

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**CARACTERIZAÇÃO *IN SITU* DOS ORIENTADORES DE AXÔNIO POR
REPULSÃO (RGMs) NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA, E
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MEMBRO A (RGMa) DURANTE A
MIOGÊNESE EM CAMUNDONGOS**

Aline Fagundes Martins

Belo Horizonte, junho de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CARACTERIZAÇÃO *IN SITU* DOS ORIENTADORES DE AXÔNIO POR
REPULSÃO (RGMs) NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA, E
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MEMBRO A (RGMa) DURANTE A
MIOGÊNESE EM CAMUNDONGOS**

Aline Fagundes Martins

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof. Dra. Érika Cristina Jorge

Co-orientador: Prof. Dr. Gregory Thomas Kitten

Belo Horizonte, junho de 2015.

Agradecimentos

Ao meu Senhor Jesus, porque tudo o que sou e o que planejo ser pertencem a Ti. Obrigada Senhor por ter sido o meu mais alto refúgio, minha fortaleza. Por me aconchegar em Teus braços e me encher com a Tua doce paz. Por secar minhas lágrimas nos momentos de tristeza e por me dar a esperança de um amanhã feliz. Por iluminar meu sorriso, minha alma, meus caminhos. Obrigada por colocar pessoas tão preciosas em minha vida e me dar o privilégio de conviver com cada uma delas.

“Porque d’Ele, por meio d’Ele e para Ele são todas as coisas. À Ele seja a glória eternamente.” Rm 11:36.

Ao meu pai, Hermes, que em 2012 partiu para os braços de Deus, levando consigo uma parte enorme do meu coração. À você, que me mostrou a imensidão do amor de um pai, meu precioso e eterno amigo. À minha mãe Eliane, ao meu marido José Esteves e ao meu irmão Igor, meus bens mais valiosos. Vocês são os amores da minha vida e agradeço à vocês por estarem ao meu lado incondicionalmente.

À minha família querida pelo apoio, compreensão e torcida. Aos meus amigos de ontem, de hoje e aos de sempre. Vocês tornam meus dias mais prazerosos e leves! Sem o carinho de vocês seria impossível chegar ao fim de mais uma etapa.

À minha orientadora e amiga, Érika, cujo carinho, paciência e dedicação me inspiram. Você me mostrou um mundo de questionamentos e descobertas que me deixou completamente apaixonada! Agradeço a Deus pelo privilégio que tive em ser sua primeira aluna de doutorado e de partilhar com você essa jornada.

Ao meu co-orientador Gregory pela confiança, auxílio e carinho. À minha amiga e co-orientadora de coração, Gerluzia, cuja doçura, fé e alegria enchem meus dias de renovo.

À equipe Labode pelo auxílio, carinho, alegria. Obrigada por dividir comigo as alegrias e as frustrações, por arrancarem sorrisos dos meus lábios

quando faltava forças para sorrir. À todos vocês, Chico, Figueira, Cynthia, Fernando, Matheus, Aline Copola, Alinne Costa, Bruno, Juliano, Cris Souza, Carol, Letícia, Verlane, Sérgio, Lucas, Nat, Luíza. À Cris Toledo que me ajudou tanto nessa reta final. Ao meu “*dream lab*”: Débora, Íria, Júlia, Samira, Igor e Rayan, tenho saudades de vocês todos os dias. Ao Carlos, quase agregado do Labode. Ao Millor, pelas análises estatísticas.

Aos queridos professores Alfredo, Cleida, Elizabeth, Fernanda, Gustavo, Hélio, Luiz Renato, Sérgio Pena, Tânia e Vasco que abriram as portas de seus laboratórios para que eu pudesse realizar meus experimentos. Ao técnico Carlos pelo suporte. Aos colegas da pós graduação em Biologia Celular, em especial ao Paulo, à Samyra e à Mônica pela ajuda. À toda a equipe da Pós-Graduação em Biologia Celular, professores, coordenadores, secretariado e técnicos.

À banca, pela disponibilidade e carinho. Por me enriquecerem de tantas formas.

À todos que me ajudaram a tornar este sonho uma realidade.

Lista de Figuras

Figura 1. Processo miogênico	15
Figura 2. Desenho esquemático mostrando a fusão do mioblasto e sua associação com a localização espacial e funcional de moléculas	19
Figura 3. Desenho esquemático mostrando a arquitetura da musculatura esquelética	24
Figura 4. Desenho esquemático das vias de sinalização de Caderina e superfamília Ig	27
Figura 5. Desenho esquemático dos domínios protéicos dos membros da família RGM	32
Figura 6. Desenho esquemático do receptor Neogenina com seus sítios de ligação para RGMa, Netrina e RGMc	34
Figura 7. Desenho esquemático dos receptores Neogenina, UNC5 e as principais moléculas associadas à via de interação de RGMa/Neogenina/UNC5B	35
Figura 8. Desenho esquemático da associação de BMP aos receptores tipo I e tipo II sem e com a utilização de RGM como co-fator	36
Figura 9. Imunolocalização das RGMs em secções transversais do tecido muscular esquelético de camundongos adultos	53
Figura 10. Imunolocalização das RGMs em secções longitudinais do tecido muscular esquelético de camundongos adultos	54
Figura 11. Imagens de confocal da imunomarcção de C-RGMa no músculo esquelético e cérebro de camundongos adultos	55
Figura 12. Imagens de confocal da imunomarcção de N-RGMa no músculo esquelético e cérebro de camundongos adultos	56
Figura 13. Imunohistoquímica de C-RGMa e N-RGMa nos músculos esqueléticos de camundongos adultos	57

Figura 14. Co-localização entre as RGMs e Distrofina nas células musculares adultas de camundongos.....	58
Figura 15. Co-localização de RGMa/Desmina e RGMa/Titina na musculatura esquelética adulta de camundongos.....	59
Figura 16. Co-localização de RGMa e os diferentes tipos de MHC (tipo I, fibras lentas; e tipos IIa e IIb, fibras rápidas)	60
Figura 17. Expressão de RGMa em células indiferenciadas e durante a diferenciação de mioblastos primários de <i>Mus musculus</i>	62
Figura 18. Identificação dos peptídeos para RGMa presentes no músculo esquelético de camundongos adultos	63
Figura 19. Eficácia dos tratamentos para super-expressão e <i>knockdown</i> de RGMa.....	64
Figura 20. Efeito da super-expressão de RGMa sobre o fenótipo de mioblastos primários extraídos da musculatura esquelética de <i>Mus musculus</i> e de mioblastos da linhagem C2C12	65
Figura 21. Efeito sobre o fenótipo das células primárias quando do <i>knockdown</i> de RGMa e seu respectivo controle	66
Figura 22. Efeito do <i>knockdown</i> de RGMa sobre a formação de miotubos	69
Figura 23. Efeito da super-expressão de RGMa sobre a fusão de mioblastos .	70

Lista de Abreviações

°C: Graus Celsius

µm: Micrômetros

ActR: receptor Activina

ADAM: Disintegrina e Metaloprotease

ALK: Quinase semelhante ao Receptor Activina

ALP: Fosfatase Alcalina

ATP: Adenosiltrifosfato

BMP: Proteína Morfogenética Óssea

BMPR: Receptor para BMP

BOC: *Brother of CDO*

BSA: Albumina do Soro Bovino

C2C12: Linhagem de Mioblastos Imortalizados de Camundongos

CAP: Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

CDO: Molécula Relacionada à Adesão Celular Subregulada por Oncogenes

CEBIO: Centro de Bioterismo

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

COS-7: Linhagem de fibroblastos e células semelhantes a fibroblastos advindos do macaco verde africano

DAB: Diaminobenzidino

DCC: Deletado em Cancer Colorectal

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DPBS: Tampão Fosfato Salino de Dulbecco

EDL: Músculo Extensor Longo dos Dedos

EDTA: Ácido Tetraacético Etilenediamina

ERK: Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FAK: Quinase de Adesão Focal
FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos
FNIII: Fibronectina Tipo III
GDF: Fator de Crescimento e Diferenciação
GFP: Proteína Fluorescente Verde
GPI: Glicosilfosfatidilinositol
H: Hora
HFE2: Hemojuvelina
HJV: Hemojuvelina
HRP: Peroxidase *Horseradish*
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
Id: Inibidor de Diferenciação
Ig: Integrina
IGF: Fator de Crescimento semelhante à Insulina
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
IL: Interleucina
Kg: Quilograma
LARG: Fator de Troca de Nucleotídeo Guanina Associado à Leucemia
MAPK: Proteína Quinase Mitógeno Ativada
MC: meio de crescimento
MD: meio de diferenciação
MHC: Miosina de Cadeia Pesada
Min: Minutos
MRF: Fatores Regulatórios Miogênicos
MuRF1: *Muscle RING Finger 1*

NaCl: Cloreto de Sódio

NCAM: Molécula de Adesão da Célula Neural

NFAT: Fator Nuclear de Células T Ativadas

PAX: *Paired Box*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RGM: Orientadores de Axônio por Repulsão

RNA: Ácido Ribonucléico

ROBO: *Roundabout*

ROCK: Rho Quinase

RT-PCR: Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase

SDS: dodecilsulfato sódico

Shh: *Sonic Hedgehog*

siRNA: Ácido Ribonucléico de interferência

SRF: Fator de Resposta Soro

TA: temperatura ambiente

TACE: Enzima Conversora do Fator de Necrose Tumoral Alfa

TBS: Tampão Salino Tris

TBS-TC: Tampão Salino Tris, Tween 20 e Caseína

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador β

TNF: Fator de Necrose Tumoral

U: Unidade

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UI: Unidade Internacional

UNC5B: *Uncoordinated locomotion-5B*

USP: Proteases de Processamento Ubiquitina Específicas

Resumo

Orientadores de axônio por repulsão (RGMs) são moléculas que atuam como pistas negativas para orientar o crescimento axonal durante o desenvolvimento embrionário, permitindo a correta inervação dos tecidos e órgãos. A família RGM é composta por quatro membros: RGMa, RG Mb, RGMc e RGMd. Novas evidências têm sugerido possíveis papéis para estas RGMs durante o desenvolvimento e manutenção da musculatura esquelética em vertebrados. *RGMa* e *RG Mb* foram encontrados na região dos somitos onde se originam os precursores miogênicos e células satélites. Evidências também sugerem a presença dessas moléculas nas células musculares esqueléticas de camundongos adultos. No presente estudo, procuramos (1) determinar a localização de RGMa, RG Mb e RGMc nas células musculares esqueléticas de camundongos adultos; e (2) investigar os efeitos da super-expressão e *knockdown* de RGMa nas células musculares esqueléticas *in vitro*. RGMa, RG Mb e RGMc foram encontradas no sarcolema. RGMa também foi observada no sarcoplasma, onde apresentou um padrão estriado de marcação, semelhante às proteínas sarcoméricas. Foi possível co-localizar RGMa com proteínas sarcoplasmáticas conhecidas, sugerindo que este orientador de axônio atue como uma proteína sarcoplasmática. Ensaios de *western blot* revelaram a presença de dois peptídeos para RGMa em amostras de músculo esquelético adulto, um de 60 e outro de 33 kDa. A função biológica de RGMa em células musculares esqueléticas foi investigada em células da linhagem C2C12 e mioblastos primários. A super-expressão de RGMa *in vitro* promoveu o aparecimento de células mais largas, hipertróficas, em sua maioria miotubos; enquanto o *knockdown* de RGMa resultou em células menores, atróficas, com morfologia típica de mioblastos indiferenciados. O *knockdown* de RGMa bloqueou a formação de miotubos, uma vez que, interferiu na fusão dos mioblastos. Nossos resultados são os primeiros a mostrar uma molécula orientadora de axônio como uma proteína sarcoplasmática e a incluir RGMa nos sistemas que regulam o tamanho e a diferenciação da célula muscular esquelética *in vitro*.

Palavras-chave: Orientador de axônio, RGM, músculo esquelético, proteínas sarcoméricas, C2C12, células primárias.

Abstract

Repulsive Guidance Molecules (RGMs) are negative cues that, during development, guide axonal growth in order to allow the proper innervation of the tissues and organs. RGMs compose a family of four members comprised by: RGMa, RGMb, RGMc and RGMd. New evidence has suggested possible roles for RGMs during skeletal muscle development and maintenance in vertebrates. *RGMa* and *RGMb* were found in somites, specially in domains known to be the origin site of skeletal muscle pioneer and stem cells. Evidences also suggested the presence of these molecules in adult mice skeletal muscle cells. In the present study, we aimed to (1) determine the localization of RGMa, RGMb, and RGMc in adult mice skeletal muscle cells; and (2) investigate the effects of RGMa over-expression and knockdown in skeletal muscle cells *in vitro*. RGMa, RGMb e RGMc were found in the sarcolemma. RGMa was also observed in the sarcoplasm with a striated pattern of labeling similar to the sarcomeric proteins. We were able to colocalize RGMa and known sarcoplasmic proteins suggesting a role for this axon guidance molecule as a sarcoplasmic protein in skeletal muscle cells. Western blot analysis revealed the presence of two RGMa peptides in adult skeletal muscle samples, a 60 kDa and a 33 kDa fragment. RGMa phenotypes in skeletal muscle cells (C2C12 and primary myoblasts) were also investigated. RGMa over-expression produced larger, hypertrophic cells, mainly myotubes, whereas RGMa knockdown resulted in the appearance of atrophic cells, with a typical morphology of undifferentiated myoblasts. RGMa knockdown also blocked myotube formation in both skeletal muscle cell types since it interferes in myoblast fusion. Our results are the first to show an axon guidance molecule as a skeletal muscle sarcoplasmic protein and to include RGMa in a system that regulates skeletal muscle cell size and differentiation *in vitro*.

Keywords: Axon guidance, RGM, skeletal muscle, sarcomere proteins, C2C12, primary cultures.

Sumário

1. Introdução e Revisão de Literatura	14
1.1. Miogênese no embrião	14
1.2. Morfologia da célula muscular	21
1.3. Fatores envolvidos na diferenciação muscular.....	25
1.4. Fatores envolvidos na regulação do tamanho da célula muscular .	27
1.5. Orientadores de axônios	31
2. Objetivos	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. Material e Métodos	41
3.1. Animais	41
3.2. Imunolocalização das RGMs e proteínas musculares conhecidas na musculatura adulta de camundongos	41
3.3. Cultivo dos mioblastos da linhagem C2C12 e células primárias.....	44
3.4. <i>Western Blot</i>	46
3.5. Super-expressão e o <i>knockdown</i> de RGMa por RNA de interferência (siRNA) in vitro	47
3.6. Transfecções celulares	49
3.7. Imunofluorescência nas células em cultura	50
3.8. Morfometria	50

3.9. Análise estatística	51
4. Resultados	52
4.1. Imunolocalização de RGMa, RGMB e RGMc	52
4.2. Co-localização de RGMa com proteínas sarcoméricas e sarcoplásmicas	57
4.3. Padrão de expressão de RGMa durante a diferenciação <i>in vitro</i> de mioblastos primários	61
4.4. Formas de peptídeos para RGMa sintetizados no músculo esquelético adulto de camundongos	62
4.5. Efeitos da super-expressão e <i>knockdown</i> de RGMa sobre o tamanho das células musculares <i>in vitro</i>	63
4.6. Efeito da super-expressão e <i>knockdown</i> de RGMa na diferenciação das células musculares <i>in vitro</i>	68
5. Discussão	71
5.1. Imunolocalização de RGMa, RGMB e RGMc na musculatura esquelética de camundongos adultos	72
5.2. Padrão de marcação de RGMa e proteínas do sarcoplasma	73
5.3. Padrão de expressão de RGMa durante a diferenciação <i>in vitro</i> de mioblastos primários	76
5.4. Formas de RGMa presentes nas células musculares esqueléticas .	76
5.5. Caracterização funcional <i>in vitro</i> de RGMa em células musculares esqueléticas	79
6. Conclusão	84
7. Referências bibliográficas	85
8. Anexo	109

1. Introdução e Revisão de Literatura

1.1. Miogênese no Embrião

O programa molecular de formação da musculatura esquelética é fonte de pesquisa para (1) a medicina, dada sua importância no desenvolvimento de abordagens terapêuticas para o tratamento de atrofia e distrofias musculares, na tentativa de aumentar o tamanho das fibras musculares, a força e a massa muscular desses pacientes; (2) a indústria de produção de carnes, porque pode auxiliar na obtenção de animais com maior eficiência de acúmulo de massa muscular, em menor tempo e custo, idealmente sem a utilização de agentes farmacológicos; e (3) o mercado da estética, visto que uma musculatura volumosa e definida tem sido alvo de desejo de inúmeras pessoas ao redor do mundo.

Nos vertebrados, a formação da musculatura esquelética tem sua origem nos somitos (Christ & Ordahl, 1995; Tajbakhsh & Buckingham, 1999), condensações epiteliais de mesoderma paraxial localizadas em ambos os lados da notocorda e tubo neural formadas aos pares com sentido antero-posterior no dorso do embrião (Nowicki & Burke, 2000). As células da região ventral dos somitos sofrem uma transformação epitélio-mesenquimal formando o esclerótomo, estrutura embrionária responsável pela formação das vértebras (Bagnall et al., 1989; Borycki et al., 1999). As células da região dorsal dos somitos formam o dermomiótomo, um epitélio de células colunares que dará origem aos progenitores miogênicos e células da derme (Brill et al., 1995).

Os sinais advindos da notocorda, tubo neural e ectoderma são responsáveis pela expressão dos Fatores Regulatórios Miogênicos, os quais, atuam sobre as células do dermomiótomo e são de suma importância para a especificação e a diferenciação dos progenitores miogênicos (Pownall & Emerson, 1992; Gustafsson et al., 2002) (Figura 1).

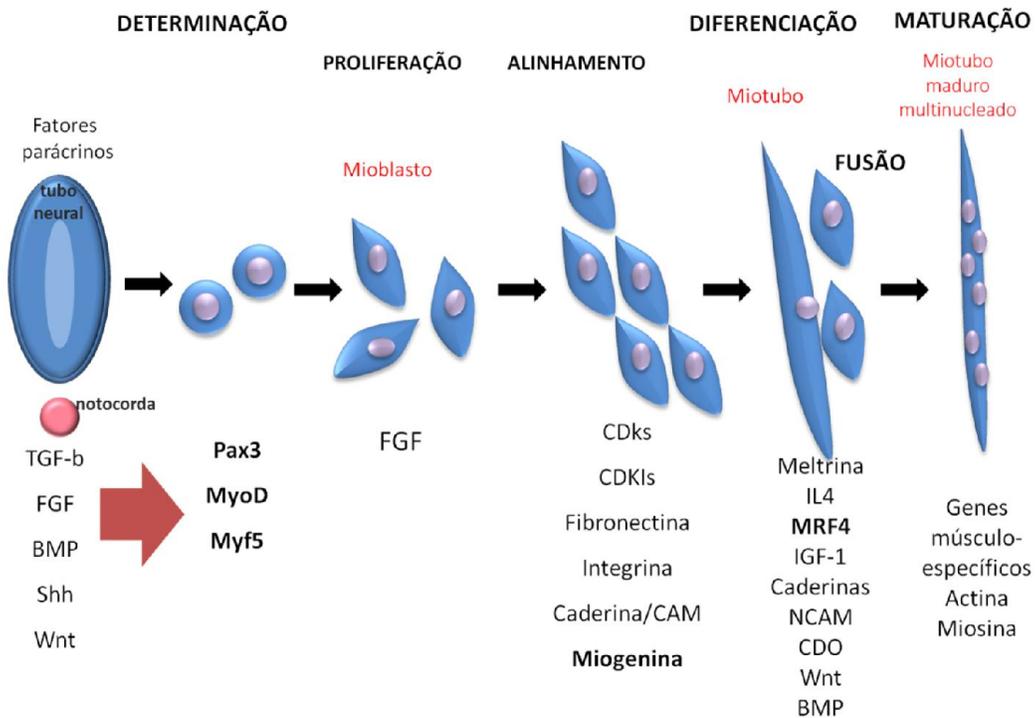


Figura 1. Processo miogênico. A figura esquemática mostra as principais moléculas que participam dos eventos associados à formação da musculatura esquelética. Adaptado de Walsh & Perlman (1997).

Os Fatores Regulatórios Miogênicos (MRFs) MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4, são uma família de fatores de transcrição bHLH amplamente conservada nos vertebrados (Weintraub et al., 1991) responsável pela especificação e diferenciação dos progenitores musculares (Choi et al., 1990, Davis et al., 1987). Myf5 e MyoD são expressos em mioblastos proliferativos (Emerson, 1990) e são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da linhagem dos progenitores musculares. Myf5 controla os eventos precoces de especificação dos progenitores miogênicos incluindo a proliferação celular e o estabelecimento do local de migração celular para formação dos sítios de miogênese (Rudnicki et al. 1993). Camundongos duplo mutantes para Myf5 e MyoD não formam musculatura esquelética (Tajbakhsh et al., 1996). Por meio de mecanismos compensatórios, Myf5 e MyoD são ainda considerados funcionalmente redundantes. Embriões MyoD(-/-) desenvolvem-se normalmente e super-expressam Myf5 em todos os progenitores miogênicos (Rudnicki et al., 1992). No entanto, embriões MyoD(-/-)/Myf5(+/-) são

deficientes em progenitores musculares e em embriões *MyoD(-/-)*, a diferenciação dos músculos nos membros são, significativamente, atrasadas (Kablar et al., 1997). Por sua vez, Miogenina e MRF4 são ativados diferencialmente em células musculares em diferenciação (Buckingham et al., 1992), consistente com suas funções regulatórias mais tardias nos processos de diferenciação, regeneração e especialização muscular quanto ao tipo de fibra. Embriões de camundongos *Miogenina(-/-)* e *MRF4(-/-)* formam progenitores musculares que expressam *Myf5* e *MyoD*, no entanto, os músculos diferenciados são deficientes (Nabeshima et al., 1993; Olson et al., 1996; Venuti et al., 1995). *Miogenina* e *MRF4* são expressas de forma não semelhante em músculos diferenciados e foram associados à regulação de genes alvos para as proteínas contráteis (Charbonnier et al., 2002; Mak et al., 1992; Yutzey et al., 1990) incluindo genes envolvidos nos processos de diferenciação e regeneração de fibras lentas e rápidas (Hinterberger et al., 1991; Jacobs-El et al., 1995; Nicolas et al., 2000). *Miogenina* e *MRF4* são, portanto, ativados durante a diferenciação de mioblastos (Edmondson & Olson, 1989; Miner & Wold, 1990; Rhodes & Konieczny, 1989; Wright et al., 1989) e, juntamente com *MyoD* e *Myf5*, atuam como reguladores da ativação de genes de proteínas musculares contráteis (Lassar et al. 1991). Os genes para as proteínas contráteis musculares são controlados por acentuadores de transcrição músculo-específicos que, em geral, possuem sítios E-box para a ligação dos MRFs. Todos os MRFs são capazes de se ligar aos motivos de sequência E-box (Dressel et al., 2001; McKinsey et al., 2001; Puri et al., 2001); desta forma, *Myf5*, *MRF4*, *Miogenina* e também *MyoD* agem mais tarde no programa miogênico como fatores de diferenciação muscular (Braun & Arnold, 1995).

A determinação dos progenitores musculares e a formação das fibras musculares são coordenadas por uma série de eventos morfogênicos divididos em três ondas miogênicas, os quais ocorrem desde os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário até a fase adulta (Christ & Brand-Saberi, 2002). Na primeira onda miogênica, progenitores somíticos *Pax3+/Pax7-* seriam os responsáveis pela formação dos mioblastos embrionários e, sua fusão, levaria à formação das fibras primárias multinucleadas (Gros et al. 2005; Relaix et al. 2005). Após o estabelecimento da rede de fibras primárias ocorre a segunda

onda miogênica, na qual precursores Pax3+/Pax7+ ou ainda células Pax7+ resultantes de progenitores Pax3 que não mais expressam este fator de transcrição, formam os mioblastos fetais (Cossu & Biressi, 2005; Messina & Cossu, 2009). Na miogênese secundária, os mioblastos fetais fundem-se a outros mioblastos fetais, localizados ao redor das fibras primárias ou às fibras primárias, resultando na formação de fibras musculares secundárias que são depositadas sobre as primárias (Cossu & Biressi, 2005; Messina & Cossu, 2009). Essa fase é caracterizada pelo crescimento e maturação muscular, bem como, por sua inervação. Ao final deste período, uma lâmina basal circunda cada fibra individualmente e novas células, denominadas células satélites, podem ser identificadas (Cossu & Biressi, 2005; Messina & Cossu, 2009). Na terceira onda miogênica, as células satélites são responsáveis pelo crescimento pós-natal e pela regeneração da fibra muscular (Cossu & Biressi, 2005; Messina & Cossu, 2009).

Após a fase de determinação, os mioblastos passam pelas fases de proliferação, migração (para colonizar o corpo do embrião com precursores miogênicos) e diferenciação (para formar as fibras musculares), as quais são reguladas por sinais positivos e negativos. Sinais ativadores localizados estimulam a especificação e a proliferação das células precursoras, em contrapartida, a migração desses progenitores para locais distantes, onde os sinais ativadores não estão presentes, permite a saída do ciclo celular e determina o início do processo de diferenciação muscular (Tajbakhsh, 2009). A expressão de Myf5 e MyoD é coordenada por uma série de sinais ativadores tais como Shh, Wnt, Notch, BMP e FGF que trabalham em conjunto com fatores inibitórios como Noggin, Chordin e Frizbee (Pourquie et al., 1996; Reshef et al., 1998; Kucharczuk et al., 1999; Borycki et al. 2000; Delfini et al., 2000; Kenney & Rowitch, 2000; Hirsinger et al., 2001; Fisher et al., 2002; Cossu & Biressi, 2005).

