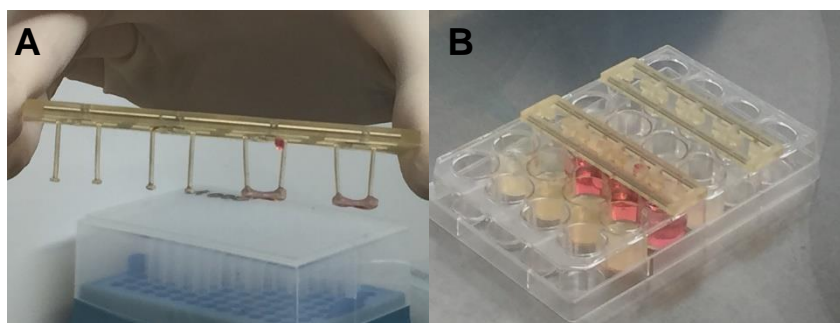


Fig. 6.2: Visualização de EMTs. À esquerda, em (A), observa-se o gel recém-polimerizado prestes a ser colocado na placa com meio de proliferação (B).

Após 2 dias em proliferação, o meio foi trocado para diferenciação (DMEM com insulina) com aprotinina (anti-protease para reduzir a degradação de matriz). Ao final de 7 dias de diferenciação, as células foram marcadas para Hoescht (marcador nuclear semelhante ao DAPI), cadeia pesada de miosina (clone MF20) e faloidina. As imagens foram obtidas por microscopia confocal pelo grupo colaborador em Paris. (Fig. 6.3).

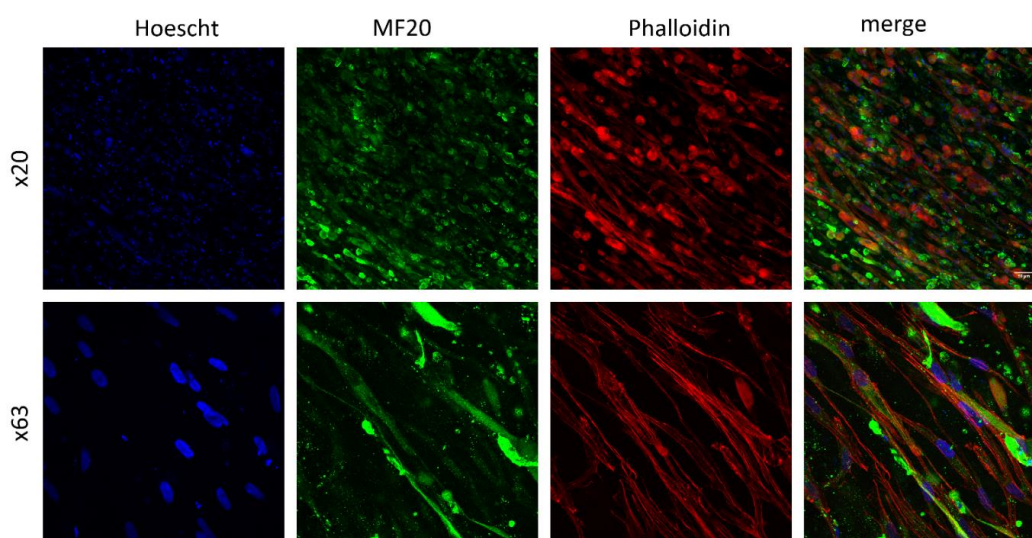


Fig. 6.3: Microscopia confocal do EMTs obtidos após 7 dias de diferenciação. Em azul, Hoescht (marcador nuclear semelhante ao DAPI); em verde, MyHC (clone MF20); em vermelho, faloidina.

Como perspectivas futuras, pretendemos repetir a técnica no Brasil e realizar o tratamento com as isoformas recombinantes de LM adicionadas ao preparo do EMT.

7. CONCLUSÕES

7.1 Sumário de Resultados

- Existe uma expressão diferencial das cadeias de LM em CHQ, C125 e LHCN.
- A cadeia de LM $\alpha 5$ (LM-511 e LM-521) parece induzir a diferenciação em CHQs com 3 dias de diferenciação.
- A LM-111 murina e LM-5111 parecem favorecer uma diferenciação de CHQ em tempos mais tardios (a partir de 5 dias).
- O bloqueio com anticorpo monoclonal 4c7 anticadeia $\alpha 5$ de LM parece prejudicar a diferenciação de mioblastos CHQ quando o tratamento ocorre no terceiro dia de diferenciação.