A progressão dos mioblastos através dos estágios de diferenciação é cuidadosamente controlada de forma a garantir que a miogênese ocorra no momento e local adequados. Primeiramente, mioblastos expressando Pax3 e Myf5 proliferam-se mantendo-se num estado indiferenciado graças à expressão

do receptor Notch1 (Delfini et al., 2000). A expressão de MyoD seria necessária na transição do processo de proliferação celular para o de diferenciação (Yablonka-Reuveni et al., 1999). MyoD ativa a proteína Miogenina (Hollenberg et al., 1993) e o inibidor de ciclina p21 (Otten et al., 1997; Cenciarelli et al., 1999), este último relacionado à saída do ciclo celular (revisado por Walsh & Perlman, 1997). A expressão de Myf5 permanece nos mioblastos pós-mitóticos que passam a expressar MyoD e os ligantes Delta1 ou Serrate2 dando início ao processo de diferenciação destas células (Delfini et al., 2000).

O processo de diferenciação dos mioblastos é coordenado por vários fatores externos sendo definidos por alterações morfológicas marcantes. As células tornam-se alongadas, fusiformes e migram em direção a outros mioblastos diferenciados para formar grupos de células alinhadas (Jansen & Pavlath, 2008). Após o alinhamento, reconhecimento e adesão célula-célula, inicia-se a união das membranas celulares, por meio da formação de poros e sua incorporação, com mudanças morfológicas subsequentes que culminarão no aparecimento de células multinucleadas (Knudsen & Horwitz, 1977; Rochlin et al., 2009). O processo de fusão ocorre em dois estágios: no primeiro, os mioblastos diferenciados se fundem para formar os miotubos nascentes com um número limitado de núcleos; no segundo, a fusão dos mioblastos diferenciados aos miotubos nascentes originam miotubos grandes, maduros e multinucleados (Figura 2A). Em mamíferos, as células miogênicas encontram-se intimamente justapostas e uma série de moléculas localizadas na região de contato entre as duas células influenciam o processo de fusão. Tais moléculas podem estar localizadas em ambas as células (localização simétrica), em apenas uma das células (localização assimétrica) ou serem funcionalmente requeridas (revisado por Pavlath, 2010) (Figura 2B).

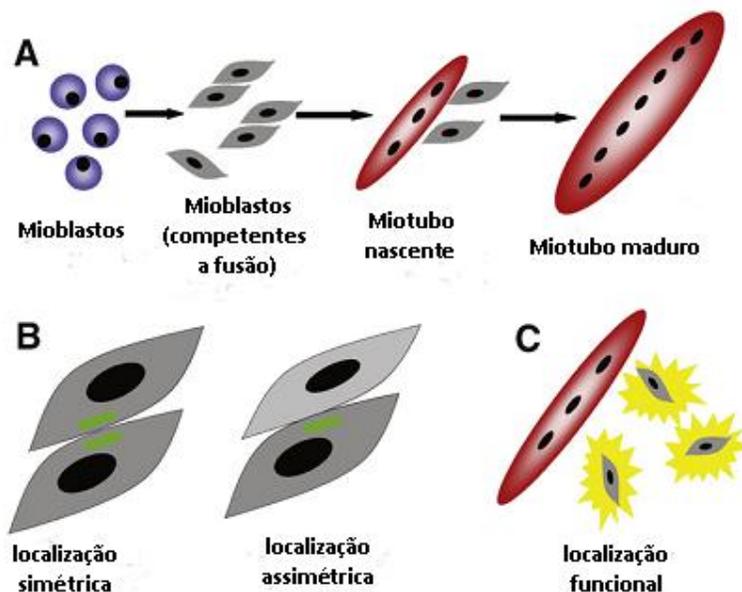


Figura 2. Desenho esquemático mostrando a fusão do mioblasto e sua associação com a localização espacial e funcional de moléculas. Retirado de Pavlath (2010).

Assim, na localização simétrica, encontram-se as moléculas de adesão celular tais como as M-caderinas (Cifuentes-Diaz, 1995), Integrinas (Schwander et al., 2003; Brzoska et al., 2006) e a proteína contendo os domínios Disintegrina e Metaloprotease 12 (ADAM12) (Lafuste et al., 2005); e as moléculas que se associam aos domínios intracelulares de tais proteínas de adesão como a β -Catenina (Vasyutina et al., 2009) e a Kindlin-2 (Dowling et al., 2008). Essas proteínas transmembranas e seus adaptadores intracelulares ativam vias de transdução de sinais em células miogênicas alinhadas (Vasyutina et al., 2009; Charrasse et al., 2007) que culminarão na reorganização do citoesqueleto antes e após a fusão, com remodelação das redes de Actina (Peckham et al., 2008) e microtúbulos (Saitoh et al., 1988) do citoesqueleto; e o recrutamento de Vinculina e proteínas do citoesqueleto para os pontos de contato entre os mioblastos (Vasyutina et al., 2009), as quais estariam associadas à localização das vesículas de pré-fusão derivadas do Complexo de Golgi (Kim et al., 2007).

Dentre as moléculas envolvidas no processo de fusão que se dispõem numa localização assimétrica estão a Actina e a Miosina IIA. Durante o

alinhamento dos mioblastos, uma densa parede de Actina, paralela ao longo eixo das células, é formada em apenas uma das células (Duan et al., 2009). A Miosina IIA não-muscular se associa à Actina para a formação dessa estrutura bem como para o aparecimento de vesículas na membrana. Durante a fusão, aberturas se formam na parede de Actina nas regiões de acúmulo de vesículas, tais vesículas aparecem em ambas as células ao longo da membrana, e os poros de fusão são formados. A parede de Actina poderia conferir uma certa rigidez à membrana necessária à fusão ou poderia atuar como uma barreira temporária que impediria o movimento da vesícula até a membrana (Kim et al., 2007). Além disso, o alongamento do mioblasto durante o processo de diferenciação é seguido por extensões celulares dinâmicas dos filamentos de Actina (pseudopodia e filopodia), as quais entram em contato com as células musculares adjacentes (Yoon et al., 2007; Stadler et al., 2010). Várias moléculas são recrutadas para a extremidade distal do pseudópode de uma célula quando em proximidade com outro mioblasto tais como a Diacilglicerol Quinase ζ (Abramovici & Gee, 2007). Essa enzima foi associada à formação do Ácido Fosfatídico, à proteína Sintrofina e a GTPase Rac1, todas elas envolvidas na reorganização da Actina requerida na pseudopodia e filopodia (Abramovici & Gee, 2007). Durante a diferenciação miogênica, a enzima Creatina Quinase B torna-se proeminentemente localizada nas extremidades de um dos miotubos nascentes ou maduros dentre as células vizinhas (O'Connor et al., 2008). Esta enzima é responsável por renovar os estoques de ATP em sítios com alta atividade ATPase, sugerindo que reações dependentes de ATP estariam localizadas nas extremidades dos miotubos (Kuiper et al., 2008). De fato, a adição de mionúcleos aos miotubos é um processo que requer grande quantidade de energia, tanto devido à alta organização do citoesqueleto e estruturas sarcoméricas nos miotubos, quanto ao maior tamanho da célula (Kuiper et al., 2008).

As moléculas funcionalmente requeridas aparecem apenas nos estágios mais tardios da miogênese e regulam a fusão de mioblastos diferenciados e miotubos nascentes. O fator de transcrição NFATc2, por exemplo, é expresso por mioblastos e miotubos nascentes. Este fator controla a fusão dos mioblastos ao regular a expressão de Interleucina 4 (IL4) pelos miotubos nascentes (Horsley

et al., 2003). A perda de NFATc2 inibe a adição de mionúcleos aos miotubos nascentes devido a defeitos no recrutamento e/ou fusão dos mioblastos aos miotubos (Horsley et al., 2001; Pavlath et al., 2003). Nefrina, uma proteína transmembrana da superfamília Ig, foi também associada ao processo de fusão de mioblastos durante o desenvolvimento e regeneração muscular, uma vez que, na ausência de Nefrina, os mioblastos tornam-se incapazes de se fundir aos miotubos nascentes (Sohn et al., 2009).

Findo o processo de fusão, as fibras musculares iniciam a etapa de maturação caracterizada pelo contato com o motoneurônio e pela síntese de enzimas metabólicas e de moléculas contráteis, em especial as diferentes formas de Miosinas de Cadeia Pesada (MHC) que culminarão na formação de fibras com propriedades contráteis diferentes. Tanto o neurônio motor quanto a origem do mioblasto estão associados à especificação das propriedades contráteis das miofibras (Charge & Rudnicki, 2004).

1.2. Morfologia da célula muscular

A fibra muscular esquelética tem cerca de 20 a 100 μm de diâmetro, é uma célula longa, contrátil, multinucleada e constitui a unidade mínima funcional da musculatura esquelética (Bismuth & Relaix, 2010). Esta célula é formada por um conjunto de miofibrilas fundidas com cerca de 2 a 5 μm de diâmetro as quais, por sua vez, compreendem um conjunto de filamentos de proteínas que tem os sarcômeros como unidade (Lange et al., 2006). A repetição de sarcômeros é responsável pela aparência estriada desta célula que possui, ainda, um sistema membranoso de invaginações do sarcolemma para o interior da fibra denominado túbulos T (Squire et al., 2005). O sarcômero é formado por filamentos finos de Actina que se conectam aos filamentos grossos de Miosina em sua porção mediana dando origem à banda A. Os filamentos de Miosina mantêm-se em posição graças à uma estrutura conhecida como banda M, a qual forma o ponto central do sarcômero (Boateng & Goldspink, 2008). Os sarcômeros são delimitados por dois discos Z, de onde partem os filamentos de Actina associados às proteínas regulatórias Troponina e Tropomiosina

(Takahashi & Hattori, 1989). Os discos Z são formados por uma ampla rede de filamentos ordenados, ligações cruzadas e proteínas ancoradas (Clark et al., 2002; Squire et al., 2005) as quais estão, constantemente, em trocas dinâmicas com o *pool* de proteínas citossólicas (Wang et al., 2005). Múltiplas localizações podem ser observadas para várias proteínas sarcoméricas, tanto no sarcômero em si, quanto em outros compartimentos celulares, incluindo o núcleo (Lange et al., 2006). Por abrigar e ancorar uma ampla gama de proteínas adicionais, o disco Z tem sido associado à funções importantes no músculo esquelético, como os eventos de sinalização e alongamento, além de seu papel estrutural (Epstein & Davis 2003; Pyle & Solaro 2004; Frank et al., 2006; Luther, 2009). Os discos Z e a banda M ordenam o sarcômero num plano transversal, enquanto, uma terceira estrutura, a proteína Titina, conecta esses dois componentes no plano longitudinal (Fürst et al., 1988).

A fibra muscular pode ser descrita como um sincício multinucleado com mionúcleos pós-mitóticos localizados periféricamente (Charge & Rudnicki, 2004), envoltos por uma lâmina basal e fibras reticulares do endomísio (Tajbakhsh, 2009). Entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal, encontra-se uma população de células tronco musculares, morfológicamente identificada como células mononucleadas, com núcleo de tamanho reduzido e quantidade aumentada de heterocromatina, e conteúdo de organelas reduzido. Estas células, também denominadas células satélites, são mitoticamente quiescentes e transcricionalmente menos ativas em relação às fibras musculares (Schultz et al., 1978; Snow, 1983). As células satélites originam-se da porção central do dermomiótomo sendo consideradas uma população de células progenitoras já presente nos estágios embrionários (Schienda et al., 2006). Ao final do desenvolvimento fetal, elas assumem sua posição satélite entre a lâmina basal recém formada e a fibra muscular, o que caracteriza a chamada terceira onda miogênica (Relaix et al., 2005; Messina & Cossu, 2009). Essas células coexpressam Pax3 e Pax7, sem, no entanto, expressar marcadores músculo-específicos; mantêm-se num estado proliferativo durante todo o desenvolvimento embrionário e fetal; podem diferenciar-se em fibras musculares ainda durante a embriogênese; e estão presentes como um reservatório de células para o crescimento muscular pré e

pós-natal (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Durante os períodos pré e pós natal do desenvolvimento, as células satélites se dividem lentamente e parte de sua progênie se funde às fibras adjacentes contribuindo, assim, para o crescimento muscular. Ao final do período pós-natal de crescimento, estas células entram numa fase de quiescência sendo ativadas apenas quando o tecido muscular é lesionado (Cossu et al., 2005).

As fibras musculares se organizam em feixes altamente vascularizados formando o fascículo, o qual é envolto por uma membrana de tecido conjuntivo, o perimísio. Diversos fascículos, por sua vez, formam o músculo, o qual é envolto por uma fásia de tecido conjuntivo contígua ao tendão e endósteo, denominada epimísio (Tajbakhsh, 2009) (Figura 3).

As células musculares esqueléticas possuem propriedades morfológicas e bioquímicas distintas (Seed & Hauschka, 1984; Stockdale, 1992) e podem ser classificadas em diferentes tipos de acordo com a isoforma de Miosina de Cadeia Pesada (MHC) que possui (Page, 1992; DiMario & Stockdale, 1997). Em geral, o músculo adulto de um mamífero possui quatro isoformas de MHC, sendo uma isoforma lenta/oxidativa (MHCI) e três isoformas rápidas/glicolíticas (MHCIIa, MHCIIx, MHCIIb). A maturação das fibras musculares nos tipos lento e rápido envolve a ativação de fatores de transcrição e de vários tipos de proteínas como as metabólicas, as contráteis, as proteínas do citoesqueleto e aquelas envolvidas no manejo de cálcio (Zierath & Hawley, 2004). A proporção de cada tipo de fibra no músculo determina sua propriedade contrátil geral. O músculo

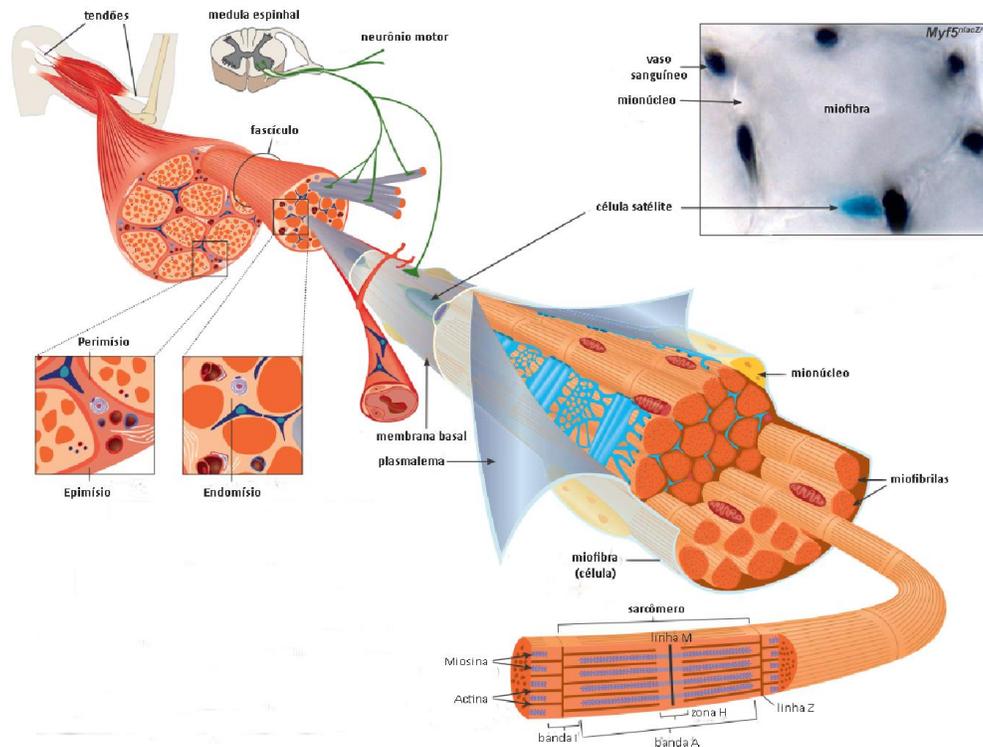


Figura 3. Desenho esquemático mostrando a arquitetura da musculatura esquelética. Retirado de Tajbakhsh (2009).

sóleo, por exemplo, é um músculo de contração lenta, rico em miofibras expressando a Miosina de Cadeia Pesada tipo I; enquanto o músculo plantaris é desprovido de fibra lenta tipo I (Charge & Rudnicki, 2004). As fibras também podem ser híbridas, contendo duas isoformas de MHC diferentes (Staron & Pette, 1993; Schiaffino, 2010).

As células satélites estão presentes em todos os músculos esqueléticos e foram associadas a todos os tipos de fibras musculares. No entanto, a distribuição do número de células satélites difere entre os tipos de fibras, sendo maior nos músculos de fibras predominantemente lentas. Num mesmo músculo, um maior número de células satélites foi associado às fibras lentas quando comparados às rápidas (Gibson & Schultz, 1982; Snow, 1983). Uma maior porcentagem de células satélites é também observada nas junções neuromusculares (Wokke et al., 1989) e adjacentes aos capilares sanguíneos (Schmalbruch & Hellhammer, 1977).

1.3. Fatores envolvidos na diferenciação muscular

Uma ampla gama de moléculas foi associada ao processo de diferenciação dos mioblastos incluindo proteínas secretadas, de matriz extracelular, bem como proteínas relacionadas aos pontos de adesão entre as células (Krauss et al., 2010). Os eventos associados ao processo de diferenciação em casos em que as células atingem confluência corroboram com a hipótese de que moléculas adesivas relacionadas ao contato célula-célula seriam capazes de regular vias de sinalização que influenciam tanto na expressão de proteínas músculo-específicas quanto no alongamento e fusão dos mioblastos. As Caderinas e a superfamília de Integrinas (Ig), por exemplo, são proteínas de membrana relacionadas ao contato célula-célula já associadas à sinalização promiogênica (Kuang et al., 2008; Borghi et al., 2009).

As Caderinas são proteínas transmembranas cujo ectodomínio se liga às Caderinas de células vizinhas, de forma cálcio-dependente, para mediar a adesão célula-célula (Kuang et al., 2008). Em sua porção interna, ela se liga à β -Catenina e indiretamente à α -Catenina, as quais integram o complexo de adesão celular à Actina do citoesqueleto (Borghi et al., 2009). As M-caderinas são expressas nas linhagens musculares incluindo o miótomo e o músculo em desenvolvimento bem como células satélites quiescentes e ativadas durante a miogênese no adulto, e foram associadas à fusão dos mioblastos e expressão de proteínas músculo-específicas (Krauss et al., 2005; Charrasse et al., 2007). Em mioblastos da linhagem C2C12, M-caderina ativa o fator de regulação de fusão Rac1 promovendo a fusão dos mioblastos (Charrasse et al., 2007). N-caderina é expressa durante todo o processo de miogênese, dos progenitores somíticos às miofibras, e foi associada à integridade do dermomiótomo, a determinação miogênica e diferenciação de células musculares (Cinnamon et al., 2006). Em mioblastos *in vitro*, N-caderina mostrou-se capaz de promover a diferenciação dessas células incluindo os eventos de saída do ciclo celular e expressão de proteínas músculo-específicas, tanto por meio do contato natural célula-célula quanto via ectodomínios recombinantes fixados a um substrato sólido ou *beads* (Gavard et al., 2004; Goichberg & Geiger, 1998).

Membros da superfamília Ig associados à adesão célula-célula incluem NCAM, CDO e Neogenina. NCAM é expresso no músculo esquelético durante os processos de desenvolvimento e regeneração bem como em mioblastos *in vitro* (Lyons et al., 1992). A superexpressão de NCAM em células da linhagem C2C12 foi associada ao aumento no processo de diferenciação e à fusão dos mioblastos (Dickson et al., 1990; Peck & Walsh, 1993). CDO é uma proteína de membrana com repetições de Ig e Fibronectina III (FnIII) em seu ectodomínio e uma longa região intracelular que atua como um co-receptor multifuncional em várias vias de sinalização (Bae et al., 2009; Lu et al., 2010). CDO se liga de forma cis à N-caderina nos mioblastos (Lu et al., 2010) levando à fosforilação de substratos que estimulam a expressão, dependente de MyoD, de genes músculo-específicos (Guasconi et al., 2009). De maneira semelhante, Neogenina possui um ectodomínio de repetições Ig e FnIII e uma longa região intracelular, atuando como receptor para duas proteínas orientadoras de axônio, as Netrinas e as moléculas orientadoras por repulsão (RGMs) (De Vries et al., 2008). Neogenina também se liga a CDO de forma cis, o qual atua como co-receptor para Neogenina (Bae et al., 2009). Neogenina é expressa nos somitos e nos músculos esqueléticos em desenvolvimento (Kang et al., 2004; Mawdsley et al., 2004) e sua interação com Netrina foi também associada à ligação célula-célula, sugerindo um papel para essas moléculas na associação de mioblastos (De Vries et al., 2008). O receptor Neogenina, bem como as moléculas orientadoras de axônio Netrina e RGMc foram relacionados à miogênese (Kang et al., 2004; De Vries Cooper, 2008). A super-expressão de Neogenina, bem como o tratamento com Netrina-3, promove a diferenciação miogênica e a formação de miotubos (Kang et al., 2004; Bae et al., 2009). A super-expressão de RGMc em células C2C12 foi também relacionada à diferenciação mioblástica e ao recrutamento destas células para a formação de miotubos (Bae et al., 2009). Entretanto, este efeito foi menos pronunciado quando comparado ao observado para o orientador de axônio Netrina (Kang et al., 2004; Bae et al., 2009).

Em mioblastos primários, a sinalização de Netrina via Neogenina ativa FAK de forma dependente de CDO (Bae et al., 2009). FAK é ativado de forma transiente durante a diferenciação dos mioblastos e a inibição de FAK resulta numa diminuição na fusão dos mioblastos (Quach et al., 2009). Neogenina

também ativa vias adicionais, as quais podem ter papéis na miogênese. Neogenina foi associada à ativação de Rac1 durante a miogênese (Brianchon-Marjollet et al., 2008; Li et al., 2008), o qual é crítico para a fusão dos mioblastos em zebrafish e camundongos (Vasyutina et al., 2009; Srinivas et al., 2007). A ligação de RGMa a Neogenina ativa RhoA/Rho quinase em células do sistema nervoso central (Hata et al., 2006; Conrad et al., 2007). Durante a miogênese, RhoA ativa SRF o qual, estimula a expressão de MyoD e outros genes músculo-específicos *in vivo* e *in vitro* (Carnac et al., 1998; Li et al., 2005). A atividade de RhoA, no entanto, decresce durante a fusão dos mioblastos e a atividade prolongada de RhoA, via expressão de um mutante ativo constitutivamente, resulta na internalização e degradação de M-caderina, a qual regula positivamente a fusão dessas células (Charrasse et al., 2006) (Figura 4).

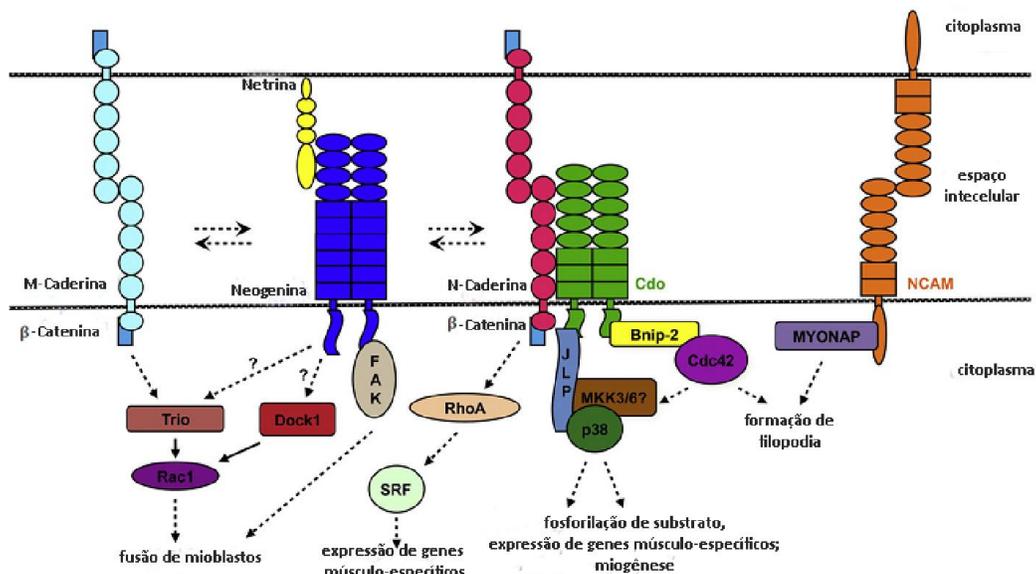


Figura 4. Desenho esquemático das vias de sinalização de Caderina e superfamília Ig. As setas pontilhadas representam interações não diretas ou relacionadas a processos complexos. Os pontos de interrogação representam vias de sinalização observadas em outros tipos celulares que podem ocorrer em mioblastos. Retirado de Krauss et al. (2010).