7.2 Conclusão Final

- Apesar de mais estudos serem necessários, as diferentes isoformas de LM continuam se mostrando promissores reforços em futuras estratégias de terapias celulares com precursores miogênicos. Nossos estudos indicam que as isoformas possam ter papel fundamental em diferentes etapas do processo de regeneração muscular, tais como, proliferação, diferenciação e fusão celular, os quais estariam diretamente correlacionados com a expressão temporal das cadeias de LM.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B., Bray D, Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. 5 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Allouh MZ, Aldirawi MH. Effects of sustanon on the distribution of satellite cells and the morphology of skeletal muscle fibers during maturation. *Pak J Biol Sci* (2012) 15:215–23
- Allouh MZ, Aldirawi MH. Influence of mesterolone on satellite cell distribution and fiber morphology within maturing chicken pectoralis muscle. *Anat Rec* (2012) 295:792–9
- Allouh MZ, Jarrar AA, Asfour HA, Said RS, Shaqoura EI. Sustanon induces dose-independent hypertrophy and satellite cell proliferation in slow oxidative fibers of avian skeletal muscle. *Histol Histopathol* (2017) 19:11871
- Allouh MZ, Rosser BW. Nandrolone decanoate increases satellite cell numbers in the chicken pectoralis muscle. *Histol Histopathol* (2010) 25:133–40
- Allouh MZ, Yablonka-Reuveni Z, Rosser BW. Pax7 reveals a greater frequency and concentration of satellite cells at the ends of growing skeletal muscle fibers. *J Histochem Cytochem* (2008) 56:77–87
- Alway SE, Myers MJ, Mohamed JS. Regulation of satellite cell function in sarcopenia *Frontiers in Aging Neuroscience* (2014), 6 (SEP), art. no. Article 246
- Anderson C., Thorsteinsdottir S, Borycki, A.G. Sonic hedgehog-dependent synthesis of laminin alpha1 controls basement membrane assembly in the myotome. *Development* (2009) 136, 3495–3504.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, *et al.* A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* (2005) 24(5):326–32
- Belkin AM, Stepp MANN. Integrins as Receptors for Laminins. *Microscop Res Tech.* (2000); 30 280–301.
- Berthier C, Blaineau S. Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biol Cell.* (1997) Oct;89(7):413-34.

- Bladen CL, Salgado D, Monges S *et al.* The TREAT-NMD DMD global database: Analysis of more than 7,000 duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat.* (2015); 36(4):395–402
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* (1998) Jan 16;279(5349):349-52.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* (2003) 202:59–68
- Burkin DJ, Kaufman SJ. The $\alpha 7\beta 1$ integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res* 296: 183-190, 1999.
- Burkin DJ, Wallace GQ, Nicol KJ, Kaufman DJ, Kaufman SJ. Enhanced Expression of the $\alpha 7\beta 1$ Integrin Reduces Muscular Dystrophy and Restores Viability in Dystrophic Mice. *J Cell Biol* 152: 1207-1218, 2001.
- Cao Y, Kumar RM, Penn BH, Berkes CA, Kooperberg C, Boyer LA, Young RA, Tapscott SJ. Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO J.* (2006) Feb 8; 25(3):502-11.
- Carmignac V, Durbeej M. Cell–matrix interactions in muscle disease *J. Pathol.* 2012, 226, 200.
- Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev*, 2004.
- Collins CA, Zammit PS, Ruiz AP, Morgan JE, Partridge TA. A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. *Stem Cells* (2007) 25, 885–894.
- Cooper RN, Irintchev A, Di Santo JP, Zweyer M, Morgan JE, Partridge TA, Butler-Browne GS, Mouly V, Wernig A. A new immunodeficient mouse model for human myoblast transplantation. *Hum Gene Ther.* (2001) May 1;12(7):823-31.
- Dhawan J.; Rando T. A.: Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* (2005) Dec;15(12):666-73.
- Doherty TJ. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* (2003); 95(4):1717-27.

- Durbeej M. Laminins Cell Tissue Res., 339 (2010), pp. 259-268
- Edom F, Mouly V, Barbet JP, Fiszman MY, Butler-Browne GS. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. Dev Biol. 1994 Jul;164(1):219-29.
- Foschini R, Ramalho F, Bicas H. Células satélites musculares. Arq Bras Oftalmol (2004).
- Frontera, W.R., and Ochala, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. Calcif. Tissue Int. (2014) 96, 183–195.
- Gilbert PM, Blau HM. Engineering a stem cell house into a home. Stem Cell Res Ther (2011) 2, 3.
- Goudenege S.; Lamarre Y.; Dumont N.; Rousseau J.; Frenette J.; Skuk D.; Tremblay J.: Laminin-111: A Potential Therapeutic Agent for Duchenne Muscular Dystrophy Molecular Therapy. (2010) 18 12, 2155–2163.
- Grogan BF, Hsu JR: Volumetric muscle loss. J Am Acad Orthop Surg (2011), 19(Suppl 1):S35–37.
- Guigal N, Rodriguez M, Cooper RN, Dromaint S, Di Santo JP, Mouly V, Boutin JA, Galizzi JP. Uncoupling protein-3 (UCP3) mRNA expression in reconstituted human muscle after myoblast transplantation in RAG2- γ c/C5(-) immunodeficient mice. J Biol Chem. (2002) Dec 6;277(49):47407-11. Epub 2002 Sep 25.
- Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L, Blau HM. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. Nature (1992) 356, 435–438.
- Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. Physiol Rev. (2005) Jul;85(3):979-1000.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res. (1965) Mar;37:614-36.
- Huard J, Roy R, Bouchard JP, Malouin F, Richards CL & Tremblay JP. Human myoblast transplantation between immunohistocompatible donors and recipients produces immune reactions. Transplant Proc (1992) 24, 3049–3051.

- Humphries MJ. Insights into integrin –ligand binding and activation from the first crystal structure. *Arthritis Res.* (2002) 4 (Suppl. 3), S69 – S78
- Janssen, I., Heymsfield, S.B., Wang, Z.M., and Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J. Appl. Physiol.* 89, 81–88.
- Junqueira L. C.; Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 8. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D, Gledhill RB, Guttmann R, Holland P, Koch PA, Shoubridge E, Spence D, Vanasse M, *et al.* Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* (1993) 34, 8–17.
- Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* (2014) May 27;5:123
- Kikkawa Y, Miwa T, Tohara Y, Hamakubo, Nomizu M. An antibody to the lutheran glycoprotein (Lu) recognizing the LU4 blood type variant inhibits cell adhesion to laminin $\alpha 5$. *PLoS One.* (2011);6(8):e23329.
- Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Yong VW. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nature Reviews Neuroscience* (2013);14, 722–729.
- Lin ML, Bertics PJ. Laminin responsiveness is associated with changes in fibroblast morphology, motility, and anchorage-independent growth: cell system for examining the interaction between laminin and EGF signaling pathways. *J Cell Physiol.* (1995) Sep;164(3):593-604.
- Lindström M.; Thornell L. E.: New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol* (2009).
- Mareco E. Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem gift. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo. 2012.

- Mauro A Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* (1961) Feb; 9:493-5.
- Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE. Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation, *Development* 131(2004) 2247-2256.
- Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissuemorphogenesis. *Annu. Rev. CellDev. Biol.* (2004) 20:255– 84
- Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, Buckingham M. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* (2005) 309, 2064–2067.
- Mouly V, Aamiri A, Bigot A, Cooper RN, Di Donna S, Furling D, Gidaro T, Jacquemin V, Mamchaoui K, Negroni E, Périé S, Renault V, Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS. The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. *Acta Physiol Scand.* (2005) May;184(1):3-15.
- Murre, C.; McCaw, P.S.; Vaessin H. *et al.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, (1989) v.58, n.3, p.537-544.
- Musumeci G, Castrogiovanni P, Coleman R, Szychlinska MA, Salvatorelli L, Parenti R, Magro G, Imbesi R. Somitogenesis: from somite to skeletal muscle. *Acta Histochem* (2015) 117:313–28
- Naidu PS, Ludolph DC, To RQ, Hinterberger TJ, Konieczny, S. F.: Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol Cell Biol* (1995), v.15, n.5, p.2707-2718.
- Naya FJ, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol*, (1999) v.11, n.6, p.683-688.
- Negroni E, Riederer I, Chaouch S, Belicchi M, Razini P, Di Santo J, Torrente Y, Butler-Browne GS, Mouly V. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Mol Ther.* (2009) Oct;17(10):1771-8. doi: 10.1038/mt.2009.167