1.4. Fatores envolvidos na regulação do tamanho da célula muscular

Durante o desenvolvimento, o aumento da massa muscular esquelética depende do *turnover* de proteínas e células (Sartorelli & Fulco, 2004). São os

mecanismos de hipertrofia e atrofia que regulam o tamanho da fibra muscular ainda durante a embriogênese e no início da vida pós-natal (Sandri, 2008). Durante o desenvolvimento embrionário, o *turnover* celular é o principal responsável pelo crescimento da massa muscular. No período pós-natal, a incorporação das células satélites às fibras em crescimento (Moss & Leblond, 1971) concomitantemente a um aumento na síntese de proteínas favorecem o aumento do tamanho do músculo. Por sua vez, na fase adulta, o músculo esquelético é capaz de aumentar ou diminuir sua massa em resposta a uma variedade de fatores ambientais tais como exercício, nutrientes e inanição, bem como em resposta a diversas condições patofisiológicas; todos esses agentes afetam, primariamente, o *turnover* de proteínas na célula muscular (Matsakas & Patel, 2009). Desta forma, o tamanho das células pós-mitóticas é determinado pelo balanço entre o acúmulo de proteínas novas e a degradação das proteínas existentes (Sandri, 2008). No entanto, as células satélites são ativadas na hipertrofia compensatória e a adição de novos núcleos à fibra em crescimento parece ser requerida para a hipertrofia extrema (Schiaffino et al., 1976).

Três mecanismos diferentes foram associados a regulação do tamanho do músculo. O primeiro deles é a adição de novos mionúcleos às miofibras durante os processos de crescimento e regeneração, até aqui descritos como *turnover* celular. O segundo mecanismo está relacionado a um aumento do nível de proteínas musculares devido à supra-regulação das vias de síntese, ocasionando uma resposta hipertrófica na miofibra, o *turnover* de proteínas. Finalmente, o terceiro deles está associado à regulação negativa das vias de atrofia miogênica, a qual é responsável pela manutenção da massa muscular existente prevenindo a degeneração (Otto & Patel, 2010). Duas principais vias de sinalização controlam esses processos positiva e negativamente, são eles: o Fator de Crescimento Semelhante a Insulina 1 (IGF-1) e o Fator de Crescimento e Diferenciação 8 (GDF8), respectivamente, sendo este último também conhecido como Miostatina.

IGF-1 foi associado ao aumento da proliferação de células satélites, diferenciação dos mioblastos e sua subsequente fusão para formação do

miotubo (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993; Coleman et al., 1995). Camundongos *knockout* para IGF-1, bem como seu receptor, apresentaram um retardo no crescimento e uma redução da massa muscular esquelética (Baker et al., 1993; Liu et al., 1993;); enquanto a super-expressão de IGF-1 no músculo esquelético causa uma hipertrofia significativa da miofibrila, aumenta a síntese protéica e a proliferação dos mioblastos (Coleman et al., 1995). Tratamento com IGF-1 leva a um acúmulo de β -Catenina no núcleo, o qual estimula a transcrição do gene de Miosina de Cadeia Pesada IIb (MHC IIb) (Shanely et al., 2009).

A Miostatina atua como um regulador negativo da massa muscular esquelética (McPherron et al., 1997). Camundongos *knockout* para o gene da Miostatina apresentam um aumento de tamanho da massa muscular de 200 a 300%. O mesmo fenótipo pode ser observado quando a Folistatina, um propeptídeo inibidor da Miostatina, é super-expressa ou a forma dominante negativa para o principal receptor de Miostatina, Activina IIB, é empregada (Lee & McPherron, 2001). A inibição da Miostatina pós-natal induz o aumento do tamanho do músculo por meio da hipertrofia da miofibrila, sem, no entanto, afetar a população de células satélites (Amthor et al., 2009). A supra-expressão de Miostatina causa uma grande diminuição nos processos de proliferação e diferenciação celular via indução de p21 e diminuição de Cdk2, concomitante com a redução dos genes para MyoD, Miogenina e Myf5 (Thomas et al., 2000; Langley et al., 2002). Curiosamente, as células satélites expressam Miostatina, a qual atua na indução da quiescência dessa célula por meio da supra-regulação p21 (McCroskery et al., 2003). Miostatina inibe a hipertrofia induzida por IGF-1 e parece estar associada, juntamente com IGF-1, a um mecanismo de *feedback* para o controle da progressão do ciclo celular e da hipertrofia (Morissette et al., 2009).

Os mecanismos de hipertrofia e atrofia são responsáveis pelo controle do tamanho da célula muscular, eles estão intimamente relacionados e são altamente regulados durante a homeostase.

A atrofia pode ser descrita como um decréscimo no tamanho de um tecido ou órgão devido à diminuição do tamanho celular causado pela perda de

contéudo protéico, organelas e citoplasma (Bonaldo & Sandri, 2013). No músculo, o sistema ubiquitina-proteossomo é responsável pela remoção de proteínas sarcoméricas devido a mudanças na atividade muscular provocada por fatores como a inanição ou o desuso da musculatura. A diminuição da massa muscular está associada ao: (1) aumento da ubiquitinação das proteínas musculares; (2) aumento da atividade proteossomal ATP dependente; (3) aumento da quebra de proteínas, a qual, pode ser eficientemente bloqueada pelos inibidores proteossômicos; e (4) supra-regulação de transcritos que codificam a ubiquitina, algumas enzimas conjugadas a ubiquitina e várias subunidades proteossômicas (Lecker et al., 2006). Três proteínas ubiquitina ligases estão diretamente associadas à atrofia muscular: a Atrogina-1, a proteína *Muscle RING Finger 1* (MuRF1) e a Fbxo40. A superexpressão de Atrogina-1 nos miotubos induz a atrofia, enquanto camundongos deficientes para ambos, Atrogina-1 ou MuRF1, são resistentes à atrofia (Bodine et al., 2001). Atrogina-1 promove a degradação de MyoD (Tintignac et al., 2005). MuRF1 interage e controla a meia vida de importantes proteínas estruturais musculares como as Miosinas de Cadeia Pesada (Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007), a proteína C de ligação à Miosina e a Miosina de Cadeia Leve (Cohen et al., 2009). A administração de Miostatina foi relacionada à indução dos genes indutores de atrofia MuRF1 e Atrogina-1 (McFarlane et al., 2006). Fbxo40 regula a meia vida de IRS1, um fator essencial na sinalização de IGF-1/Insulina (Shi et al., 2011).

Outros fatores também foram associados à regulação positiva e negativa do tamanho da fibra muscular. A estimulação da sinalização de Wnt foi associada a uma resposta hipertrófica da célula muscular, ao aumento da proliferação celular e diferenciação dos mioblastos, efeitos sinérgicos aos observados quando do co-tratamento com Insulina (Rochat et al., 2004). A sinalização de BMP via Smad1/5/8 foi relacionado como um dos principais fatores hipertróficos da musculatura esquelética. A inibição da sinalização de BMP causa atrofia muscular, abolindo o fenótipo hipertrófico de camundongos deficientes de Miostatina ao regular, negativamente, o gene que codifica uma Ubiquitina Ligase muscular (Sartori et al., 2013). O receptor Neogenina e os orientadores de axônio Netrina e RGMc estão associados à regulação positiva do

tamanho da célula muscular. Células musculares cultivadas que superexpressam Neogenina, bem como o tratamento com Netrina-2, apresentaram miotubos mais largos com aumento no número total de núcleos, sugerindo um fenótipo hipertrófico dessas células pela incorporação de novos núcleos (Kang et al., 2004). Camundongos homozigotos apresentando mutação do gene que codifica a Neogenina apresentam miotubos menores com menor quantidade de núcleos. Esses defeitos foram associados a baixos níveis das formas ativadas das quinases FAK e ERK e a ineficiente expressão de Miogenina (Bae et al., 2009). Fenótipos semelhantes foram observados para os ligantes de Neogenina, Netrina e RGMc (Bae et al., 2009).

1.5. Orientadores de Axônios

Curiosamente, dentre as moléculas chave associadas ao programa miogênico e regulação do tamanho da fibra muscular estão algumas proteínas conhecidas como orientadores de axônio. As moléculas orientadoras de axônio são proteínas que guiam o crescimento axonal e migração de neurônios durante o desenvolvimento embrionário. As moléculas orientadoras de axônio são classificadas como positivas, aquelas capazes de atrair o crescimento axonal para determinada região por meio da polarização da atividade protrusiva (como as Netrinas e Efrinas), e negativas, orientadores que repelem o crescimento axonal inibindo a atividade protrusiva do cone de crescimento em suas proximidades (como as Semaforinas, as Robo e as RGMs) (Monnier et al., 2002; Gallo & Letourneau, 2004; Mueller et al., 2006). Há ainda moléculas orientadoras capazes de exercer ambos os papéis, atrativo e repulsivo. Em vertebrados, Netrina-1 e -2 são capazes de promover respostas atrativas por meio da ativação de Cdc42 e Rac1 via ligação com os receptores DCC e Neogenina (receptor homólogo a DCC). As Netrinas também são capazes de induzir respostas repulsivas via ligação com UNC-5 (Hong et al., 1999; Merz et al., 2001). A Semaforina 3A também pode sofrer uma conversão de seus efeitos repulsivos para atrativos mediante interações específicas da Laminina-1 e a Neuropilina-1 (Castellani et al., 2002).

Os Orientadores de Axônio por Repulsão RGMs são classificados como moléculas orientadoras de axônio negativas. As RGMs são glicoproteínas de membrana com atividade repulsiva, capazes de induzir o colapso do cone de crescimento. Após endereçamento para a membrana citoplasmática, essas moléculas podem sofrer a ação de fosfolipases e proteases e serem secretadas para a matriz extracelular (Kuninger et al., 2006). Essas moléculas foram primeiramente descritas em embriões de galinha durante o direcionamento dos axônios temporais da retina (Müller et al., 1996). Nesse contexto, as RGMs são responsáveis pela repulsão dos axônios temporais da retina da porção posterior para a porção anterior do teto óptico, determinando, assim, seu correto posicionamento topográfico (Müller et al., 1996; Monnier et al., 2002). As RGMs possuem um domínio N-terminal apresentando um peptídeo sinal de direcionamento para o retículo endoplasmático; um motivo tri-aminoácido (Arg-Gly-Asp) RGD, possivelmente associado à adesão celular; um domínio parcial do Fator von Willebrand tipo D, o qual inclui um sítio de clivagem catalítico; e uma região C-terminal apresentando uma âncora glicosofatidilinositol (GPI) (Monnier et al., 2002; Samad et al., 2004) (Figura 5).

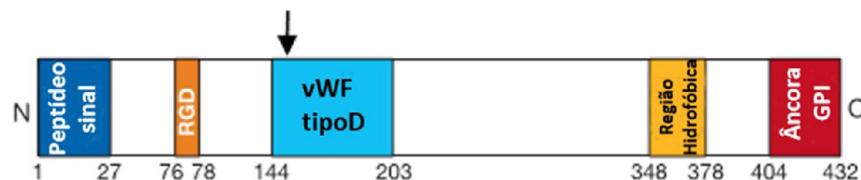


Figura 5. Desenho esquemático dos domínios proteicos dos membros da família RGM. A seta mostra o sítio de clivagem proteolítico. A sigla vWF representa o Fator von Willebrand. O motivo RGD está presente apenas nos membros a e c. Retirado de Monnier et al. (2002).

As RGMs compreendem uma família de proteínas composta por quatro membros: RGMa; RGMb (também conhecido como DRAGON); RGMc (Hemojuvelin, HJV, HFE2); e RGMd. RGMa foi o primeiro membro desta família a ser identificado (Monnier et al., 2002). Posteriormente, devido às similaridades apresentadas em suas sequências de aminoácidos (50-60%), os demais membros dessa família foram determinados (Papanikolaou et al., 2004; Babbitt et al., 2005).

RGMa é predominantemente expresso no sistema nervoso central de vertebrados (Niederkofler et al., 2004; Oldekamp et al., 2004; Schmidtmer & Engelkamp, 2004; van den Heuvel et al., 2013) sendo também expresso em tecidos não neurais como o epitélio coclear, primórdios do pulmão, membros (Oldekamp et al., 2004), intestino (Metzger et al., 2005), coração, fígado, pele, testículo (Babitt et al., 2005), em células mesenquimais localizadas ao redor do gânglio da raiz dorsal, e somitos (dermomiótomo, miótomo e células musculares pioneiras) (Jorge et al., 2012). RGMa foi associada a diversos papéis no sistema nervoso, incluindo: a organização espacial dos tratos axonais no cérebro, em especial, na topografia retino-tectal (Monnier et al., 2002; Tassew et al., 2008); a orientação de axônios (Matsunaga et al., 2006; Kubo et al., 2008; Endo & Yamashita, 2009); a diferenciação das células neuronais (Matsunaga et al., 2006; Lah & Key, 2012); a sobrevivência de neurônios (Matsunaga et al., 2004); ao fechamento do tubo neural (Niederkofler et al., 2004); a inibição da regeneração axonal do sistema nervoso central após lesão da medula espinhal (Hata et al., 2006; Kitayama et al., 2011); a regulação dos processos de diferenciação dos neurônios entéricos (Metzger et al., 2007); a inibição da regeneração do neurito e recuperação da função em casos de isquemia cerebral (Feng et al., 2012; Kong et al., 2013); e à melhoria na formação de sinapses aferentes com células pilosas auditivas (Brugeaud et al., 2013). Para exercer seus efeitos, RGMa se liga ao receptor Neogenina, receptor comum ao membro c desta família (Kang et al., 2004) e ao orientador de axônio Netrina (Rajagopalan et al., 2004) (Figura 6).

Neogenina é expressa no sistema nervoso central, nas células da crista neural em migração, olhos e somitos (Gessert et al., 2008; Jorge et al., 2012; van den Heuvel et al., 2013). Neogenina contém quatro imunoglobulinas semelhante a IgG e seis domínios semelhante a Fibronectina tipo III (FN III) em sua porção extracelular. Ambas, Netrina-1 e RGMa se ligam ao domínio FN III, no entanto, RGMa apresenta uma maior afinidade de ligação a Neogenina quando comparada à ligação de Netrina a este receptor (Rajagopalan et al., 2004; Geisbrecht et al., 2003). O sítio de ligação para Neogenina está presente entre os domínios vWD e hidrófobo da região C-terminal da molécula de RGMa, mais precisamente, entre os aminoácidos 259 e 295 (Itokazu et al., 2012). O

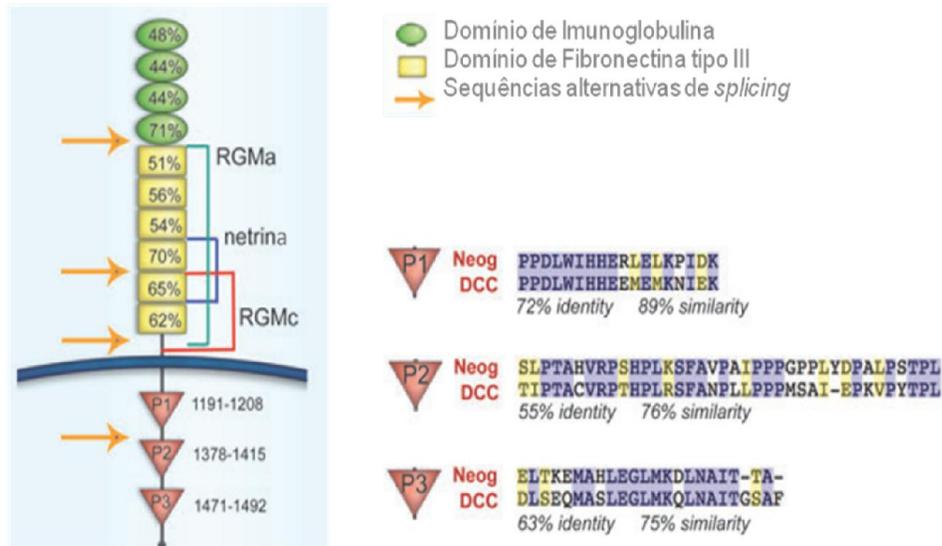


Figura 6. Desenho esquemático do receptor Neogenina com seus sítios de ligação para RGMa, Netrina e RGMc. Retirado de De Vries & Cooper (2008).

processamento de RGMa é extremamente complexo, as clivagens autocatalítica e proteolítica, por meio da ação das enzimas SKI-1 e Furina, originam sete formas diferentes desta proteína, quatro formas ancoradas à membrana (33 kDa, 37 kDa e duas formas de 60 kDa) e três solúveis (60 kDa e duas formas de 30 kDa, apresentando, ainda, glicosilações), todos estes produtos, mesmo sem nenhuma homologia na sequência, se ligam ao mesmo domínio 3-4 da Fibronectina III no receptor Neogenina (Tassew et al., 2012). Na orientação do axônio, a ligação RGMa/Neogenina é responsável por mediar a ativação de RhoA GTPase e a via de sinalização Rho Quinase (ROCK) e PKC (Schaffar et al., 2008). ROCK, por sua vez, fosforila a Miosina IIA, promove a despolimerização de F-Actina e a retração do neurito e/ou inibição do crescimento (Kubo et al., 2008). RGMa também foi associado, via FAK, à fosforilação de LARG, um fator de troca de nucleotídeo guanina capaz de regular a ativação de RhoA (Hata et al., 2006). Os efeitos mediados por RGMa na cascata de sinalização de FAK, LARG, ativação RhoA e o colapso do cone de crescimento foram também relacionados à associação da Neogenina ao co-receptor UNC5B (Hata et al., 2009) (Figura 7). A regulação da sensibilidade dos neurônios a RGMa foi associada à enzima TACE, uma proteína transmembrana desintegrina e metaloprotease envolvida na quebra do domínio extracelular de Neogenina (Okamura et al., 2011).

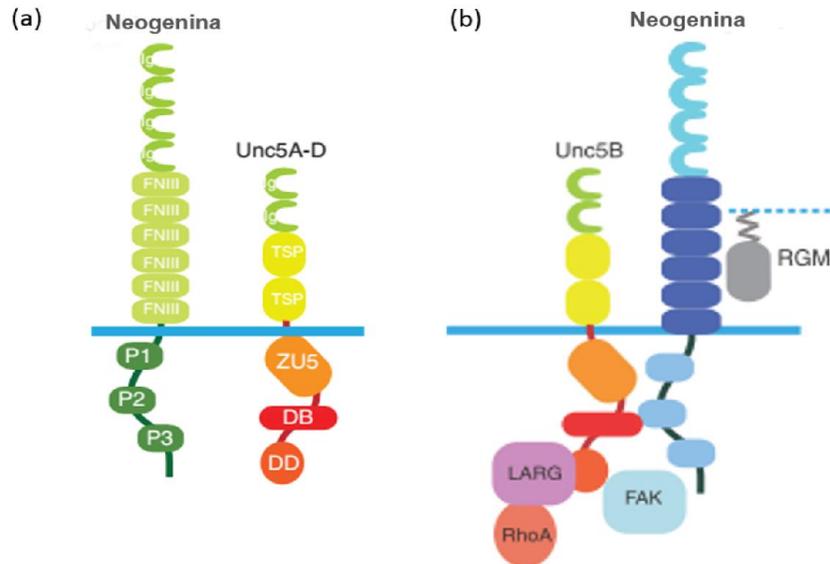


Figura 7. Desenho esquemático dos receptores Neogenina e UNC5, e as principais moléculas associadas à via de interação de RGMa/Neogenina/UNC5B. DB, domínio de ligação a DCC; DD, domínio *death*; Ig, domínio Imunoglobulina; FNIII, Fibronectina tipo III; ZU5, domínio homólogo ao da Zona de Oclusão 1. Retirado de Rajasekharan & Kennedy (2009).

RGMa também atua como co-receptor na sinalização de BMP (Babitt et al., 2005). As BMPs são membros da superfamília de Fatores de Crescimento Transformadores β (TGF- β) responsáveis por regular diversos processos fisiológicos (Shi & Massagué, 2003). As BMPs se ligam aos receptores tipo I (BMPRIA/ALK3, BMPRIB/ALK6, e ALK2) e receptores tipo II (BMPRII, Activina IIA/ActRIIA, e Activina IIB/ActRIIB) ativando a via de sinalização de Smads 1, 5 e 8. Uma vez fosforiladas, as Smad1/5/8 formam complexos heteroméricos ativados com Co-Smad e Smad 4 e se movem para o núcleo onde atuam como reguladores transcricionais para modular a expressão gênica (ten Dijke et al., 2003). Um dos principais alvos para a sinalização de BMP é o gene Inibidor de Diferenciação (Id) responsável por regular os processos de crescimento e diferenciação numa variedade de tecidos (Hollnagel et al., 1999; Miyazono & Miyazawa, 2002; López-Rovira et al., 2002). RGMa forma um complexo com os receptores de BMP tipo I (ALK3 e ALK6), liga-se à BMP-2 e BMP-4, facilitando a associação deste complexo ao receptor tipo II (ACTRIIA e BMPRII) ativando, assim, a via de sinalização de Smads 1/5/8 que culminará na indução da

proteína Id1 endógena em neurônios (Babitt et al., 2005; Xia et al., 2007) (Figura 8).

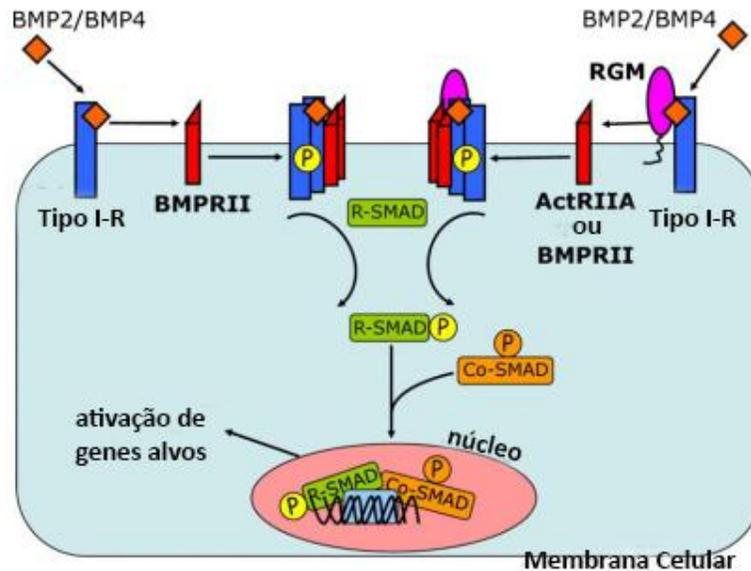


Figura 8. Desenho esquemático da associação de BMP aos receptores tipo I e tipo II sem e com a utilização de RGM como co-fator. Tipo I-R: receptor tipo I. BMPRII ou ActRIIA: receptor tipo II. P: fosforilação do substrato. R-SMAD: SMAD 1, SMAD 5 e SMAD 8. Co-SMAD: SMAD 4. Retirado de Corradini et al. (2009).

RGMb, também conhecido como DRAGON, foi primeiramente identificado durante o mapeamento de genes com promotores regulados pelo fator de transcrição homeobox DRG11, no gânglio da raiz dorsal (Samad et al., 2004). Esse orientador de axônio é expresso no sistema nervoso central e periférico, de forma complementar a RGMa, e em tecidos não neurais como o epitélio nasal, trato digestivo, condensações cartilaginosas dos discos intervertebrais, esterno, membros (Oldekamp et al., 2004; Schmidtmer & Engelkamp, 2004; van den Heuvel et al., 2013), somitos (miótomo e células musculares pioneiras), e na porção dos arcos faríngeos que dará origem a musculatura branquiomérica (Jorge et al., 2012). RGMb promove a adesão de neurônios do gânglio da raiz dorsal (Samad et al., 2004); inibe o crescimento do neurito e é induzido em lesões do sistema nervoso central, de forma similar a RGMa (Liu et al., 2009); potencializa a sinalização de BMP; promove o fenótipo

neuronal e inibe a diferenciação das células da crista neural (Samad et al., 2005). No entanto, camundongos *knockout* para RGMB morrem três dias após o nascimento sem defeitos aparentes nas funções sensoriais e motoras e no desenvolvimento do sistema nervoso (Mueller et al., 2006). RGMB é expresso no trato reprodutivo e foi associado à modulação da sinalização de BMP nessas células (Xia et al., 2005). RGMB foi o primeiro co-receptor de BMP identificado, assim como RGMA, este orientador de axônio, quando ancorado à membrana, se associa aos receptores tipo I (ALK2, ALK3 e ALK6) e tipo II (ActRIIA e ActRIIB), se liga seletivamente a BMP-2 e BMP-4 ativando a via de sinalização de Smads 1/5/8 e induzindo, assim, a sinalização de BMP (Samad et al., 2005). Em contrapartida, a forma secretada de RGMB inibe a sinalização de BMP em células C2C12, possivelmente por meio de sua associação aos ligantes de BMP, prevenindo seu acesso aos receptores tipo I e II de forma similar a Noggin, um antagonista de BMP, suprimindo as atividades de ALP (Fosfatase Alcalina) e do promotor Id1 (Kanomata et al., 2009). RGMB também é capaz de se ligar ao receptor Neogenina e esta interação parece estar associada à migração neuronal no giro denteado do hipocampo (Conrad et al., 2010).

Ao contrário dos membros a e b da família de orientadores de axônio por repulsão, RGMc, também conhecido como Hemojuvelina (HVJ), não foi associado aos tecidos neurais. Essa molécula é expressa nos músculos esqueléticos, fígado, ossos e cartilagem (Schmidtmer & Engelkamp, 2004; Samad et al., 2004; Niederkofler et al., 2004; Papanikolaou et al., 2004; Rodriguez et al., 2007; Kanomata et al., 2009). RGMc apresenta um papel primordial na modulação de Hecpídina, um peptídeo hepático responsável por controlar os processos de absorção intestinal de ferro e sua reciclagem nos macrófagos, regulando, assim, a homeostase do ferro no organismo (Ganz, 2003). A Hecpídina promove uma diminuição do exportador de ferro Ferroportina na superfície dos enterócitos duodenais, macrófagos e hepatócitos inibindo a liberação desse íon advindo da dieta e dos estoques dos macrófagos para a corrente sanguínea (Nemeth et al., 2004). Mutações no gene que codifica RGMc causa uma diminuição, ou até mesmo ausência, nos níveis de Hecpídina, esta condição gera um acúmulo de ferro em diversos tecidos como coração, fígado, músculo esquelético, glândulas endócrinas, ligamentos e células da

pele; ocasionando uma doença conhecida como hemocromatose hereditária (Pietrangelo, 2007). RGMc pode ser encontrado em diferentes formas: duas formas ligadas à membrana sendo uma de cadeia única, completa, de ~50 kDa e a outra heterodimérica composta por dois fragmentos (20 kDa N- and 35 kDa C-terminal) ligados por ponte dissulfeto; e duas formas solúveis, secretadas, de cadeia única, diferencialmente glicosiladas de 50 e 40 kDa, resultantes de clivagem na região C-terminal da forma completa de RGMc pela ação de enzimas pro-proteína convertases como a Furina (Kuninger et al., 2006; Silvestri et al., 2008; Kuninger et al., 2008, Lin et al., 2008). As formas de RGMc, ancorada à membrana e secretada, desempenham diferentes papéis na regulação da homeostase do ferro. RGMc ancorada à membrana atua como um co-receptor para BMP, o qual, regula positivamente a transcrição de Hpcidina nas células hepáticas através da sinalização via receptores de BMP tipo I ALK2, ALK3 e ALK6, tipo II BMPRII e ACTRIIA e, intracelularmente, via Smads, sendo BMP-2, BMP-4 e BMP-6 os principais ligantes (Babbitt et al., 2006; Xia et al., 2008). Em contrapartida, a forma secretada de RGMc antagoniza a via de sinalização de BMP removendo os efeitos positivos da forma ancorada por meio da interação ao ligantes de BMP prevenindo a associação dessas moléculas a seus receptores (Lin et al., 2005; Babbitt et al., 2007; Andriopoulos et al., 2009), de forma que, deficiências de ferro aumente os níveis de RGMc secretada (Zhang et al., 2007) e a sobrecarga de ferro reduza a síntese desta molécula (Lin et al., 2005; Silvestri et al., 2008). RGMc também se liga ao receptor Neogenina e esta interação é imprescindível para a indução da expressão de Hpcidina por BMP4, e para mediar a secreção de RGMc pela célula (Zhang et al., 2009). Os aumentos nos níveis de ferro intracelular induzidos pela forma ancorada de RGMc é dependente de Neogenina nas células (Zhang et al., 2005). No entanto, a ligação da forma ancorada de RGMc à Neogenina e BMP2/BMP4 é responsável pela clivagem de RGMc e secreção desta proteína (Zhang et al., 2007).

RGMd foi encontrando apenas em peixes teleósteos e nenhuma função foi associada a esta molécula até o momento (Camus & Lambert, 2007).

A importância biológica da associação entre o sistema nervoso e o muscular vai além da indução do movimento: moléculas produzidas pelas células nervosas também causam efeitos sobre a formação dos miotubos; o tamanho das fibras; e também sobre a determinação da identidade das fibras musculares (Kang et al., 2004; Bae et al., 2009). No entanto, os estudos funcionais disponíveis até então que relacionam as RGMs à musculatura esquelética têm se concentrado no membro c desta família, uma vez que RGMc é conhecido como a forma muscular dentre as RGMs. No entanto, a análise do padrão de expressão de *RGMa* e *RGMb* durante o desenvolvimento de embriões de galinha tem sugerido que estes “membros neurais” podem também estar envolvidos na miogênese. *RGMa* e *RGMb* foram detectados fora do sistema nervoso, especialmente nos somitos (Jorge et al., 2012). Transcritos de *RGMa* foram detectados nos domínios do somito conhecidos como o sítio de origem das células pioneiras da musculatura esquelética e células tronco musculares e, posteriormente, no miótomo; enquanto transcritos de *RGMb* foram observados em sítios de sobreposição de células musculares diferenciadas (Jorge et al., 2012). Transcritos de *RGMa* e *RGMb* foram também detectados em mioblastos indiferenciados e em miotubos diferenciados da linhagem C2C12 (Kanomata et al., 2009). A análise do padrão de expressão entre tecidos adultos (cérebro, pele, fígado, coração e musculatura esquelética), realizado em um microarranjo contendo 4.5K transcritos de galinha músculo-associados, revelou *RGMa* como preferencialmente expresso na musculatura esquelética peitoral de *Gallus gallus*, dados que foram confirmados por PCR quantitativo (Jorge et al., 2010).

Estes achados corroboraram com a hipótese de que *RGMa*, assim como *Netrinas*, *RGMc* e *Neogenina*, esteja associada aos processos de diferenciação e regulação do tamanho das células musculares esqueléticas, função que não foi comprovada até o momento.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo investigar a presença das moléculas orientadoras de axônios por repulsão (RGMa, RGMB e RGMc) na musculatura esquelética adulta e caracterizar a função *in vitro* de RGMa nas células musculares esqueléticas de camundongos

2.2. Objetivos específicos

1. Imunolocalizar RGMa, RGMB e RGMc nas células musculares esqueléticas adultas, utilizando camundongos como modelo;
2. Co-localizar as RGMs, na musculatura adulta, com proteínas musculares esqueléticas conhecidas (Distrofina, Desmina, Titina e Miosinas de Cadeia Pesada);
3. Identificar, por *western blot*, as formas de peptídeos para RGMa produzidos na musculatura esquelética de camundongos adultos;
4. Investigar a função biológica *in vitro* de RGMa, utilizando vetores para promover a super-expressão e o *knockdown* (siRNA) destes transcritos em mioblastos de camundongos (linhagem C2C12 e cultura de células primárias), e verificar os efeitos sobre a morfologia celular e no processo de diferenciação celular.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Camundongos machos da raça *Swiss* (60 dias de idade; peso: ± 30 g) foram obtidos do biotério central da universidade (CEBIO/UFMG) e armazenados em gaiola mantida com temperatura e umidade controlados em ciclo de luminosidade claro/escuro de 12:12 h. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Neonatos machos *Swiss* de 3 dias de idade foram obtidos do biotério central da Universidade (CEBIO) e utilizados imediatamente para a extração de células primárias. Camundongos machos adultos foram utilizados para a técnica de imunomarcção. Os sacrifícios foram realizados por sobredose anestésica utilizando a associação Cetamina/Xilazina (80mg de cetamina + 15mg de xilazina, ambas/kg), por via intraperitoneal. Todos os procedimentos foram conduzidos conforme instruções da comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG, processo 18/2011), e as leis brasileiras para uso de animais em experimentação científica.

3.2. Imunolocalização das RGMs e proteínas musculares conhecidas na musculatura adulta de camundongos

A imunolocalização das RGMs e proteínas musculares esqueléticas conhecidas foi realizada em cortes transversais e longitudinais dos músculos quadríceps, sóleo e EDL (extensor longo dos dedos) dos membros inferiores. Um total de cinco camundongos adultos da raça *Swiss*, com cerca de 60 dias de idade, foram utilizados. Estes músculos foram especificamente escolhidos devido às diferenças existentes entre os tipos de fibras que apresentam sendo: quadríceps, apresentam fibras predominantemente rápidas dos tipos IIa e IIb (Saltin et al., 1977); sóleo, apresentam fibras predominantemente lentas do tipo I; e EDL sendo considerado um músculo híbrido (Schiaffino et al., 1970). As marcações para as RGMs foram, portanto, realizadas nos três músculos citados.

No entanto, por apresentarem resultados semelhantes independente do músculo utilizado, as imagens mais representativas foram utilizadas para cada marcação analisada.

As amostras foram coletadas em isopentano e nitrogênio líquido e imediatamente armazenadas em ultrafreezer. Para os procedimentos de criosecção, os músculos foram embebidos em O.C.T. (Tissue-Tek) a -30 °C e cortados em secções de 6 µm em criostato (Bright 5030). Após bloqueio com TBS contendo 0,01% Tween 20 e caseína (TBS-TC), as secções foram incubadas com anticorpo primário (todos diluídos 1:100 em PBS), *overnight* a 4 °C. Os anticorpos foram usados como se segue: RGMa, cabra policlonal IgG contra o domínio C-terminal (Santa Cruz Biotechnology); RGMa, coelho policlonal IgG contra o domínio N-terminal (Abcam); RGMb, coelho policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology); RGMc, coelho policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology). Após lavar com TBS-TC, as secções foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente diluído em PBS na proporção de 1:800 por 90 min a temperatura ambiente (TA). Os anticorpos secundários utilizados foram: Alexa Fluor 555 coelho anti-cabra IgG (vermelho) e Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho IgG (verde), ambos da Invitrogen.

Para confirmar a localização: (1) das RGMs na membrana das células musculares esqueléticas, e (2) de RGMa também no sarcoplasma destas células, dupla marcações foram realizadas e as imagens co-localizadas. As co-localizações realizadas foram: RGMa/Desmina, RGMa/Titina, RGMa/Distrofina, RGMa/MHCI, RGMa/MHCIIa, RGMa/MHCIIb; RGMb/Distrofina e RGMc/Distrofina. Para estes experimentos, após a incubação com o anticorpo secundário descrito anteriormente, as secções foram bloqueadas com 4% BSA/1% soro normal de cabra/0,1% Tween 20 em PBS por 1 h. Os anticorpos primários Titina (camundongo monoclonal IgM, Hybridoma Bank); Desmina (rato monoclonal IgG1/K, Cell Marque), Miosina de Cadeia Pesada tipo I (camundongo monoclonal IgG1, Hybridoma Bank), Miosina de Cadeia Pesada tipo IIa (camundongo monoclonal IgG2b, Hybridoma Bank), Miosina de Cadeia Pesada tipo IIb (camundongo monoclonal IgM, Hybridoma Bank) e Distrofina (camundongo monoclonal IgG2a 1:100, Hybridoma Bank) foram diluídos a 1:100 em solução

de bloqueio em PBS, *overnight* a 4 °C. A incubação com o anticorpo secundário foi realizada na proporção de 1:500 diluído em PBS, por 1 h a TA, sendo utilizados os seguintes anticorpos: Alexa Fluor cabra anti-camundongo 488 IgG, IgM (Life Technologies), Alexa Fluor cabra anti-camundongo 488 IgG1 (Life Technologies), Alexa Fluor cabra anti-camundongo 555 IgM (Life Technologies), Alexa Fluor jumento anti-camundongo 555 IgG (Life Technologies) e Alexa Fluor cabra anti-camundongo 350 IgG2b (Life Technologies). As lâminas foram montadas com glicerol 90% diluído em PBS.

Para os experimentos de imunohistoquímica, o músculo esquelético de três camundongos machos adultos foi fixado por perfusão vascular, utilizando Metanol 80%/DMSO 20%. Para tanto, após uma injeção de heparina (125 UI/kg) intraperitonealmente, para inibição da formação de coágulos, os animais foram anestesiados utilizando a associação de Cetamina/Xilazina (80mg de cetamina + 15mg de xilazina, ambas/kg) e a cavidade torácica foi aberta para acesso ao ventrículo esquerdo e introdução da agulha até a canulação da aorta. Os órgãos foram perfundidos por 30 min, após os quais, os músculos quadríceps, sóleo e EDL foram removidos, colocados em solução fixadora de Metanol 80%/DMSO 20% gelado e levados a ultrafreezer por 7 dias. Após uma semana, as amostras foram descongeladas gradativamente, passando por temperaturas iguais a -20 °C e 4 °C, ambas *overnight*, passando por uma série graduada de álcoois (70%, 80%, 90%, 100%), por 30 min cada, sendo o primeiro utilizado a 4 °C. As amostras passaram, então, por três banhos consecutivos de xilol, 20 min cada, e foram levados à estufa a 58 °C para realização de três banhos de parafina, por 20 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram incluídas em blocos contendo parafina. Secções de 6 µm foram cortadas em micrótomo (Histoline MRS3500) e passaram por dois banhos de xilol de 10 minutos cada para desparadinização e hidratação com uma série decrescente de álcoois (100% Etanol: 2 vezes, 5 min cada; 90% Etanol: 2 vezes, 5 min cada; e 70% Etanol: 5 min) e água destilada (5 min). O bloqueio da Peroxidase endógena foi realizado utilizando 2 banhos de 15 min cada de peróxido de hidrogênio 10 volumes. Os cortes foram lavados com 0,1% Tween 20/PBS por 5 minutos e o bloqueio realizado com BSA 2% + Tween 20 0,1% por 1 h a temperatura ambiente. Os anticorpos primários C-RGMA e N-RGMA foram diluídos em BSA 0,2% e incubados *overnight* a 4 °C. O kit

LSAB (Dako) foi utilizado na incubação com o anticorpo secundário (anti-camundongo, anti-cabra e anti-coelho biotinizados) por 30 min a temperatura ambiente e o conjugado Estreptavidina-HRP por 30 min a temperatura ambiente. A revelação foi realizada utilizando o reagente Diaminobenzidina (DAB) (Dako) e a contra-coloração obtida por meio da aplicação de Hematoxilina de Harris por 1 minuto. A desidratação final foi feita utilizando banhos consecutivos de álcoois (2 banhos de Etanol 70 %; 1 banho de Etanol 90% por 5 min cada e três banhos de Etanol 100 %, sendo o primeiro de 5 min e os dois últimos de 10 min). A diafanização foi realizada utilizando Xilol I (5 min) e Xilol II (10 min) e a montagem com Entelan.

3.3. Cultivo dos mioblastos da linhagem C2C12 e células primárias

Os mioblastos da linhagem C2C12 foram obtidos em colaboração, armazenados em ultrafreezer e descongelados em 2 mL de meio de crescimento [MC: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com alta concentração de glicose, L-glutamina (Gibco, Life Technologies), suplementado com soro fetal bovino 10% (Cripion Biotechnology), e 1% de solução de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Gibco, Life Technologies)] previamente aquecido a 37°C. As células foram então centrifugadas por 5 min a 184 G e plaqueadas em garrafas T25. As células foram cultivadas em meio de crescimento a 37°C e 5% CO₂. Embora a fusão de mioblastos em miotubos diferenciados ocorra com a remoção do soro do meio (meio de diferenciação, MD), as células C2C12 começam a se diferenciar quando atingem confluência, mesmo em MC. Por isso, as células foram soltas por digestão com Tripsina quando atingiam 70% de confluência. Para a passagem de células, o meio de crescimento foi removido e a garrafa lavada com PBS. As células foram incubadas com Tripsina 0,5% por 3 min a 37 °C e 5% de CO₂. A solução de Tripsina contendo as células foi removida e 3 mL de meio de crescimento foram acrescidos. As células foram então centrifugadas por 4 min a 184 G, ressuspendidas em meio de crescimento, contadas e replaqueadas na densidade de 4x10⁴ células/poço. A passagem das células ocorreram a cada dois dias.

Foram realizadas quatro passagens antes da utilização destas células nos experimentos aqui descritos.

Para a indução da diferenciação muscular, o MC foi trocado por meio de diferenciação [MD: DMEM com alta concentração de glicose (Gibco, Life Technologies), contendo soro de cavalo 2% (Gibco, Life Technologies)] e as células incubadas nas mesmas condições, por 3, 5 e 8 dias. O meio foi trocado a cada dois dias.

Para a cultura primária, os músculos dos membros inferiores foram coletados de cinco camundongos *Swiss* machos com idade de 3 dias em DPBS (Gibco, Life Technologies) suplementado com 1% de solução de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Gibco, Life Technologies) e 1% gentamicina (Sigma-Aldrich). Após a remoção dos tecidos conjuntivo e adiposo, as amostras de músculo dos cinco animais utilizados foram misturadas, formando um *mix* de células, as quais, foram dissociadas por digestão com Colagenase I (Life Technologies) associado ao método mecânico, em banho-maria sob agitação a 37 °C, durante 45 min; seguido por uma digestão complementar com Tripsina 0,25%, por 30 min em banho-maria sob agitação a 37 °C. As células primárias foram plaqueadas em garrafas T25 em meio de crescimento [DMEM com baixa concentração de glicose, L-glutamina (Gibco, Life Technologies), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cripion Biotechnology), 1% de solução de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Gibco, Life Technologies) e 1% de gentamicina (Sigma-Aldrich)], a 37 °C e 5% de CO₂. Quatro passagens foram realizadas conforme descrito para as células C2C12. As tripsinizações foram utilizadas para o enriquecimento da cultura em mioblastos. Após a quarta passagem, as células foram cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 2x10⁴ células em meio de crescimento, em Matrigel (BD Biosciences), diluída na proporção de 1:50 em PBS, e mantidas sob condições padrões. A indução da diferenciação foi conduzida como descrita para a linhagem celular C2C12.

3.4. Western Blot

As *western blots* foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG. Para os tecidos adultos, amostras de 300 mg de cérebro e músculo esquelético dos membros inferiores foram obtidas de três camundongos adultos *Swiss* machos. As amostras de cérebro foram utilizadas como controle positivo. Para as células primárias, amostras de 8×10^4 células foram incubadas em placas de 12 poços e coletadas nos períodos de 3 dias em meio de crescimento; 3, 5 e 8 dias em meio de diferenciação; e 5 dias após a transfecção de mioblastos primários. Todas as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de PBS na presença de inibidores de protease (NaCl 0,9% contendo inibidores de protease, Sigma-Aldrich). Os inibidores de protease utilizados foram: Fluoreto Fenilmetano Sulfonil (Sigma-Aldrich), Pepstatina A (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich), E-64 {*N*-[*N*-(*L*-3-*trans*-carboxiirano-2-carbonil)-*L*-leucil]-agmatina;[1-[*N*-[(*L*-3-*trans*-carboxioxirane-2-carbonil)-*L*-leucil]amino]-4-guanidinobutano]} (Sigma-Aldrich) e ortovanato de sódio (Sigma-Aldrich). Após a sonicação, os lisados foram centrifugados a $14.000 \times g$ por 30 min, o sobrenadante foi diluído 1:2 em solução de SDS 10% (Sigma-Aldrich) glicerol, β -mercapetanol e azul de bromofenol 10% em tampão Tris 0,5 M (pH 6,8) e fervido em banho-maria a 100°C por 5 min. Alíquotas de 20 μL de cada proteína foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-poliacrilamida desnaturada 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) a 100 mA por 75 min. O bloqueio foi realizado com TBS (Tris Buffered Saline) contendo Tween 20 0,01% e Caseína (TBS-TC) por 30 min. A incubação com os anticorpos primários contra RGMa C-terminal (cabra policlonal 1:500, Santa Cruz Biotechnology), RGMa N-terminal (coelho policlonal 1:500, Abcam), e β -Actina (camundongo monoclonal 1 :5000, Santa Cruz Biotechnology) foram realizadas por 120 min a TA. Após lavar com PBS, as membranas foram incubadas por 1 h com os anticorpos secundários biotinizados anti-cabra, anti-coelho e anti-mouse (IgG) (1:1000) (Abcam), respectivamente, seguidos pela incubação com solução de estreptavidina-HRP (Thermo Fisher Scientific) por 15 min a TA. A revelação foi realizada com 3,30-

diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich), cloranfenicol (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio 35% (Sigma-Aldrich) por 1 min a TA. As imagens foram obtidas usando um *scanner* Epson Perfection 4990 (Epson).

3.5. Super-expressão e *knockdown* de RGMa por RNA de interferência (siRNA) *in vitro*

RGMa de camundongo possui 80% de identidade de aminoácidos em relação à RGMa de galinha, em contrapartida, RGMB e RGMc de camundongos têm uma relação mais distante com os mesmos membros para as RGMs em galinha, compartilhando, respectivamente, 64% e 54% de identidade de aminoácidos (Camus & Lambert, 2007).

Desta forma, a super expressão de RGMa foi obtida, anteriormente, a partir da clonagem da região codificadora de RGMa de *Gallus gallus* (GenBank número de acesso: AY128507) em plasmídeo bicistrônico pCAB-RGMa-IRES-eGFP (Alvares et al., 2003), entre os sítios restrição *Clal* e *EcoRI*. Para os experimentos controle, o vetor vazio foi usado.

O RNA de interferência para promover o *knockdown* de RGMa (siRNA-RGMa) e os controles foram clonados em pSilencer 1.0 U6 (Ambion) e obtidos em colaboração com o Dr. Alain Chédotal (Centre de Recherche Institut de la Vision, Paris, França). No entanto, os vetores doados não apresentavam o gene repórter, o que impossibilitaria a identificação das células transfectadas em cultura. Dessa forma, foi necessário promover a sub-clonagem da sequência contendo o promotor U6 associada ao siRNA-RGMa, em um vetor de expressão, contendo um gene repórter (neste caso, eGFP). Para o RNA de interferência foi utilizado o vetor pcDNA3-eGFP (Addgene), entre os sítios de restrição *KpnI* e *EcoRI*.

Após confirmação por eletroforese em gel de agarose 1%, tanto o DNA plasmidial do vetor pSilencer contendo siRNA-RGMa e quanto o vetor pcDNA3-eGFP vazio foram submetidos a uma dupla digestão com enzimas de restrição. A primeira digestão foi realizada utilizando 1 µg de DNA/PCR, 40 U da enzima

de restrição *KpnI* (Thermo Scientific), e 1 μL do tampão padrão Tango 10x (Thermo Scientific), a 37 °C por 1 h; seguida de uma segunda digestão, onde aos 10 μL produto da primeira, foram adicionados 10 U da enzima *EcoRI* (Thermo Scientific) e mais 1,25 μL do mesmo tampão, seguida de incubação a 37 °C por mais 1 h. Os produtos da digestão foram confirmados em gel de agarose 1% e posteriormente purificados utilizando o kit de extração de gel de PCR (Qiagen).

O produto da digestão foi então ligado ao vetor pcDNA3-eGFP via sítio *KpnI-EcoRI* utilizando 3 U da enzima T4 DNA Ligase (Promega), 5 μL de tampão da enzima 2x, e 2 μL do produto da digestão e 2 μL do vetor vazio, *overnight*, a 16 °C. Após ligação, cerca de 2 μL da reação foi utilizado para transformar bactérias quimiocompetentes (*E. coli*, TOP10). DNA plasmidial de algumas colônias obtidas foi extraído novamente utilizando o *kit Gene Jet Miniprep* (Fermentas). Para confirmar a clonagem, uma PCR foi realizada utilizando 0,5 μL do DNA plasmidial (~ 100 ng), 0,4 μM de cada um dos iniciadores T7 e SP6 (presentes na sequência do vetor), e 12,5 μL do MasterMix PCR (Fermentas) e o mesmo programa utilizado anteriormente. O sucesso da clonagem foi confirmado em gel de agarose 1% pelo tamanho do fragmento amplificado.

Uma maxi-preparação (maxi-prep) foi realizada utilizando o *kit Plasmid Plus Maxi* (Qiagen), para a obtenção da quantidade de DNA necessária para as transfecções das células (~ 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Para isso, 2 μL dos DNAs (RGMa+pCAB, pCAB vazio, siRNA-RGMa+pcDNA3-eGFP e pcDNA3-eGFP vazio) foram utilizados para transformar bactérias quimiocompetentes (*E. coli*, TOP10) pelo método do choque térmico. Colônias isoladas de cada um dos grupos foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sob agitação a 37 °C por 8 h. No dia seguinte, 500 μL de cada pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e mantidos sob agitação a 37 °C por 16 h. As culturas de bactérias transformadas foram centrifugadas a 6.000 x g, a 4 °C por 15 min. Os *pellets* formados foram ressuspensos em 10 mL do tampão P1 e misturados ao tampão P2. Após incubação por 5 min a TA, 10 mL do tampão P3 foi adicionado e a solução incubada em gelo por 20 min e centrifugada por 30 min a 20.000 x g a 4 °C. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi centrifugado por 15 min a 20.000 x g a 4 °C e levado à coluna

Qiagen-tip 500 previamente equilibrada com 10 mL de QBT. A coluna foi então lavada com 30 mL de tampão QC por duas vezes e o DNA eluído com 15 mL de tampão QF. O DNA foi precipitado com 10,5 mL de isopropanol e centrifugado por 30 min a 15.000 x g a 4 °C. O pellet contendo o DNA foi lavado com 5 mL de etanol 70% a temperatura ambiente, centrifugado a 15.000 x g por 10 min, levado a placa aquecedora (ProvoCell) a 38 °C por 5 a 10 min para secagem e ressuspenso em 200 µL de água livre de RNase e DNase. Os produtos das maxi-preparações foram purificados com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, Invitrogen), quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific) e sua presença confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.6. Transfecções celulares

Para os experimentos de transfecção, as células primárias e da linhagem C2C12 foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio de crescimento (MC), sobre lamínulas de vidro acrescidas de matrigel ou gelatina 3%, a uma densidade de 2×10^4 células/mL. Foram utilizados seis poços por grupo e os experimentos foram realizados, no mínimo, três vezes para cada grupo. Após 24 hs de incubação a 37 °C e 5% CO₂, a cultura foi transfectada com os vetores de super-expressão, *knockdown* e seus respectivos controles. Os DNAs resultantes das maxi-preparações foram diluídos para uma concentração de 0,8 µg/µL. As transfecções foram realizadas utilizando 0,8 µg do DNA plasmidial e 2 µL do reagente Lipofectamina 2000 (Life Technology), que foram misturados em 50 µL de meio Opti-MEM (Gibco), por poço a ser transfectado, e incubados por 45 min. Após este período de incubação, foram adicionados 250 µL de meio Opti-MEM, por poço a ser transfectado, à solução de transfecção. A cada poço da placa contendo as células foram adicionados 300 µL da solução de transfecção e, em seguida, as células foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 5 h. Após este período, o meio de transfecção foi substituído por MC fresco. Após atingir 70% de confluência, as células foram cultivadas em MD por 3 e 5 dias, para análises imunofluorescências. A eficiência de transfecção foi de cerca de 5%.