- Negroni E, Vallese D, Vilquin J-T, Butler-Browne G, Mouly V, Trollet C. Current advances in cell therapy strategies for muscular dystrophies. *Expert Opin Biol Ther* (2011) 11, 157–176.
- O'Brien KF, Kunkel LM: Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Mol Genet Metab* (2001), 74:75–88.
- Partridge TA, Grounds M, Sloper JC. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature* (1978) 273, 306–308.
- Patton BL, Connoll AM, Martin PT, Cunningham JM, Mehta S, *et al.* Distribution of ten laminin chains in dystrophic and regenerating muscles. *Neuromuscul. Disord.* (1999) 9(6–7):423–33
- Quinn LS, Ong LD, Roeder RA. Paracrine control of myoblast proliferation and differentiation by fibroblasts. *Dev Biol.* (1990) Jul;140(1):8-19.
- Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H: Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* (1995).
- Rayagiri SS, Ranaldi D, Raven A, Azhar NIFM, Lefebvre O, Zammit PS, Borycki AG. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nature Communications* (2018) 9:1075
- Rescan, PY. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry e molecular biology*, (2001) 130(1), 1-12.
- Riederer I.; Bonomo A.C.; Mouly V.; Savino W.: Laminin therapy for the promotion os muscle regeneration. *FEBS Letters* 589 (2015) 3449-3453.
- Riederer I.; Negroni E.; Bencze M.; Wolff A.; Aamiri A.; Di Santo J. P.; Silva-Barbosa S. D.; Butler-Browne, G.; Savino, W.; Mouly V.: Slowing Down Differentiation of Engrafted Human Myoblasts Into Immunodeficient Mice Correlates With Increased Proliferation and Migration. *Mol Ther.* (2011) 20: 146-154.
- Ringelmann B, Röder C, Hallmann R, Maley M, Davies M, Grounds M, Sorokin L. Expression of laminin alpha1, alpha2, alpha4, and alpha5 chains, fibronectin, and

- tenascin-C in skeletal muscle of dystrophic 129ReJ dy/dy mice. *Exp Cell Res.* (1999) Jan 10;246(1):165-82.
- Robbins, S. L.; Cotran, R. S. *Patologia: Bases patológicas das doenças.* 8 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- Rocha OMD, Batista AdAP, Maestá N, Burini RC, Laurindo IMM. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis. *Rev Bras Reumatol* (2009);49(3):288-301.
- Rogers RS, Nishimune H. The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. *Matrix Biol.* (2017) Jan;57-58:86-105. doi: 10.1016/j.matbio.2016.08.008. Epub 2016 Sep 7.
- Rowland, L.A., Bal, N.C., and Periasamy, M. (2014). The role of skeletal muscle-based thermogenic mechanisms in vertebrate endothermy. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 90, 1279–1297.
- Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J. Cell Biol.*(1990) 111:1685–99
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* (2000) Mar;182(3):311-22.
- Silva MDP, Carvalho RF.: Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *R. Bras. Zootec.* (2007) vol.36 suppl.0.
- Silva-Barbosa S. D.; Butler-Browne G. S.; De Mello W.; Reiederer I.; Di Santo J. P.; Savino, W.; Mouly V.: Human Myoblast Engraftment Is Improved in Laminin-Enriched Microenvironment. *Transplantation*: 85(4): 566-575, 2008.
- Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, Di Santo JP, Mouly V. Comparative analysis of genetically engineered immunodeficient mouse strains as recipients for human myoblast transplantation. *Cell Transplant.* (2005);14(7):457-67.
- Skuk D, Tremblay JP. The Process of Engraftment of Myogenic Cells in Skeletal Muscles of Primates: Understanding Clinical Observations and Setting Directions in Cell Transplantation Research. *Cell Transplant.* (2017) Nov;26(11):1763-1779.

- Sorokin LM, Maley MA, Moch H, von der Mark H, von der Mark K, Cadalbert L, Karosi S, Davies MJ, McGeachie JK, Grounds MD. Laminin alpha4 and integrin alpha6 are upregulated in regenerating dy/dy skeletal muscle: comparative expression of laminin and integrin isoforms in muscles regenerating after crush injury. *Exp Cell Res.* 2000 May 1;256(2):500-14.
- Waldemer-Streyer RJ, Chen J. Myocyte-derived Tnfsf14 is a survival factor necessary for myoblast differentiation and skeletal muscle regeneration. *Cell Death Dis* (2015) 6:e2026
- Watabe, S.: Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of Fish Biology*, (1999) 55(sa), 1-18.
- Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. *J Histochem Cytochem* (2011) 59:1041–59
- Zhu CH, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, Shay JW, Di Santo JP, Butler-Browne GS, Wright WE. 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.* (2007) Aug;6(4):515-23. Epub 2007 Jun 8.