3.7. Imunofluorescência nas células em cultura

Após 3 em meio de crescimento e 3, 5 e 8 dias em meio de diferenciação, as células primárias e da linhagem C2C12 foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 min e tratadas com Igepal 0,1% (Sigma) e BSA 1% (Sigma) ambos diluídos em PBS, a 37 °C, por 30 min cada. Entre os tratamentos, as células foram lavadas com PBS em três banhos de 10 min cada. O anticorpo primário foi incubado por 1 h a 37 °C, como se segue: anticorpo GFP (coelho policlonal IgG, Abcam), Miosina de Cadeia Pesada MHC (camundongo monoclonal IgG2b, Developmental Studies Hybridoma Bank), C-RGMa (cabra policlonal IgG, Santa Cruz) e Desmina (rato monoclonal IgG1/K, Cell Marque), todos diluídos em PBS na proporção de 1:500. Após lavar com PBS, os anticorpos secundários anti-camundongo/anti-coelho e anti-cabra, conjugados com um fluorocromo, Alexa 488 e Alexa 555 (Life Technologies), respectivamente, na diluição de 1:700 em PBS, foram usados por 90 min a 4 °C. Nas amostras de cultura transfectadas, uma mistura utilizando os anticorpos primários contra GFP e MHC descritos acima foi realizada. Da mesma forma, uma mistura dos anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo foi utilizada. Os núcleos foram contracolorados com DAPI (Molecular Probe, Life Technologies). As lâminas foram montadas com glicerol 50% diluído em PBS.

3.8. Morfometria

As imagens de imunofluorescência foram capturadas em colaboração com o Laboratório da Biologia Estrutural e da Reprodução (ICB/UFMG) em microscópio de fluorescência Olympus BX51 acoplado a uma câmera Olympus Q Color 3 utilizando os programas Image Pro Express Software (version 4.5) e Adobe Photoshop CS6. Alguns cortes de 6 µm foram também analisados usando o microscópio Zeiss 510 Meta Confocal (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens CAPI/UFMG). As imagens de imunohistoquímica foram visualizadas em microscópio óptico Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura Q-Color 3/Olympus, utilizando o software QCapture Pro 6.0. As medidas de comprimento e largura das células transfectadas (GFP⁺/MHC⁺) foram realizadas em, pelo menos, seis lamínulas de cada tratamento utilizando uma régua micrométrica para calibração e padronização das análises no programa Image

J. As imagens das células transfectadas foram capturadas utilizando uma objetiva de 20× e uma projetiva de 2×. O maior diâmetro foi considerado para as medidas de comprimento e largura das células. A média das larguras foi obtida dividindo-se a soma das larguras pelo número total de células contadas num determinado grupo. O mesmo foi realizado para a média do comprimento das células. As lamínulas contendo as células transfectadas foram varridas em sua totalidade e todas as células com dupla marcação (GFP⁺/MHC⁺) foram contadas. Cerca de 300 células transfectadas foram contadas para cada grupo estudado. Além de terem suas medidas de largura e comprimento analisadas, as células foram classificadas quanto à quantidade de núcleos presentes em: mioblastos (1 núcleo), miotubos (2-4 núcleos) e miotubos maduros multinucleados (mais de 5 núcleos). Os dados foram apresentados em porcentagem, calculada dividindo o número de células de cada um dos três grupos (mioblastos, miotubos e miotubos maduros multinucleados) pelo total de células GFP⁺/MHC⁺ presentes em cada período estudado (3 e 5 dias). O número total de núcleos foi apresentado em porcentagem sendo calculado dividindo-se o número total de células GFP⁺/MHC⁺ pelo número total de núcleos destas células para cada grupo estudado. O índice de fusão foi calculado como a razão entre o número de núcleos dentro dos miotubos multinucleados (>3 núcleos) em dado campo e o número total de núcleos neste campo ×100, aos 5 dias de diferenciação miogênica.

3.9. Análise estatística

Os fenótipos para RGMa *in vitro* (medidas de comprimento e largura bem como a quantidade de núcleos) foram analisados usando o teste *F-test* verificados por SASLAB de SAS e corrigidos se necessário.

ANOVA foi utilizado para detectar diferenças entre os dois tratamentos e as médias (\pm erro padrão) foram comparadas por *least squares* ($p < 0,05$) usando PROC GLM (SAS, 2007). Para as porcentagens observadas, o teste do qui-quadrado foi implementado no PROC FREQ (SAS, 2007), considerando as frequências esperadas como 50% para cada tratamento. Qualquer desvio entre as frequências observadas e esperadas foram significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Imunolocalização de RGMa, RGMB e RGMc

Apesar de transcritos de *RGMa*, *RGMB* e *RGMc* terem sido anteriormente observados no músculo estriado esquelético e em células musculares em cultura (Kanomata et. al, 2009), nenhuma informação sobre a localização destas proteínas nestas células foi disponibilizada até o momento. Para determinar o local de expressão de RGMa, RGMB e RGMc nas células musculares esqueléticas, amostras dos músculos quadríceps, sóleo e EDL de camundongos machos adultos foram crio-seccionadas (transversalmente e longitudinalmente) e a técnica de imunofluorescência foi realizada utilizando os anticorpos primários contra RGMa, RGMB e RGMc. Os controles negativos foram determinados pela ausência do respectivo anticorpo primário.

Nas seções transversais, RGMa, RGMB e RGMc foram encontrados no sarcolema das células (Figura 9, cabeças de seta). Nestes mesmos cortes, interessante, também foi possível observar marcações pontuais para RGMa no sarcoplasma destas células (Figura10a, seta).

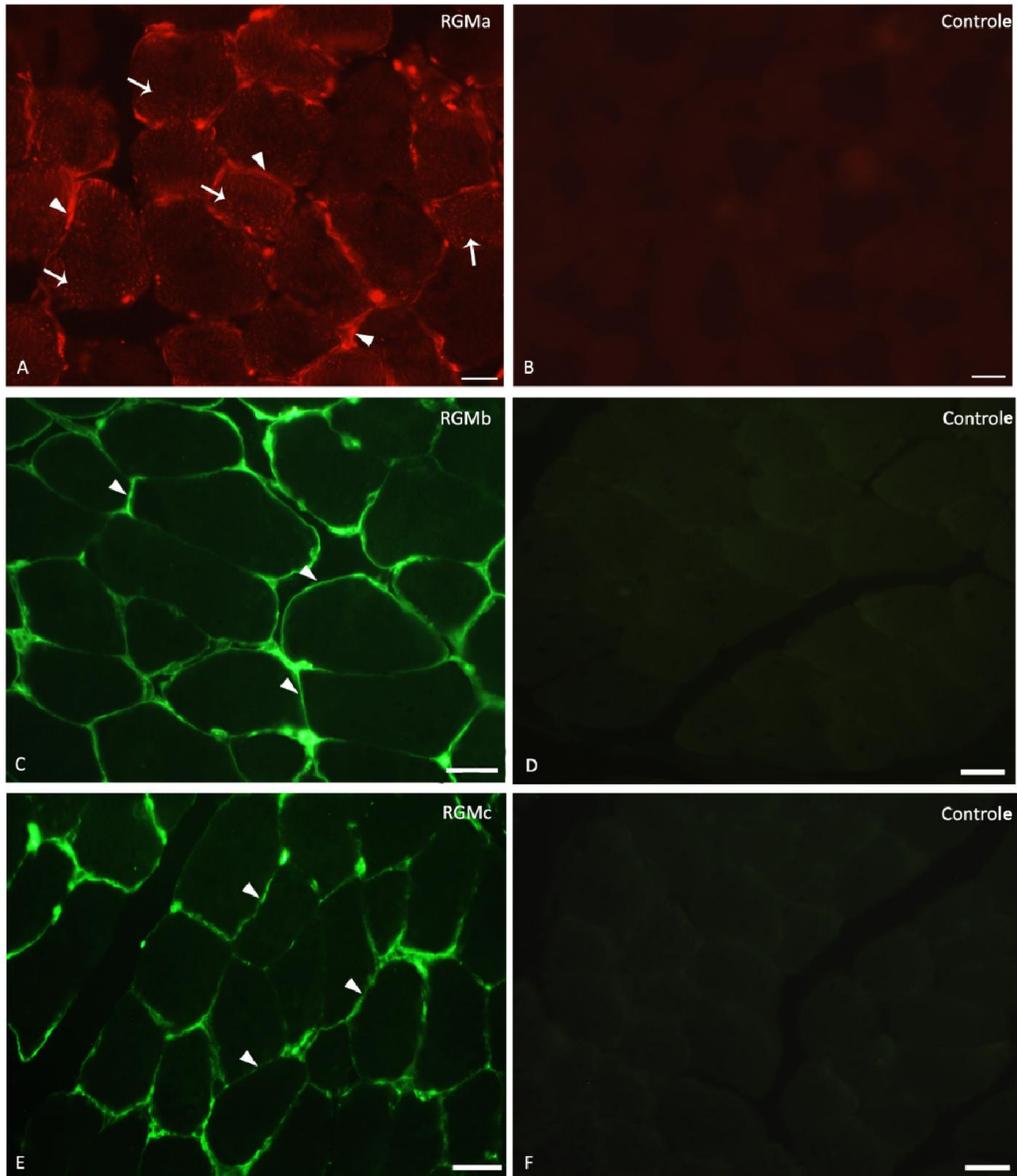


Figura 9. Imunolocalização das RGMs em secções transversais do tecido muscular esquelético de camundongos adultos. Imagens ilustrativas de imunofluorescência obtidas a partir de secções de 6 μm dos músculos quadríceps e sóleo utilizando anticorpos para RGMa (em vermelho), RGMb e RGMc (em verde). As secções foram visualizadas em microscópio de fluorescência. (A) RGMa é encontrado no sarcoplasma (seta) e no sarcolema (cabeça de seta). (B) controle negativo para RGMa. (C) RGMb está presente no sarcolema das células musculares (cabeça de seta). (D) controle negativo para RGMb. (E) RGMc é também observado, exclusivamente, no sarcolema das células (cabeça de seta). (F) controle negativo para RGMc. Barra 20 μm .

Nas secções longitudinais, RGMB e RGMc foram detectadas restritas ao sarcolema das células musculares (Figura 10); enquanto, RGMa apresentou um padrão de marcação estriado, semelhante às proteínas sarcoméricas (Fig.11).

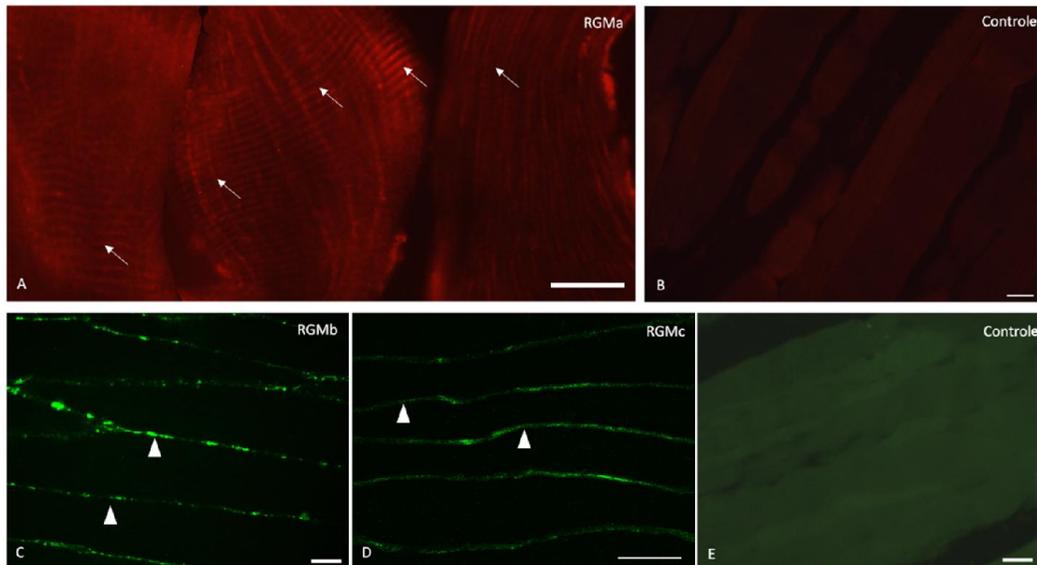


Figura 10. Imunolocalização das RGMs em secções longitudinais do tecido muscular esquelético de camundongos adultos. Imagens ilustrativas de imunofluorescência obtidas a partir de secções de 6µm dos músculos quadriceps e sóleo. Imunomarcagem de RGMa (vermelho), RGMB e RGMc (verde). Os cortes foram visualizados em microscópio de fluorescência. (A) RGMa é encontrada no sarcoplasma com um aspecto estriado de marcação (seta). (B) controle negativo para RGMa. (C) RGMB é observado exclusivamente no sarcolema dessas células (cabeça de seta). (D) o mesmo padrão de marcação no sarcolema da célula pode ser visto para RGMc (cabeça de seta). (E) controle negativo para RGMB e RGMc. Barra 20µm.

Para verificar, de forma mais detalhada, o padrão de expressão de RGMa, novos cortes transversais e longitudinais de músculo esquelético e cérebro foram obtidos e visualizados em microscópio confocal. Por se tratar de um orientador de axônio abundantemente expresso no sistema nervoso central, amostras de cérebro foram utilizadas como controle positivo da marcação. Os mesmos padrões observados para RGMa na microscopia de fluorescência foram obtidos quando da análise dos cortes no microscópio confocal (Figura 11).

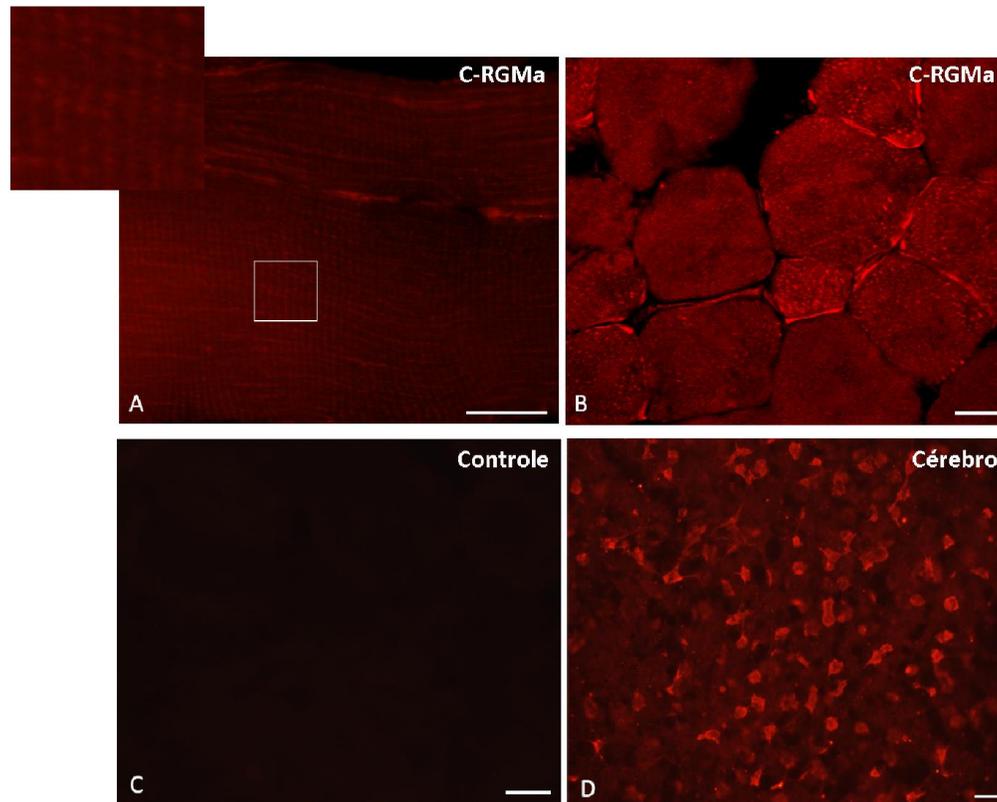


Figura 11. Imagens de confocal da imunomarcação de C-RGMa no músculo esquelético e cérebro de camundongos adultos. Imagens ilustrativas de secções de 6 μm dos músculos quadriceps e EDL utilizando o anticorpo para a região C-terminal da molécula de RGMa (vermelho). (A) Secção longitudinal, mostrando, em detalhe, o padrão estriado de marcação para RGMa. A imagem disposta em A foi ampliada para melhor visualização das estriações (ampliação). (B) Secção transversal sendo, RGMa detectada no sarcoplasma e sarcolema das células musculares. (C) controle negativo para C-RGMa. (D) controle positivo da marcação para C-RGMa no cérebro de camundongos. Barra 20 μm .

Para confirmar o padrão de marcação para RGMa encontrado quando da utilização do anticorpo sintetizado contra a região C-terminal desta proteína, um novo anticorpo, produzido contra a região N-terminal de RGMa, foi utilizado. Nossos resultados mostraram um padrão de marcação semelhante quando da utilização do anticorpo para RGMa N-terminal (N-RGMa) em relação ao anticorpo para RGMa C-terminal (C-RGMa) (Figura 12).

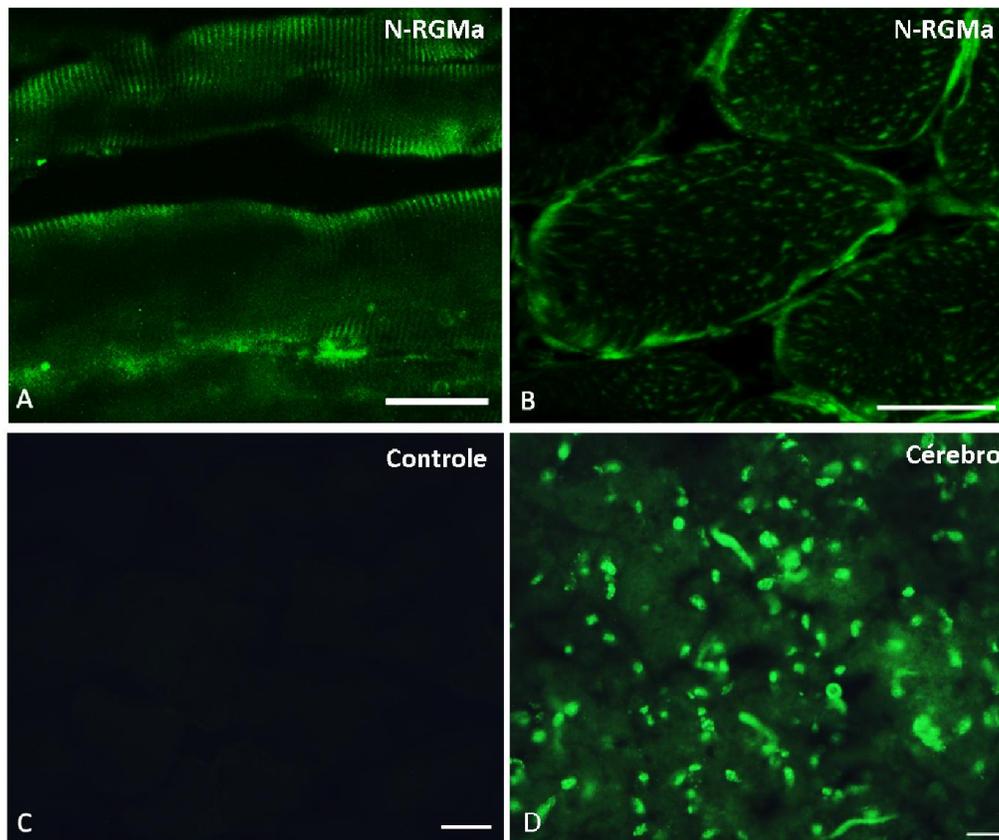


Figura 12. Imagens de confocal da imunomarcção de N-RGMa no músculo esquelético e cérebro de camundongos adultos. Imagens ilustrativas de secções de 6 μ m dos músculos quadriceps e EDL utilizando o anticorpo para a região N-terminal da molécula de RGMa (verde). (A) Secção longitudinal, revelando o padrão estriado de marcação para RGMa. (B) Secção transversal mostrando marcação para RGMa no sarcoplasma e sarcolema das células musculares. (C) controle negativo para N-RGMa. (D) controle positivo da marcação para N-RGMa no cérebro de camundongos. Barra 20 μ m.

Com o intuito de verificar se tal padrão estriado de imunomarcção para RGMa deve-se realmente à presença dessa proteína no sarcoplasma das células musculares e não são devido à uma possível autofluorescência das proteínas sarcoméricas dessas células, uma imunohistoquímica foi realizada usando ambos os anticorpos para RGMa, C- e N-terminais. Similarmente, nossos resultados mostram a marcação estriada para ambos os anticorpos utilizados nas células musculares esqueléticas (Figura 13).

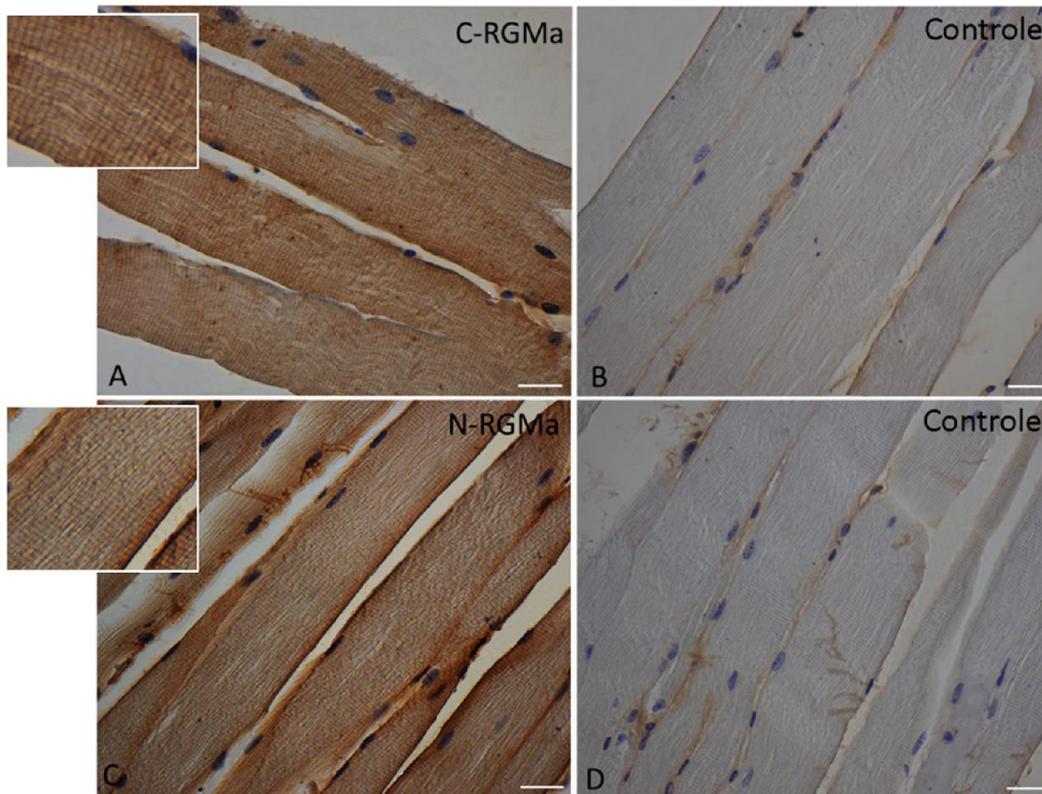


Figura 13. Imunohistoquímica de C-RGMa e N-RGMa nos músculos esqueléticos de camundongos adultos. Secções de 6 µm do músculo quadríceps foram obtidas para imumarcção utilizando os anticorpos C-RGMa e N-RGMa. Os cortes longitudinais foram visualizados em microscópio ótico. (A) marcação para C-RGMa. (B) controle negativo para C-RGMa. (C) marcação para N-RGMa. (D) controle negativo para N-RGMa. Barra 20µm.

Estes achados sugerem que todas as RGMs estão presentes nas células musculares esqueléticas, sendo RGMa encontrada tanto no sarcolema quanto no sarcoplasma, onde parece atuar como uma proteína do sarcoplasma; e RGMB e RGMc encontradas exclusivamente no sarcolema.

4.2. Co-localização de RGMa com proteínas sarcoméricas e sarcoplásmicas

Com o intuito de confirmar a localização das RGMs na membrana das células musculares esqueléticas, dupla marcações foram realizadas para cada

RGM e Distrofina, proteína de membrana do complexo Distrofina-Glicoproteínas que liga o citoesqueleto da fibra muscular à matriz extracelular. Os resultados indicaram a co-localização entre as RGMs e a proteína Distrofina, observado em amarelo nas imagens, sugerindo a sobreposição destas proteínas nas células musculares (Figura 14).

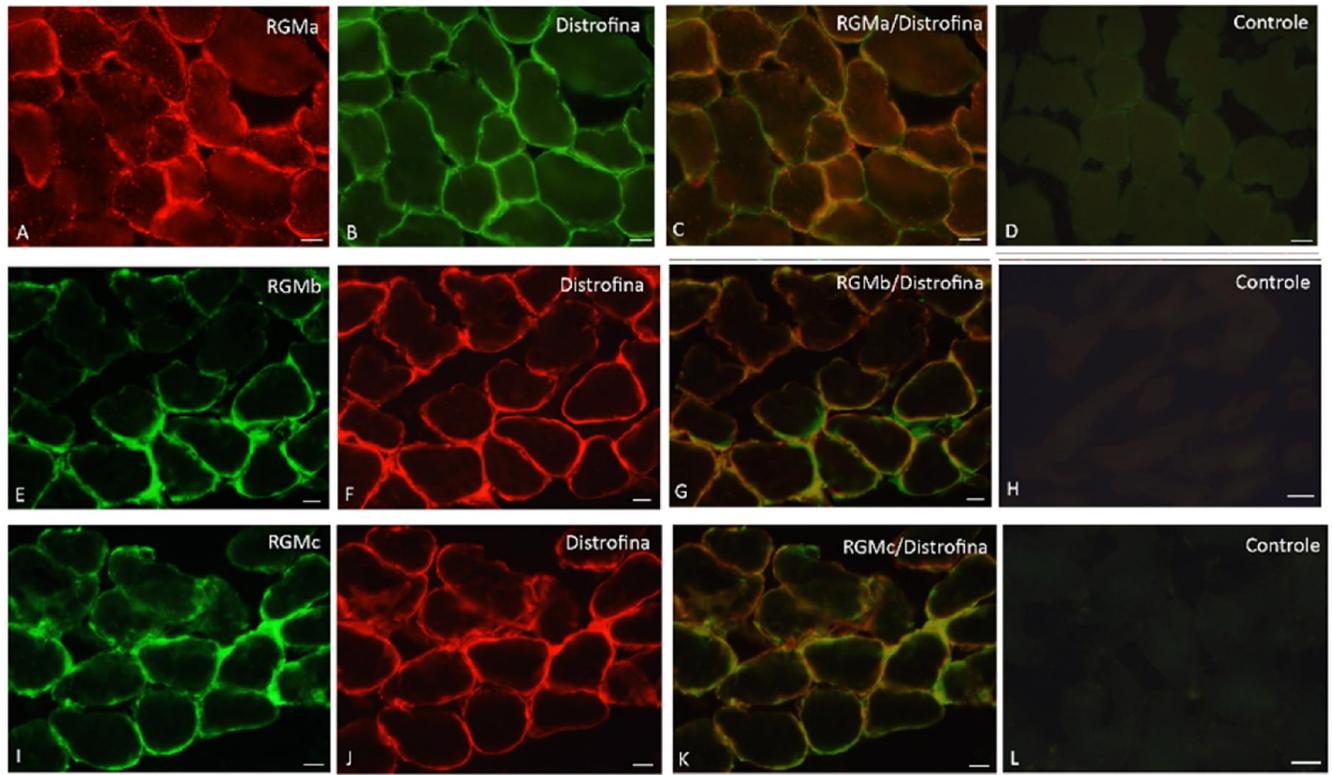


Figura 14. Co-localização entre as RGMs e Distrofina nas células musculares adultas de camundongos. Imagens ilustrativas de seções transversais de 6 μm dos músculos quadríceps e sóleo utilizados para dupla marcação com os anticorpos para RGMa e Distrofina, RGMb e Distrofina, e RGMc e Distrofina. As seções foram visualizadas em microscópio de fluorescência. (A) imunomarcagem para RGMa (vermelho). (B) Distrofina (verde). (C) Sobreposição das imagens mostradas em A e B mostrando os locais em que houve co-localização (amarelo). (D) Sobreposição das imagens dos controles negativos para RGMa e Distrofina. (E) RGMb (verde). (F) Distrofina (vermelho). (G) Sobreposição das imagens mostradas em E e F onde se observa os locais de co-localização entre estas proteínas (amarelo). (H) Sobreposição das imagens dos controles negativos para RGMb e Distrofina. (I) RGMc (verde). (J) Distrofina (vermelho). (K) Sobreposição das imagens mostradas em I e J revelando os pontos de co-localização (amarelo). (L) Sobreposição das imagens dos controles negativos para RGMc e Distrofina. Barra 20 μm .

O aspecto estriado de RGMa nas miofibras nos impulsionou a investigar uma possível co-localização desta proteína orientadora de axônio com

estruturas típicas do intrincado citoesqueleto muscular, como proteínas sarcoméricas e do citoesqueleto. Para tanto, dupla marcação foi executada em secções longitudinais usando anticorpos contra RGMa/Desmina, e RGMa/Titina. Nos músculos esqueléticos, o filamento intermediário Desmina é principalmente encontrado na periferia dos discos Z do sarcômero; enquanto a proteína gigante Titina conecta o disco Z à linha M no centro do sarcômero. Nossos resultados revelaram a existência de pontos de co-localização de RGMa com as proteínas Desmina e Titina (Figura 15). Estes achados sugerem uma associação de RGMa com os sarcômeros, possivelmente, com os discos Z.

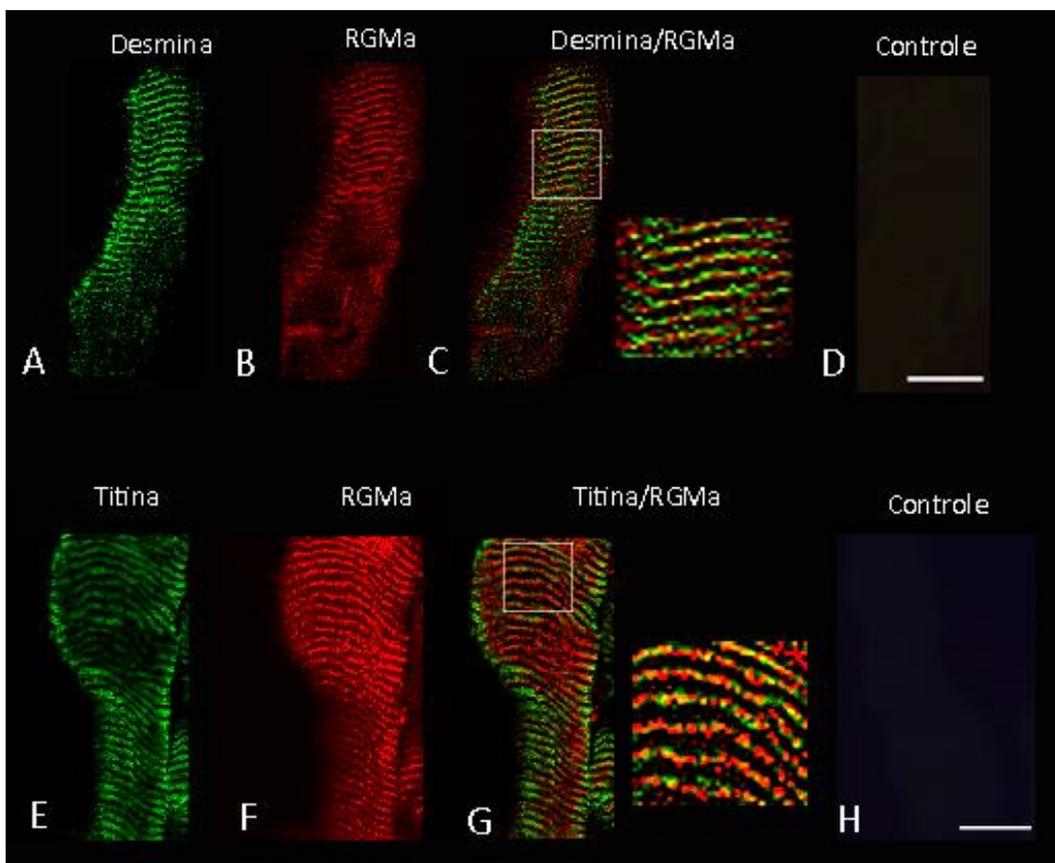


Figura 15. Co-localização de RGMa/Desmina e RGMa/Titina na musculatura esquelética adulta de camundongos. Imagem ilustrativa de secções longitudinais de 6 μm do músculo utilizando os anticorpos contra RGMa (vermelho), Desmina (verde) e Titina (verde). As imagens foram obtidas a partir de um microscópio de fluorescência. (A) marcação para RGMa. (B) Desmina. (C) sobreposição das imagens mostradas em A e B. Os pontos de co-localização de RGMa e Desmina são mostrados em detalhe (amarelo). (D) sobreposição dos controles negativos para RGMa e Desmina. (E) marcação para RGMa. (F) Titina. (G) sobreposição das imagens dispostas em E e F. Os sítios de co-localização de RGMa e Titina são mostrados em detalhe (amarelo). (H) sobreposição das imagens de controle negativa usadas para RGMa e Titina. Barra 20 μm .

Para corroborar com os nossos resultados que sugerem uma associação de RGMa ao citoesqueleto das células musculares, a expressão de RGMa foi analisada em tipos diferentes de músculos (lentos e rápidos) e comparada à expressão dos tipos diferentes de Miosina de Cadeia Pesada (MHC tipos I, IIa e IIb) por meio da co-localização de RGMa a essas proteínas. Os músculos sóleo, quadríceps e EDL foram utilizados, respectivamente, para a imunocolocalização de RGMa a MHCI, MHCIIa e MHCIIb dada a predominâncias destas fibras nestes tipos musculares. Nossos resultados mostraram que RGMa é amplamente expressa em todas as fibras musculares e co-localiza com os diferentes tipos de MHCs avaliados (Figura 16).

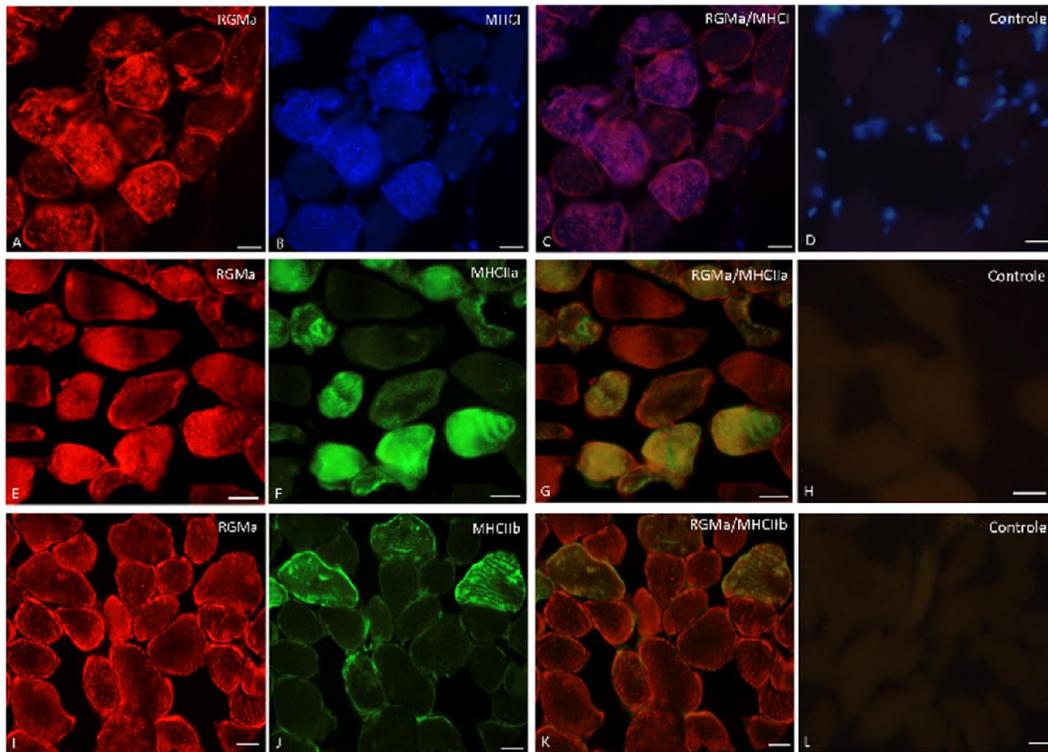


Figura 16. Co-localização de RGMa e os diferentes tipos de MHC (tipo I, fibras lentas; e tipos IIa e IIb, fibras rápidas). Secções transversais dos músculos sóleo, quadríceps e EDL marcados, respectivamente, para RGMa e MHCI, MHCIIa e MHCIIb. Os cortes foram visualizados em microscópio de fluorescência. (A) marcação para RGMa (vermelho). (B) MHCI (azul). (C) sobreposição das imagens mostradas em A e B. (D) sobreposição das imagens de controle negativo para RGMa e MHCI. (E) RGMa (vermelho). (F) MHCIIa (verde). (G) sobreposição das imagens dispostas em E e F. (H) sobreposição das imagens de controle negativo para RGMa e MHCIIa. (I) RGMa (vermelho). (J) MHCIIb (verde). (K) sobreposição das imagens mostradas em I e J. (L) sobreposição das imagens de controle negativo para RGMa e MHCIIb. Barra 20 μm .

Juntos, nossos dados demonstram, pela primeira vez, uma molécula orientadora de axônio como um componente do complexo citoesqueleto da célula muscular esquelética.

4.3. Padrão de expressão de RGMa durante a diferenciação *in vitro* de mioblastos primários.

Com o intuito de verificar a expressão de RGMa também em células indiferenciadas e durante a diferenciação dessas células em miotubos multinucleados, as técnicas de imunofluorescência e *western blot* foram realizadas durante a diferenciação *in vitro* de mioblastos primários. Imunofluorescência para RGMa foi realizada após 3 dias de cultivo dessas células em meio de crescimento e após 8 dias de cultivo em meio de diferenciação. Os resultados revelam que RGMa é expresso em mioblastos indiferenciados bem como em miotubos multinucleados (Figura 17 A e B). Apesar de, no tecido muscular esquelético adulto, serem observadas marcações estriadas para RGMa e Desmina, aos 8 dias em meio de diferenciação, RGMa e Desmina não apresentam este padrão de marcação (Figura 17 B e D).

De forma a confirmar a produção endógena de RGMa durante a miogênese, um *western blot* foi realizado para RGMa em mioblastos primários utilizando o anticorpo N-terminal, após 3 dias em meio de crescimento e após 3, 5 e 8 dias de deprivação de soro de forma a promover a diferenciação celular. Os resultados revelaram a presença de um fragmento para RGMa, de aproximadamente 60 kDa demonstrando que RGMa é constantemente expressa pelas células musculares durante todo o processo de diferenciação celular (Figura 17 C).

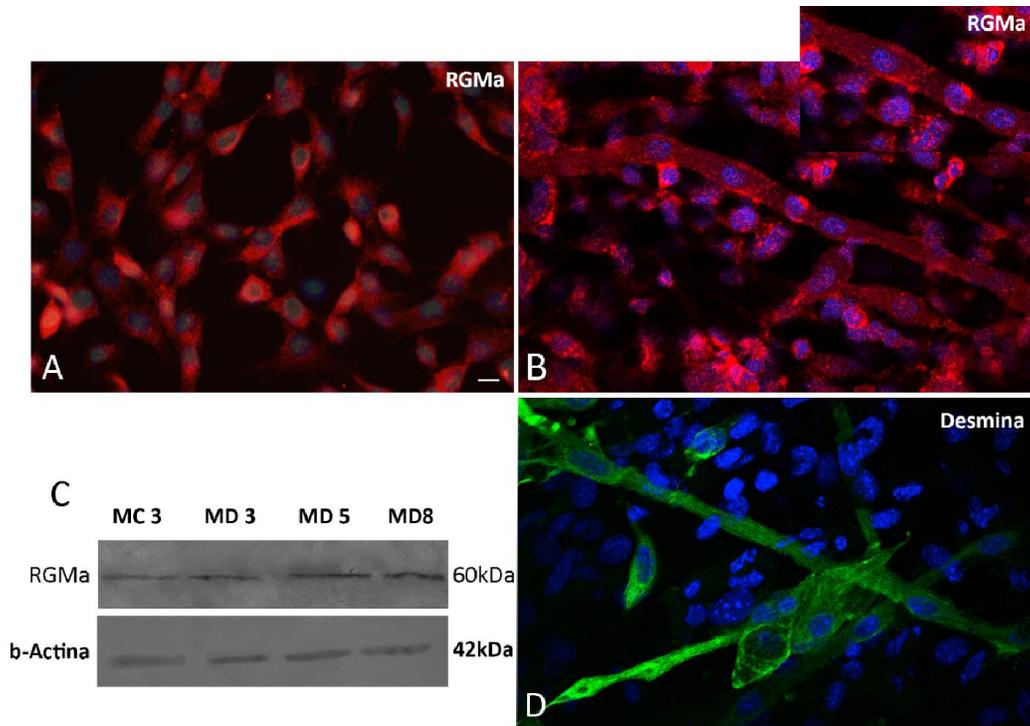


Figura 17. Expressão de RGMa em células indiferenciadas e durante a diferenciação de mioblastos primários de *Mus musculus*. Anticorpos contra RGMa (vermelho) foi utilizado para imunomarcagem de mioblastos primários após 3 dias em meio de crescimento (A) e após 8 dias em meio de diferenciação (B e D). Anticorpos contra Desmina (verde) foram utilizados para imunomarcagem após 8 dias em meio de diferenciação para comparação do padrão estriado de marcação/maturação dessas células. Os núcleos foram contracolorados com DAPI. As imagens foram analisadas em microscópio confocal. (A) marcação para RGMa em mioblastos. (B) RGMa em miotubos. (D) Desmina em miotubos. Barra 20 μ m. (C) *Western blot* utilizando um anticorpo contra N-RGMa. Uma banda de 60 kDa pode ser observada em todos os períodos avaliados. MC 3: meio de crescimento, dia 3. MD 3: meio de diferenciação, dia 3. MD 5: meio de diferenciação, dia 5. MD 8: meio de diferenciação, dia 8.

4.4. Formas de peptídeos para RGMa sintetizados no músculo esquelético adulto de camundongos

Para verificar quais fragmentos protéicos de RGMa estariam presentes na musculatura esquelética adulta de camundongos, uma análise de *western blot* foi realizada utilizando os anticorpos C-RGMa e N-RGMa. Os resultados revelaram a presença de duas bandas para RGMa quando o anticorpo C-RGMa foi utilizado: um fragmento de 60 kDa e um outro com 33 kDa (Figura 18 A). Todavia, quando o anticorpo N-terminal foi utilizado, apenas uma banda de 60 kDa foi encontrada (Figura 18 B). Os anticorpos foram capazes de detectar dois dos fragmentos observados para RGMa no cérebro: (1) uma proteína de 60 kDa

(clivada ou não clivada) que corresponde à forma completa do peptídeo (em inglês, *full-length*) detectado por ambos os anticorpos utilizados C- e N-terminal; e (2) um fragmento de 33 kDa descrito como um produto de um sítio de clivagem autocatalítico conhecido, presente na região C-terminal da proteína, e por isso detectado apenas quando o anticorpo C-terminal foi utilizado. Estes resultados sugerem a presença de pelo menos dois fragmentos para RGMa nas células musculares esqueléticas.

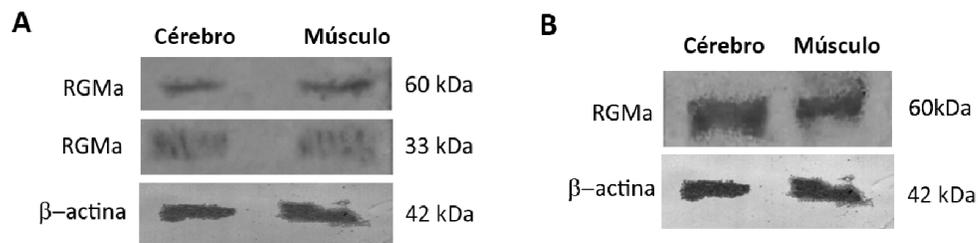


Figura 18. Identificação dos peptídeos para RGMa presentes no músculo esquelético de camundongos adultos. *Western blots* foram realizados, sob condições de redução, para C-RGMa e N-RGMa a partir de amostras de cérebro e músculo esquelético. Cérebro foi usado como controle positivo. (A) Duas bandas são visíveis nas duas amostras de tecido para C-RGMa (33 e 60 kDa). (B) Uma única banda de 60 kDa foi observada nas duas amostras quando N-RGMa foi utilizado.

4.5. Efeitos da super-expressão e *knockdown* de RGMa sobre o tamanho das células musculares *in vitro*

Para elucidar um possível papel para RGMa nas células musculares esqueléticas, o plasmídeo bicistrônico pCAB-RGMa-IRES-eGFP foi utilizado para induzir a super-expressão de RGMa em culturas celulares de mioblastos primários e da linhagem C2C12; e um RNA de interferência (siRNA), subclonado em pcDNA3-eGFP (pcDNA3-siRGMa-eGFP), para promover o *knockdown* de RGMa. Os vetores vazios foram usados como controle. A eficácia do tratamento foi confirmada por *western blot* (Figura 19).

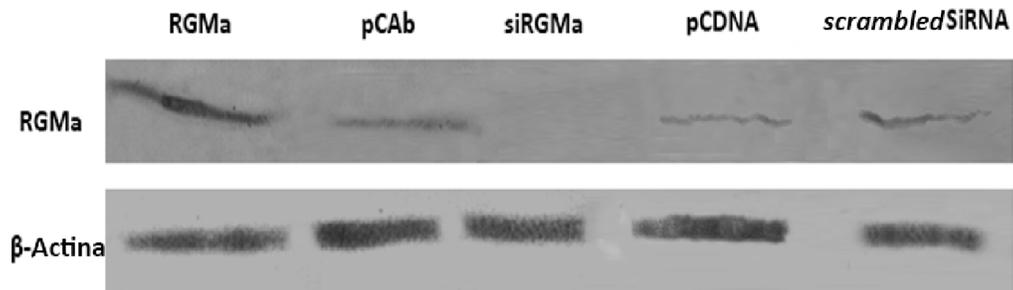


Figura 19. Eficácia dos tratamentos para super-expressão e *knockdown* de RGMa. Western blots foram realizados nas células primárias transfectadas com os vetores para super-expressão (RGMa+pCAB) e *knockdown* (siRGMa+pCDNA3) e seus respectivos controles (pCAB e pCDNA3) após 5 dias em MD. As células foram, também, tratadas com um *scrambled* siRNA para RGMa como controle negativo da interferência. Os anticorpos contra RGMa e β -Actina, este último usado como controle positivo, foram utilizados para provar a eficácia dos tratamentos.

As células transfectadas foram detectadas pela presença de GFP e o tamanho das células MHC positivas/GFP positivas (comprimento e largura) foi medido utilizando o programa Image J. As medidas foram realizadas após 5 dias de cultura em meio com redução de soro para induzir a diferenciação celular, período no qual ocorre o pico de crescimento da célula muscular. A super-expressão de RGMa induziu a hipertrofia das células musculares, tanto nas células primárias quanto nas de linhagem C2C12. Após 5 dias em meio de diferenciação (MD), as células transfectadas MHC-positivas/RGMa-positivas apresentaram um aumento na largura celular ($p < 0.05$) quando comparadas aos seus respectivos controles (MHC-positivas/pCAB-positivas) (Figura 20). Todas as diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A média das larguras das células primárias transfectadas com o vetor de super-expressão, após 5 dias em MD, foi 19,22 μm , enquanto as células transfectadas com o vetor vazio apresentaram uma média das larguras igual a 14,57 μm . Para as células da linhagem C2C12, após 5 dias em MD, as células transfectadas com RGMa possuíam uma média das larguras equivalente a 23,25 μm ao passo que as células transfectadas com o controle revelaram uma média das larguras de 18,18 μm . Para as medidas de comprimento das células MHC-positivas/GFP positivas, não foram observadas diferenças significativas.

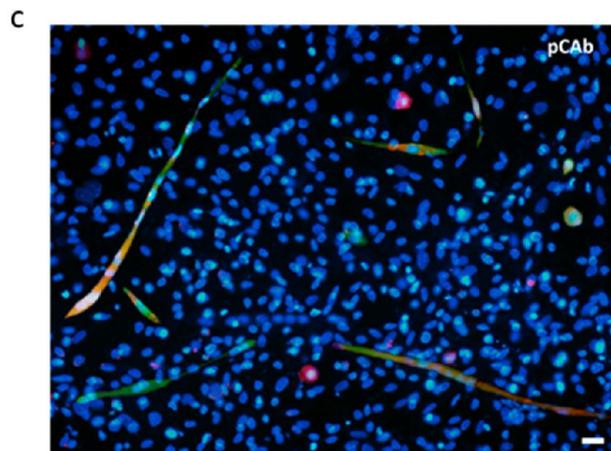
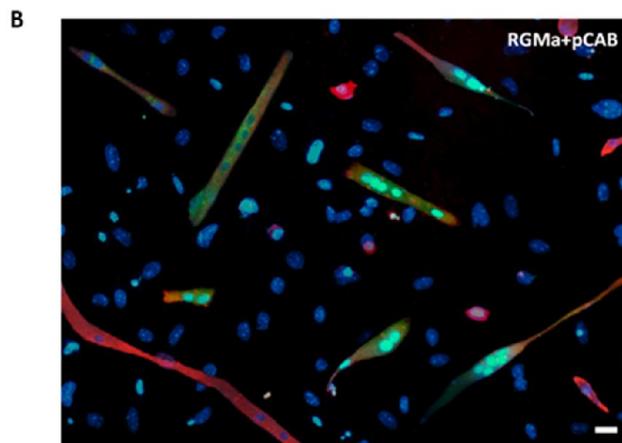
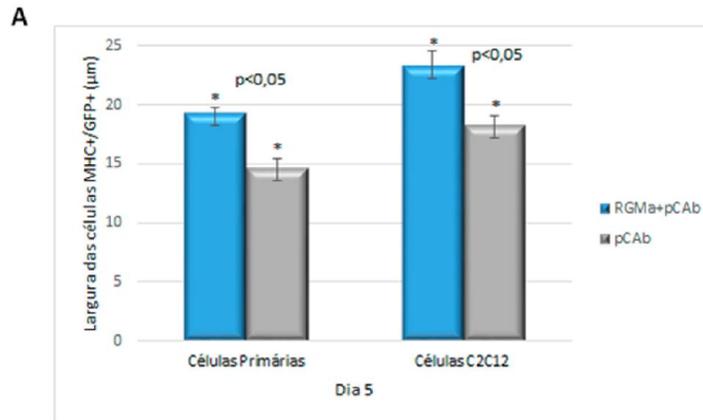
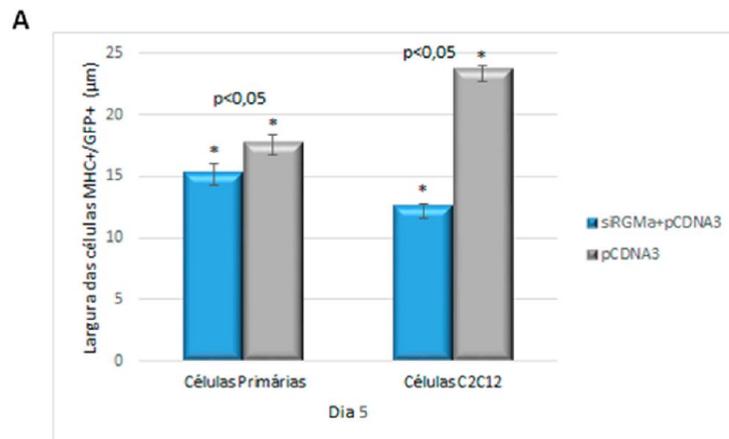


Figura 20. Efeito da super-expressão de RGMa sobre o fenótipo de mioblastos primários extraídos da musculatura esquelética de *Mus musculus* e de mioblastos da linhagem C2C12. As células primárias e C2C12 foram transfectadas com os vetores para super-expressão (RGMa+pCAB) e controle (pCAB), ambos, carregando o gene repórter e-GFP. As células foram marcadas para MHC (vermelho) e GFP (verde). A sobreposição das imagens é mostrada. (A) largura das células MHC⁺ carregando o vetor de super-expressão GFP⁺(RGMa⁺) e o controle GFP⁺ (pCAB). (B) células MHC⁺ são mostradas em amarelo/laranja após 5 dias de diferenciação (DM) para RGMa+pCAB+GFP. (C) células MHC⁺ são mostradas em amarelo/laranja após 5 dias de

diferenciação (DM) para pCAB+GFP. A largura de cada célula foi medida usando o software ImageJ. Barra 20 μm .

O efeito oposto sobre o tamanho das células primárias e da linhagem C2C12 foi observado quando o *knockdown* de RGMa foi realizado utilizando pcDNA3-siRGMa-eGFP. Um decréscimo na largura das células MHC-positivas/RGMa-*knockdown* foi verificado quando comparada ao controle (Figura 21. Todas as diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). O *knockdown* de RGMa induziu o aparecimento de um fenótipo de atrofia nas células musculares primárias e da linhagem C2C12, após 5 dias em meio de diferenciação (MD), quando comparadas aos seus respectivos controles (Figura 21). A média das larguras das células primárias transfectadas com o RNA de interferência para RGMa (siRGMa), após 5 dias em MD, foi 15,3 μm , enquanto as células transfectadas com o vetor vazio apresentaram uma média das larguras igual a 17,75 μm . Para as células da linhagem C2C12, após 5 dias em MD, as células transfectadas com siRGMa possuíam uma média das larguras equivalente a 12,62 μm ao passo que as células transfectadas com o controle revelaram uma média das larguras de 22,39 μm .



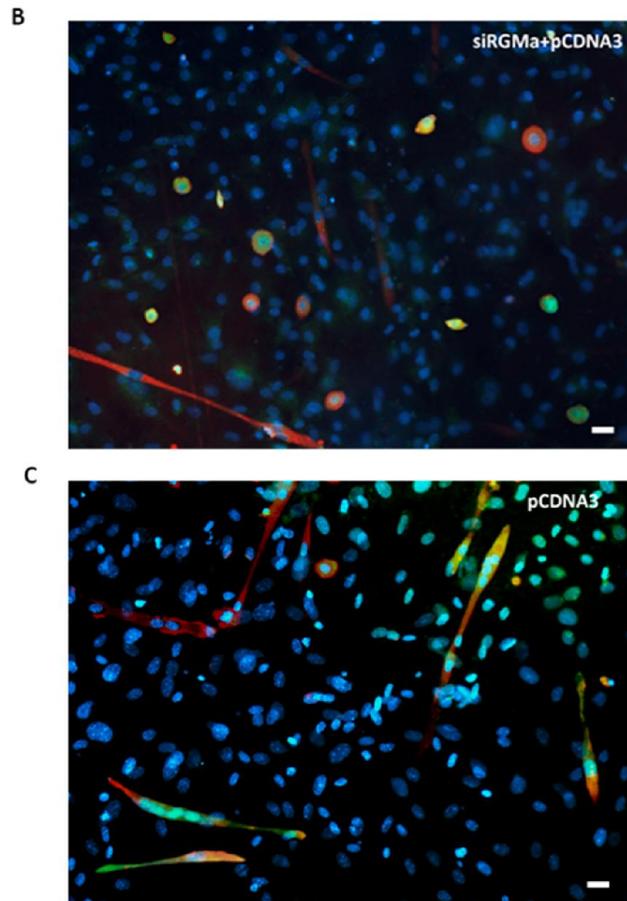


Figura 21. Efeito sobre o fenótipo das células primárias quando do *knockdown* de RGMa e seu respectivo controle. Os mioblastos primários e da linhagem C2C12 foram transfectados com os vetores para *knockdown* (siRGMa+pCDNA3) e controle (pCDNA3) carregando o gene repórter e-GFP. As células foram marcadas para MHC (vermelho) e GFP (verde). A sobreposição das imagens é mostrada. (A) largura das células MHC⁺ carregando o RNA de interferência para RGMa [GFP⁺(RGMa⁻)] e o controle GFP⁺ (pCDNA3). (B) células MHC⁺ são mostradas em amarelo/laranja após 5 dias de diferenciação (DM) para siRGMa+pCDNA3+GFP. (C) células MHC⁺ são mostradas em amarelo/laranja após 5 dias de diferenciação (DM) para pCDNA3+GFP. A largura de cada célula foi medida usando o software ImageJ. Barra 20 μ m.

Adicionalmente, foi possível notar que as células MHC-positivas/RGMa-positivas apresentavam uma tendência do aumento do número total de núcleos (44.4%) quando comparado ao controle (35.6%), estes resultados, no entanto, não foram estatisticamente significativos. Esses resultados sugerem ser RGMa capaz de induzir hipertrofia nas células musculares esqueléticas, possivelmente por meio de um mecanismo dependente do acréscimo de núcleos.

Juntos, nossos resultados sobre os efeitos da super-expressão e sub-regulação de RGMa nas células musculares *in vitro*, sugerem o envolvimento deste orientador de axônio no controle do tamanho celular durante o processo de miogênese.

4.6. Efeito da super-expressão e *knockdown* de RGMa na diferenciação das células musculares *in vitro*

Para avaliar o papel de RGMa na formação do miotubo, nós contamos o número de núcleos das células MHC-positivas/RGMa-positivas e MHC-positivas/RGMa-*knockdown* nas culturas primárias e da linhagem C2C12 após 3 e 5 dias em MD. As células foram classificadas como mioblastos quando apresentavam apenas 1 núcleo, como miotubo multinucleado quando exibiam de 2 a 4 núcleos e como miotubo multinucleado maduro quando da presença de mais de 5 núcleos. Talvez devido à linhagem das células usadas nestes experimentos, nós não fomos capazes de identificar a presença de miotubos maduros multinucleados nas células C2C12 mesmo após 5 dias de diferenciação. Para melhor compreendermos os efeitos de RGMa na formação de miotubos maduros multinucleados, as células primárias foram analisadas. Os dados foram apresentados como resultados de porcentagem.

Nenhuma diferença significativa foi observada na média do número de núcleos por miotubo multinucleado para as células MHC-positivas/RGMa-positivas quando comparadas aos controles. Entretanto, as células transfectadas com o vetor de super-expressão apresentaram uma tendência de se tornarem miotubos multinucleados quando comparadas aos controles.

Diferenças significativas foram encontradas quando do *knockdown* de RGMa ($p < 0,05$). A formação de miotubos multinucleados foi bloqueada nas células MHC-positivas/RGMa-*knockdown* após 3 e 5 dias em MD (Figura 22). Não foi possível identificar miotubos apresentando 2 ou mais núcleos nas células MHC-positivas/RGMa-*knockdown* (Figura 22A). Os mesmos resultados foram obtidos quando as células da linhagem C2C12 foram utilizadas (Figura 22B).

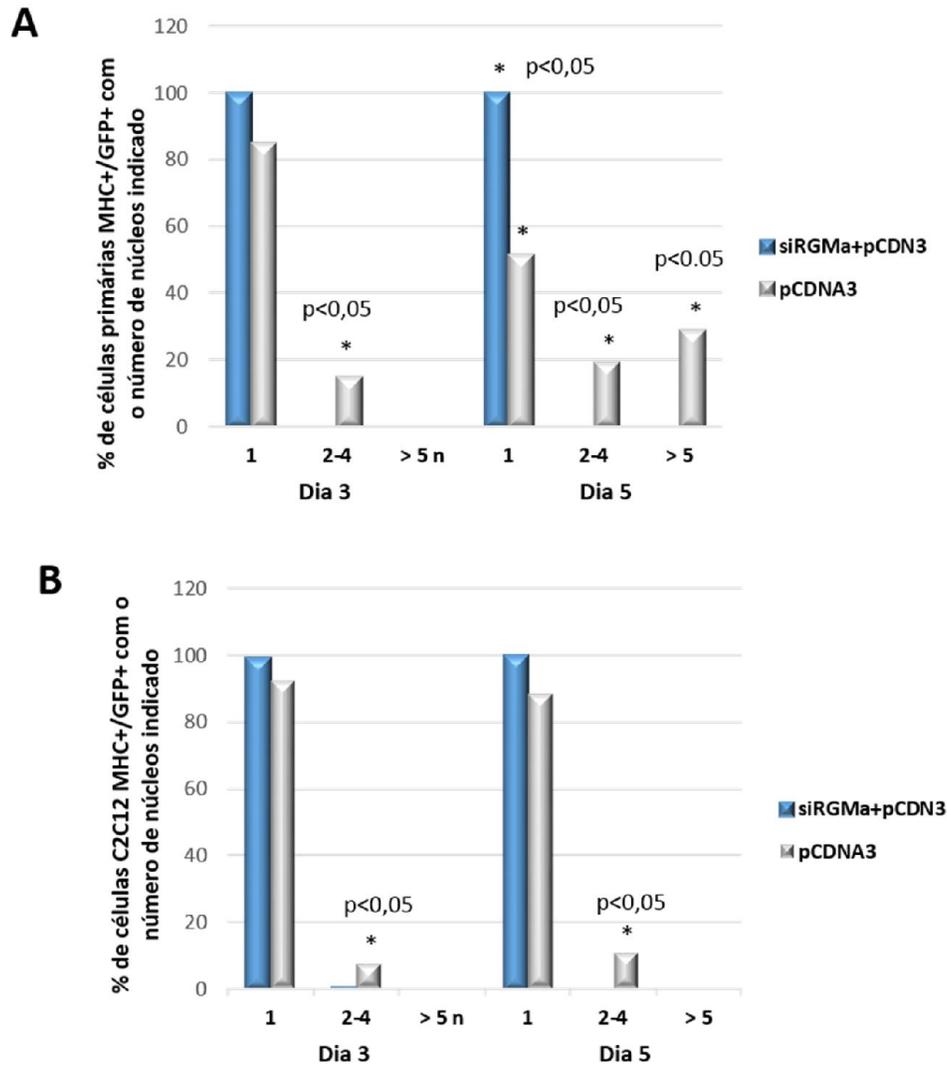


Figura 22. Efeito do *knockdown* de RGMa sobre a formação de miotubos. Células musculares primárias e da linhagem C2C12 foram transfectadas com construtos para promover o *knockdown* de RGMa (siRGMa+pCDA3), bem como seu respectivo controle (pCDNA3). Os núcleos das células foram contados após 3 em 5 dias de diferenciação. A quantificação da formação de miotubos foi avaliada por meio da média do número de núcleos por miotubo em células MHC⁺/GFP⁺. (A) Porcentagem de células primárias MHC-positivas transfectadas com RGMa *knockdown* e pcDNA3 e seus respectivos números de núcleos após 3 e 5 dias em MD. (B) A porcentagem de células da linhagem C2C12 é mostrada após 3 e 5 dias em MD para siRGMa e pCDNA3.

Para identificar um possível efeito de RGMa na fusão dos mioblastos durante a diferenciação celular, o índice de fusão foi avaliado em miotubos multinucleados MHC-positivos/RGMa-positivos bem como seu respectivo controle (pCAb) após 5 dias em MD. Um aumento de três vezes foi observado

no índice de fusão ($p < 0.05$) das células que super-expressavam RGMa quando comparado ao controle (Figura 23). Este resultado sugere que as células que super-expressam RGMa foram mais eficientes na fusão.

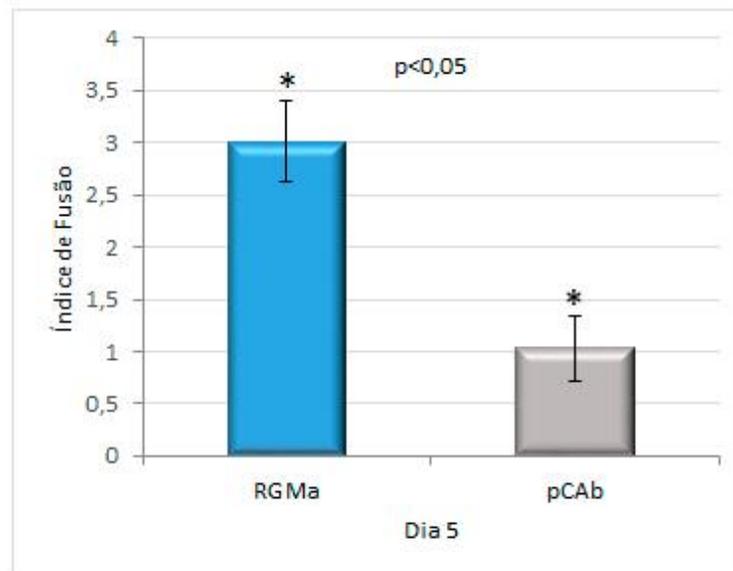


Figura 23. Efeito da super-expressão de RGMa sobre a fusão de mioblastos primários. Os núcleos das células MHC-positivas/GFP-positivas apresentando mais de 3 núcleos foram contados após 5 dias de diferenciação. A soma do número de núcleos destes miotubos por campo foi dividida pelo total de núcleos presentes no mesmo campo. A média dos índices de fusão é apresentada para os dois grupos ($p < 0,05$).

Juntos, nossos resultados sugerem que RGMa é necessário para a formação do miotubo uma vez que este orientador de axônio interfere na fusão de mioblastos.

5. Discussão

Além das funções descritas para as RGMs no sistema nervoso central, novas evidências sugerem que essas moléculas desempenham papéis adicionais em tecidos não neuronais e em outros processos relacionados ao desenvolvimento. O estudo de Xia e colaboradores (2005) demonstrou, por imunohistoquímica e hibridização *in situ*, a expressão de RGMb em diversos órgãos do trato reprodutivo, incluindo o testículo, o epidídimo, ovário, útero e glândula pituitária. Nas células da linhagem reprodutiva, foi observado que RGMb aumentava a sinalização de BMP2 e BMP4 exógenos sugerindo um papel para este orientador de axônio no sistema reprodutor de mamíferos. Metzger e colaboradores (2005) revelaram, por meio das técnicas de RT-PCR, hibridização *in situ*, *western blot* e imunohistoquímica, a expressão de RGMa e RGMb nas células do gânglio entérico e epitélio intestinal durante o desenvolvimento fetal e no intestino adulto. Babbitt e colaboradores (2005) observaram, por *northern blot*, a transcrição de RGMa em diversos outros tecidos de ratos adultos, além do cérebro, incluindo o coração, o pulmão, o fígado, testículo, pele e rim. Em concordância com o estudo de Babbitt et al. (2005); em 2009, Kanomata e colaboradores mostraram por meio da análise de RT-PCR de vários tecidos murinos que RGMa, RGMb e RGMc eram expressos nos mais diversos tecidos compreendendo: o coração, baço, rim, cérebro, fígado, osso, cartilagem e músculo esquelético. A relação entre a expressão das RGMs membros a e b, e o desenvolvimento do músculo esquelético, foi melhor elucidada em 2012 no trabalho de Jorge e colaboradores. Nesse trabalho, a técnica de hibridização *in situ* foi utilizada durante o desenvolvimento muscular em embriões de galinha, sendo a expressão de RGMa e RGMb detectada nos somitos, predominantemente, na região central do dermomiótomo e, posteriormente no miótomo, estrutura precursora das primeiras células musculares esqueléticas do corpo. Em 2009, Kanomata e colaboradores haviam encontrado, por meio de uma RT-PCR em mioblastos da linhagem C2C12, a expressão de RGMa e RGMb em mioblastos e em miócitos diferenciados enquanto RGMc havia sido detectada apenas em células diferenciadas expressando Miogenina. No entanto,

a compreensão dos possíveis papéis das RGMs em tecidos não neurais, bem como o padrão de expressão destas proteínas nos diferentes tecidos, são ainda incipientes e apresentam uma ampla gama de novas perspectivas e abordagens para o estudo das RGMs.

5.1. Imunolocalização de RGMa, RGMb e RGMc na musculatura esquelética de camundongos adultos

Embora a presença das RGMs ter sido associada aos sítios miogênicos dos somitos (Jorge et al., 2012), a localização dessas proteínas nas células musculares esqueléticas ainda não foi demonstrada. Nesse trabalho, nós mostramos, por meio da técnica de imunofluorescência, a localização de RGMa, RGMb e RGMc nas células musculares esqueléticas adultas de camundongos. As RGMs foram primeiramente descritas como moléculas associadas à membrana, devido à presença de uma âncora GPI em sua extremidade C-terminal (Monnier et al., 2002), por este motivo, era de se esperar que estas moléculas se localizassem nas membranas celulares do tecido muscular esquelético. De fato, nossos resultados de imunofluorescência em cortes transversais revelaram a presença destes orientadores de axônio, membros a, b e c, no sarcolema das células musculares (Figura 9), a qual, foi confirmada pela co-localização com a proteína de membrana Distrofina (Figura 14). Nossos resultados de co-localização das RGMs e Distrofina mostraram a sobreposição destas duas moléculas nas células musculares esqueléticas. No entanto, nas secções transversais em que se utilizou o anticorpo contra RGMa, marcações pontuais no interior da fibra foram também observadas (Figura 9A). Marcações pontuais semelhantes são observadas para o disco Z em secções transversais (Luther, 2009). Goldstein e colaboradores (1988, 1990), analisando micrografias de secções transversais do músculo sóleo de ratos adultos, observaram dois padrões típicos de disposição dos discos Z nos vertebrados: um padrão pontilhado, sob a forma de pequenos quadrados; e um padrão de disposição em rede, forma semelhante à uma rede de cesta de basquete. Esses padrões foram

associados, respectivamente, aos estados de relaxamento e contração da musculatura esquelética.

Ao analisarmos as secções longitudinais dos tecidos musculares esqueléticos utilizando os mesmos anticorpos contra RGMa, RGMB e RGMc, verificamos que, os membros b e c mantiveram um padrão de marcação restrito à membrana plasmática destas células. RGMa, porém, apresentou um padrão estriado de marcação semelhante às proteínas estruturais do citoesqueleto da célula muscular esquelética. (Figura 10). Por apresentar um padrão de marcação inédito e totalmente inesperado para um orientador de axônio, RGMa foi escolhido para a caracterização morfofuncional nessas células.

5.2 Padrão de marcação de RGMa e proteínas do sarcoplasma

Como proteínas que apresentam uma âncora GPI, as RGMs são proteínas associadas à membrana. Formas ancoradas à membrana e solúveis foram previamente descritas (Kuninger et al., 2006; Tassew et al., 2012), em contrapartida, nenhuma forma citoplasmática foi reportada para esta família de orientadores de axônio até o momento. Com o intuito de confirmar o aspecto estriado de marcação para RGMa nas células musculares esqueléticas, dois anticorpos desenhados para as diferentes extremidades da proteína (C e N-terminais) foram utilizados (Figura 11 e 13). Por se tratar de uma proteína amplamente expressa no sistema nervoso central (Monnier et al., 2002; Feng et al., 2012; Lah & Key, 2012; van den Heuvel et al., 2013), o cérebro foi utilizado como controle positivo para os anticorpos. Imunohistoquímica para ambos os anticorpos também foi realizada para excluir qualquer possibilidade de uma autofluorescência durante as análises (Figura 13). Nossos resultados para ambos os anticorpos confirmaram o padrão estriado de marcação para RGMa, o qual assim como na secção transversal, se assemelha ao padrão de marcação observado longitudinalmente para proteínas associadas ao disco Z (Hawkins et al., 2008; Luther, 2009; Rui et al., 2010).

O citoesqueleto das células musculares é composto por inúmeras proteínas associadas ao aparato de contração muscular e pode ser subdividido em citoesqueleto intrasarcomérico, extrasarcomérico e subsarcolemal (Small et al., 1992, Berthier & Blaineau, 1997).

Titina e Nebulina são os principais componentes do citoesqueleto intrasarcomérico (Small et al., 1992). Para verificarmos uma possível co-localização de RGMa com a proteína intrasarcomérica Titina, imunofluorescência foi realizada utilizando anticorpos para as duas proteínas. Nossos resultados mostraram a existência de pontos de co-localização destas proteínas (Figura 15). Curiosamente, a proteína Titina apresenta repetições dos domínios de Fibronectina tipo III (FNIII) e Imunoglobulina (Ig) que direcionam as interações da Titina (Bang et al., 2001), de forma semelhante ao receptor de RGMa, Neogenina, o qual possui em sua região extracelular repetições dos mesmos domínios (Rajagopalan et al, 2004; Yamashita et al., 2007; Gessert et al, 2008).

O citoesqueleto extrasarcomérico é composto por filamentos intermediários, dos quais, a Desmina constitui o principal filamento (Small et al., 1992, Berthier & Blaineau, 1997). Ela está associada ao disco Z e conecta o sarcômero ao citoesqueleto subsarcolemal dos costâmeros, núcleo e organelas, além de formar conexões longitudinais entre os limites de discos Z sucessivos e através do sarcolema (Fuchs & Weber, 1994; Carlsson & Thornell, 2001; Paulin & Li, 2004). Nossos resultados para a co-localização de RGMa e Desmina mostraram pontos de sobreposição entre essas duas moléculas no citoesqueleto da célula muscular (Figura 15).

O citoesqueleto subsarcolemal inclui proteínas de membrana e proteínas associadas à membrana tais como a própria Desmina, e outras proteínas como a α -Actinina e a Distrofina (Berthier & Blaineau 1997). Estas proteínas conectam indiretamente as miofibrilas mais periféricas à matriz extracelular por meio de domínios especializados do sarcolema, o costâmero (Pardo et al., 1983). Como discutido anteriormente, RGMa também possui pontos de co-localização com Distrofina.

Juntos nossos resultados sugerem, pela primeira vez, uma associação entre uma molécula orientadora de axônio e o intrincado citoesqueleto da célula muscular. De fato, nos últimos anos, novas proteínas têm sido descobertas associadas ao disco Z (Luther, 2009) incluindo filamentos ordenados, ligações cruzadas e proteínas de ancoragem (Clark et al, 2002; Squire et al, 2005), os quais encontram-se em trocas dinâmicas com o citoplasma (Wang et al, 2005) e localizados em múltiplos compartimentos celulares, incluindo o núcleo (Lange et al., 2006).

As fibras musculares esqueléticas são morfologicamente e bioquimicamente diferentes. Elas são classificadas em fibras rápidas e lentas de acordo com a isoforma de Miosina de Cadeia Pesada (MHC) que possuem (DiMario & Stockdale, 1997). As células musculares de mamíferos apresentam uma isoforma lenta (MHCI) e três isoformas rápidas (MHCIIa, MHCIIb e MHCIIx), sendo que fibras apresentando duas isoformas distintas podem ser encontradas no músculo (Staron & Pette, 1993; Schiaffino, 2010). Isoformas específicas de MHC não sarcoméricas estão envolvidas nos processos de extensão e retração dos neuritos (Tullio et al, 2001; Diefenbach et al, 2002; Gallo et al, 2002; Gallo & Letourneau, 2004). Os efeitos induzidos por RGMa no colapso do cone de crescimento, por exemplo, foi relacionado especificamente à atividade de MHCIIa, a qual media a redução de F-Actina e o decréscimo da área do cone. MHCIIb não foi associada aos efeitos inibitórios de RGMa no crescimento axonal (Kubo et al, 2008). Nossos resultados de co-localização de RGMa com as isoformas de Miosina de Cadeia Pesada para tipos de fibras lenta (MHCI) e rápidas (MHCIIa e MHCIIb) mostraram que a proteína RGMa é amplamente expressa nas células musculares esqueléticas, independente do tipo de fibra (Figura 16). Somados aos resultados das co-localizações discutidos acima, nossos achados sugerem a participação de RGMa como uma proteína sarcoplasmática, parte do complexo de redes interconectadas do citoesqueleto o qual, compreende proteínas sarcoméricas e proteínas associadas ao sarcômero.

5.3. Padrão de expressão de RGMA durante a diferenciação *in vitro* de mioblastos primários.

Nossos resultados mostraram, por meio de imunofluorescência e *western blot*, que RGMA é produzida de forma endógena pelas células musculares primárias durante todo o processo de diferenciação *in vitro* (Figura 17). Estes achados estão em concordância com o trabalho de Kanomata e colaboradores (2009) que detectaram, por RT-PCR, transcritos de RGMA em mioblastos da linhagem C2C12 cultivados em meio de crescimento e em meio de diferenciação por 7 dias. De forma similar, Jorge e colaboradores (2012) verificaram, por meio da técnica de hibridização *in situ* em embriões de galinha, transcritos de RGMA no epitélio dos somitos, de onde originam os mioblastos indiferenciados e células satélites, bem como nos miótomos dos somitos maduros, onde se encontram células musculares já diferenciadas.

5.4. Formas de RGMA presentes nas células musculares esqueléticas

Nossos resultados anteriores mostraram a presença de RGMA no sarcolema das células musculares esqueléticas, e, surpreendentemente no sarcoplasma destas células, possivelmente, como uma proteína do citoesqueleto. A análise de *Western blot* em amostras de músculo esquelético *in vivo* usando ambos os anticorpos C- e N-terminais, revelou dois possíveis fragmentos de RGMA nesse tecido, uma proteína completa de 60 kDa e um fragmento de 33 kDa, produto de um sítio de clivagem autocatalítico presente no domínio N-terminal (Figura 18). Nossos achados estão em concordância com aqueles descritos nas células neurais (Tassew et al., 2009), uma vez que nenhuma diferença em relação aos tamanhos dos fragmentos foi encontrada no tecido muscular. Por meio da análise de *western blot* de células neurais, com e sem redução, utilizando os anticorpos C- e N-RGMA, Tassew e colaboradores (2012) verificaram que, devido à modificações pós-traducionais, RGMA dá origem a quatro formas ancoradas à membrana [proteína completa clivada e

não clivada (60 kDa), fragmento C-terminal (33 kDa) e a forma RGMA37 (37 kDa)]; e três formas solúveis dessa proteína [dois fragmentos menores N-terminais, um de 30 kDa (N-RGMA e NN-RGMA com 22 kDa e 18 kDa não glicosilados, respectivamente) e uma forma secretada de 60 kDa sem a âncora GPI] (Tassew et al., 2009; Tassew et al., 2012). Nossos experimentos não foram capazes de identificar se a proteína de 60 kDa encontrada no músculo esquelético foi a forma clivada ou não clivada dessa proteína. Além do mais, um fragmento de 60 kDa foi detectado pelo anticorpo N-terminal, o qual poderia ser a proteína completa de 60 kDa ou a forma dessa proteína sem a âncora de GPI, produto da ação de uma fosfolipase (Hata et al., 2006; Tassew et al., 2012). Apesar das diferenças entre os anticorpos C- e N-RGMA observadas na análise de *Western blot*, esses anticorpos mostraram um padrão similar nas secções transversais e longitudinais de músculo esquelético, marcando porções particulares do sarcolema dessas células bem como seu sarcoplasma. É interessante notar que nenhuma forma citoplasmática para RGMA foi descrita em cérebro (Tassew et al., 2012) ou em quaisquer outros tecidos, e nenhum novo fragmento de RGMA foi observado no *Western blot* de músculo esquelético que poderia explicar esse sinal citoplasmático. Nossos resultados sugerem a interpretação de que RGMA estaria presente como proteína ancorada ao sarcolema do músculo esquelético como um fragmento clivado de 33 kDa, e como um fragmento de 60 kDa o qual poderia ser a forma completa (clivada ou não clivada) ancorada ou não à membrana. Os sinais de RGMA detectados no sarcoplasma da célula muscular esquelética por ambos os anticorpos C- e N-RGMA poderiam representar o produto da clivagem da forma completa de 60 kDa a qual poderia ser endereçada ao sarcoplasma da célula e se tornar um componente do citoesqueleto. Proteínas assumindo múltiplas e complexas localizações dentro do sarcômero e em outros compartimentos celulares é um evento comum nas células musculares esqueléticas (Lange et al, 2005). A forma de 33 kDa de RGMA foi associada à indução do colapso do cone de crescimento temporal e à orientação de axônios temporais da retina (Stahl et al, 1990; Muller et al, 1996; Monnier et al, 2002). Ela é encontrada nas membranas celulares como um heterodímero ligado à N-RGMA e como uma proteína única (Zhang et al, 2005; Kuninger et al, 2006; Tassew et al, 2012). C-

RGMa (33kDa) é pobremente endereçada à membrana celular quando expressa em cadeia única (Tassew et al, 2009) e este pode ser o motivo pelo qual a expressão de RGMa no sarcolema não é tão expressiva.

As modificações pós-traducionais de RGMa podem dar origem a peptídeos com potenciais de ação diferentes (Samad et al, 2004; Lin et al, 2005; Tassew et al, 2012). Em seu trabalho de localização subcelular de RGMa, RGMb e RGMc em células COS-7 superexpressando as RGMs, Niederkofler e colaboradores (2004), observaram que RGMa e RGMc são endereçadas à membrana plasmática dessas células e eficientemente secretadas; enquanto RGMb parecia se acumular no interior da célula. Nossos resultados sugerem um comportamento semelhante de RGMa nas células musculares ao observado para RGMb nas células COS-7.

Nossos resultados de *western blot* associados aos resultados de marcação de RGMa no sarcolema das células musculares esqueléticas podem sugerir uma provável associação de RGMa às regiões de contato célula-célula e processos de adesão celular. De fato, a forma ancorada à membrana de RGMa foi associada à regiões de contato célula-célula e, a interação RGMa e Neogenina nestes locais, durante o processo de neurulação, é responsável por estabelecer e manter a polaridade celular e integridade do epitélio pseudoestratificado do tubo neural (Kee et al., 2008). Fatores envolvidos no contato célula-célula e adesão celular também influenciam o desenvolvimento da musculatura esquelética (Krauss et al., 2010). Várias moléculas foram classificadas como mediadores dos efeitos pró-miogênicos do contato célula-célula, incluindo as Caderinas, as Cateninas e a superfamília de Imunoglobulinas associadas às Caderinas composta por CDO, BOC e Neogenina (Krauss et al., 2005). O sítio de ligação de RGMa à Neogenina reside entre o domínio von Willebrand tipo D e o domínio hidrofóbico da região C-terminal de RGMa (Itozaku, 2012) sugerindo um possível papel para C-RGMa de 33kDa no contato célula-célula no músculo esquelético. Em adição, RGMa possui também um motivo RGD (Arg-Gli-Asp), o qual estaria envolvido na adesão célula-célula (Samad et al, 2004). Finalmente, a associação de Neogenina à Netrina, um outro orientador de axônio, foi

encontrada nos sítios de contato célula-células em células musculares cultivadas (Kang et al., 2004).

5.5. Caracterização funcional *in vitro* de RGMa em células musculares esqueléticas

Nossos resultados *in vitro* da super-expressão de RGMa em mioblastos primários e da linhagem C2C12 mostraram uma hipertrofia dessas células quando comparadas ao controle (Figura 20). Esses achados sugerem que RGMa atue como um regulador positivo do tamanho das células musculares esqueléticas. Uma tendência ao aumento no número total de núcleos em células MHC-positivas/RGMa-positivas foram também observadas, sugerindo uma associação de RGMa ao mecanismo de acréscimo de núcleos durante a diferenciação da célula muscular esquelética. O índice de fusão corrobora com esse achado uma vez que, as células musculares que super-expressavam RGMa mostraram uma maior eficiência na fusão quando comparadas ao controle (Figura 23). Em contrapartida, o *knockdown* de RGMa resultou no aparecimento de células menores, atróficas (Figura 21), com deficiência para a formação de miotubos multinucleados (Figura 22). Esses resultados sugerem que RGMa atue como um regulador positivo do tamanho e diferenciação da célula muscular esquelética, possivelmente por meio de um mecanismo de indução da fusão celular.

Mecanismos diferentes foram associados à regulação do tamanho da miofibrila, incluindo a sinalização de IGF-1 (Coleman et al., 1995; Chakravarthy et al., 2000); os membros da superfamília TGF- β , Miostatina e BMP (McPherron et al., 1997; Lee & McPherron, 2001; Walsh et al., 2010); e os marcadores miogênicos Pax3 e Pax7, conhecidos por interferir no tamanho da célula e determinar a formação de mioblastos (Collins et al., 2009). De forma semelhante, Neogenina, Netrina e RGMc também foram associados ao sistema que regula o tamanho da célula muscular esquelética. A super-expressão de Neogenina em células C2C12 resultou na formação de miotubos maiores quando

comparados às células C2C12/puro (Kang et al., 2004). De forma similar, células C2C12 que super-expressavam Neogenina apresentaram um aumento no número total de núcleos em células MHC-positivas e na média do número de núcleos por miotubo (Kang et al., 2004). O mesmo fenótipo foi observado quando as culturas foram tratadas com Netrina-2 (o membro da família em galinha mais intimamente relacionado à Netrina-3 de mamíferos) e também quando RGMc foi super-expresso. No entanto, os efeitos de RGMc nas células foram menos pronunciados quando comparados às Netrinas (Kang et al., 2004; Bae et al., 2009). Alguns estudos, ainda, revelaram que a super-expressão de RGMc em células C2C12 não tiveram nenhum efeito na formação de miotubos (Huang et al., 2005; Niederkofler et al., 2005; Kuninger et al., 2006). Mioblastos derivados de uma mutação homozigótica no locus Neo1 desenvolvem miotubos menores que os animais controle com ineficiência na expressão de proteínas músculo-específicas (Pownall et al., 2002; Bae et al., 2009). Um fenótipo similar foi visto em células GFP que receberam o vetor contendo o RNA de interferência para Neogenina, uma vez que miotubos menores e menos miotubos foram produzidos quando comparados às transfecções controle (Kang et al., 2004).

Entretanto, os mecanismos moleculares que permitem RGMa (e possivelmente as demais RGMs) regular o tamanho da célula muscular esquelética são ainda desconhecidos. Como um componente do sarcolema, RGMa poderia estar relacionado ao complexo Neogenina/Netrina como sugerido por nossos fenótipos similares. Esse complexo tem a capacidade de mediar uma série de vias de sinalização que ativa as proteínas E, os fatores miogênicos bHLH, SRF e NFATc3, e direciona a transcrição de genes músculo-específicos que regulam o citoesqueleto de Actina e a diferenciação em miotubos multinucleados (Cole et al., 2004; Krauss, 2005). Netrina-3/Neogenina se liga ao co-receptor CDO para ativar NFATc3, fator reportado como candidato para a regulação da morfologia de mioblastos; e também a Quinase de adesão focal (FAK), e a Quinase regulada por sinal extracelular (ERK), ambos envolvidos na sinalização que regula a formação do miotubo (Yokoyama et al., 2007; Bae et al., 2009; Quach et al., 2009). As Caderinas, também membro desse complexo, sinaliza por meio da ativação de RhoA e do Fator de resposta do soro (SRF), os

quais estimulam a expressão de genes músculo-específicos (Charrasse et al., 2002; Lin et al., 2005). No sistema nervoso central, a ligação RGMa/Neogenina foi também associada às vias de sinalização de RhoA e FAK (Hata et al., 2006; Conrad et al., 2007; Hata et al., 2009). Durante a miogênese, RhoA ativa SRF o qual, estimula a expressão de MyoD além de outros genes músculo-específicos, *in vivo* e *in vitro* (Carnac et al., 1998; Li et al., 2005).

RGMa poderia regular o tamanho da célula muscular por meio de sua capacidade de trabalhar como um co-receptor de BMP (Samad et al., 2005; Babitt et al., 2005; Babitt et al., 2006). A sinalização de BMP via Smad1/5/8 foi recentemente associada à regulação do tamanho da célula muscular esquelética. A super-expressão de ALK3 (receptor de BMP) ampliou a fosforilação de Smad1/5/8, resultando em aumentos no tamanho da fibra, gerando uma hipertrofia muscular (Sartori et al., 2013). Quando Noggin (um antagonista de BMP) foi super-expresso, uma redução da fosforilação de Smad1/5/8 foi observada ocasionando uma atrofia muscular (Sartori et al., 2013). Curiosamente, RGMa e RGMc foram relatados como sendo os mais potentes co-receptores para BMP em mioblastos C2C12. A super-expressão da combinação de RGMa e RGMc nessas células aumentou significativamente a atividade de BMP quando comparada a RGMa ou RGMc individualmente (Halbrooks et al., 2007). De forma oposta, a sub-regulação de RGMa, RGMb ou RGMc resultou num dramático decréscimo na atividade de BMP, a qual foi mais expressiva quando RGMa e RGMc foram suprimidos (Halbrooks et al., 2007). Nossos resultados relacionados à hipertrofia muscular são similares aos fenótipos de ALK3 e é possível que RGMa funcione como um promotor da sinalização de BMP.

Curiosamente, Neogenina e BMP podem atuar em conjunto, indiretamente ou diretamente, para promover seus efeitos. Em seu trabalho, Zhang e colaboradores (2007) demonstraram que a ligação de RGMc à Neogenina é requerida para a liberação da forma solúvel de RGMc das células musculares a qual, atua como um regulador negativo na expressão de Hecpídina hepática por meio da sinalização de BMP. Durante a condrogênese e formação óssea endocondral, Neogenina é necessária para a sinalização de Smad1/5/8 induzida

por BMP. A indução da fosforilação de Smad1/5/8 por BMP2 é reduzida em condrócitos de camundongos mutantes para Neogenina uma vez que a associação do receptor de BMP aos microdomínios de membrana, essencial para a sinalização de BMP via Smad, diminui em condrócitos com deficiência de Neogenina (Zhou et al., 2010). A associação entre Neogenina e BMP pode ser mediada por RGMc, ou ainda RGMa, nessa associação, as RGMs atuam como um elo de ligação entre Neogenina e BMPR (IA) para a formação de um super complexo protéico localizado em microdomínios de membrana (Zhou et al., 2010).

Novos trabalhos serão necessários para elucidar se RGMa promove seus efeitos nas células musculares via Neogenina, BMP ou uma associação de ambos. Nossos achados não revelaram qualquer efeito da super-expressão de RGMa na miogênese. Essas observações estão em concordância com as análises da super-expressão de RGMc. De forma semelhante, a super-expressão de RGMc em células C2C12 não resultaram em quaisquer efeitos sobre a formação de miotubos (Huang et al., 2005; Niederkofler et al., 2005; Kuninger et al., 2006). Entretanto, quando RGMa foi sub-regulado, nossos resultados demonstraram uma redução da habilidade das células primárias em formar miotubos (Figura 22). O mesmo efeito de diminuição na formação de miotubos foi observado por Kang e colaboradores (2004) quando mioblastos C2C12 foram transfectados com um vetor contendo um RNA de interferência para Neogenina. Similarmente, camundongos CDO^{-/-} apresentaram uma miogênese atrasada e músculos menores quando comparados aos controles (Cole et al., 2004; Bae et al., 2009). Em contrapartida, BMP-2 inibe a diferenciação terminal das células miogênicas ao suprimir a atividade transcricional dos fatores miogênicos (Katagiri et al., 1997) e, RGMa, apesar de apresentar a menor afinidade de ligação às BMPs entre as RGMs (Wu et al., 2012), se liga a BMP-2 e BMP-4 (Babitt et al., 2005). Novos estudos serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na sinalização de RGMa e sua influência na diferenciação dos mioblastos.

Finalmente, nossos resultados sugerem que RGMa atue como um regulador positivo na fusão dos mioblastos. A fusão das células musculares esqueléticas ocorre quando mioblastos diferenciados se fundem para formar um

miotubo nascente com alguns núcleos. Subsequentemente, o miotubo nascente se funde aos mioblastos diferenciados dando origem ao miotubo maduro com muitos núcleos. Este processo é orquestrado por uma variedade de moléculas principalmente localizadas no sítios de contato célula-célula e adesão celular (Pavlath, 2010). A sinalização da Integrina via FAK, por exemplo, tem um papel importante na fusão celular uma vez que a inibição de FAK prejudica a fusão dos mioblastos e suprime o aumento da transcrição das Integrinas (Quach et al, 2009). De forma semelhante, camundongos *knockout* para CDO apresentaram também uma falha na fusão e formação de miotubos (Cole et al., 2004; Bae et al., 2009). Como descrito anteriormente, Neogenina também se liga a FAK (De Vries & Cooper, 2008) e a cascata de sinalização de Netrina/Neogenina é dependente de CDO o qual, ativa FAK. Apesar de forma menos proeminente, RGMc também foi associado à via de sinalização de FAK (Bae et al, 2009).

6. Conclusão

- RGMa, um membro da família de orientadores de axônio por repulsão, é encontrado no sarcolema e, possivelmente, como uma proteína do citoesqueleto das células musculares esqueléticas;
- RGMb e RGMc, são moléculas orientadoras de axônios encontradas no sarcolema de células musculares esqueléticas.
- O principal fenótipo causado pela super-expressão de RGMa nas células musculares esqueléticas é a indução da hipertrofia muscular, sugerindo uma associação deste orientador de axônio com o controle do tamanho dessas células.
- RGMa está possivelmente associado ao processo de indução da fusão de mioblastos em miotubos multinucleados.

7. Referências Bibliográficas

ABRAMOVICI, H., GEE, S.H. Morphological changes and spatial regulation of diacylglycerol kinase-zeta, syntrophins, and Rac1 during myoblast fusion. *CELL MOTILITY AND THE CYTOSKELETON* 64(7), 549-67, 2007.

ALVARES, L.E.; SCHUBERT, F.R.; THORPE, C.; MOOTOOSAMY, R.C.; CHENG, L.; PARKYN, G.; LUMSDEN, A.; DIETRICH, S. Intrinsic Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. *DEVELOPMENTAL CELL* 5(3), 379-90, 2003.

AMTHOR, H., OTTO, A., VULIN, A., ROCHAT, A., DUMONCEAUX, J., GARCIA, L., MOUISEL, E., HOURDÉ, C., MACHARIA, R., FRIEDRICH, M., RELAIX, F., ZAMMIT, P.S., MATSAKAS, A., PATEL, K., PARTRIDGE, T. Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 106(18), 7479-84, 2009.

ANDRIOPOULOS, B. JR., CORRADINI, E., XIA, Y., FAASSE, S.A., CHEN, S., GRGUREVIC, L., KNUTSON, M.D., PIETRANGELO, A., VUKICEVIC, S., LIN, H.Y., BABITT, J.L. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *NATURE GENETICS* 41(4), 482-7, 2009.

BABITT, J.L., HUANG, F. W., WRIGHTING, D. M., XIA, Y., SIDIS, Y., SAMAD, T. A, CAMPAGNA, J. A., CHUNG, R. T., SCHNEYER, A. L., WOOLF, C. J., ANDREWS, N. C., LIN, H. Y. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *NATURE GENETICS* 38, 5, 531-539, 2006.

BABITT, J.L., HUANG, F.W., XIA, Y., SIDIS, Y., ANDREWS, N.C., LIN, H.Y. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 117(7), 1933-9, 2007.

BABITT, J.L., ZHANG, Y., SAMAD, T.A., XIA, Y., TANG, J., CAMPAGNA, J.A., SCHNEYER, A.L., WOOLF, C.J., LIN, H.Y. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280, 29820-29827, 2005.

BAE, G.U., YANG, Y.J., JIANG, G., HONG, M., LEE, H.J., TESSIER-LAVIGNE, M., KANG, J.S., KRAUSS, R.S. Neogenin regulates skeletal myofiber size and focal adhesion kinase and extracellular signal-regulated kinase activities in vivo and in vitro. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 20, 4920-4931, 2009.

BAGNALL, K.M., HIGGINS, S.J., SANDERS, E.J. The contribution made by cells from a single somite to tissues within a body segment and assessment of their integration with similar cells from adjacent segments. *DEVELOPMENT* 107:931-43, 1989.

- BAKER, J., LIU, J.P., ROBERTSON, E.J., EFSTRATIADIS, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *CELL* 75 (1), 73-82, 1993.
- BANG, M-L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A.J, GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C.C, LABEIT, D., GREGORIO, C.C., GRANZIER, H., LABEIT, S. The Complete Gene Sequence of Titin, Expression of an Unusual 700-kDa Titin Isoform, and its interaction with Obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *CIRCULATION RESEARCH* 89:1065-1072, 2001.
- BERTHIER, C., BLAINEAU, S. Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle. *REVIEW BIOLOGY CELL* 89,413-434, 1997.
- BISMUTH, K., RELAIX, F. Genetic regulation of skeletal muscle development. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 316(18), 3081-6, 2010.
- BOATENG, S.Y., GOLDSPIK, P.H. Assembly and maintenance of the sarcomere night and day. *CARDIOVASCULAR RESEARCH* 77(4), 667-75, 2008.
- BODINE, S.C., STITT, T.N., GONZALEZ, M., KLINE, W.O., STOVER, G.L., BAUERLEIN, R., ZLOTCHENKO, E., SCRIMGEOUR, A., LAWRENCE, J.C., GLASS, D.J., YANCOPOULOS, G.D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *NATURE CELL BIOLOGY*, 3, 2001.
- BONALDO, P., SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *DISEASE MODELS & MECHANISMS* 6(1), 25-39, 2013.
- BORGHI, N., JAMES NELSON, W. Intercellular adhesion in morphogenesis: molecular and biophysical considerations. *CURRENT TOPICS IN DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 89, 1-32, 2009.
- BORYCKI, A.G., STRUNK, K., SAVARY, R., EMERSON, C.P. Jr. Distinct signal/response mechanisms regulate pax1 and QmyoD activation in sclerotomal and myotomal lineages of quail somites. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 185:185-200, 1997.
- BORYCKI, A., BROWN, A.M., EMERSON, C.P.Jr. Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *DEVELOPMENT* 127(10):2075-87, 2000.
- BORYCKI, A-G., EMERSON, C.P.Jr. Multiple tissue interactions and signal transduction pathways control somite myogenesis. In *Somitogenesis*, ed. C Ordahl, pp. 165-224, 1999.
- BRAUN, T., RUDNICKI, M.A., ARNOLD, H.H., JAENISCH, R. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and

perinatal death. CELL 71(3):369-82, 1992. BRAUN, T., ARNOLD, H.H. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. EMBO JOURNAL, 14:1176-1186, 1995.

BRIANÇON-MARJOLLET, A., GHOGHA, A., NAWABI, H., TRIKI, I., AUZIOL, C., FROMONT, S., PICHÉ, C., ENSLEN, H., CHEBLI, K., CLOUTIER, J.F., CASTELLANI, V., DEBANT, A., LAMARCHE-VANE, N. Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 28(7), 2314-23, 2008.

BRILL, G., KAHANE, N., CARMELI, C., VON SCHACK, D., BARDE, Y.A., KALCHEIM, C. Epithelialmesenchymal conversion of dermatome progenitors requires neural tube-derived signals: characterization of the role of Neurotrophin-3. DEVELOPMENT 121:2583-94, 1995.

BRUGEAUD, A., TONG, M., LUO, L., EDGE, A.S. Inhibition of repulsive guidance molecule, RGMa, increases afferent synapse formation with auditory hair cells. DEVELOPMENTAL NEUROBIOLOGY, 2013.

BRZÓSKA, E., BELLO, V., DARRIBÈRE, T., MORACZEWSKI, J. Integrin alpha3 subunit participates in myoblast adhesion and fusion in vitro. DIFFERENTIATION 74(2-3), 105-18, 2006.

BUCKINGHAM, M., HOUZELSTEIN, D., LYONS, G., ONTELL, M., OTT, M.O., SASSOON, D. Expression of muscle genes in the mouse embryo. SYMPOSIA OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY 46:203-17, 1992.

CAMUS, L.M., LAMBERT, L.A. Molecular Evolution of Hemojuvelin and the Repulsive Guidance Molecule Family. JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION, 65:68-81, 2007.

CARLSSON, L., THORNELL, L.E. Desmin-related myopathies in mice and man. ACTA PHYSIOLOGY SCANDINAVIAN 171, 341-348, 2001.

CARNAC, G., PRIMIG, M., KITZMANN, M., CHAFEY, P., TUIL, D., LAMB, N., FERNANDEZ, A. RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in mouse myoblasts. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 9(7), 1891-902, 1998.

CASTELLANI, V., DE ANGELIS, E., KENWRICK, S., ROUGON, G. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. THE EMBO JOURNAL 21(23), 6348-57, 2002.

CENCIARELLI, C., DE SANTA, F., PURI, P.L., MATTEI, E., RICCI, L., BUCCI, F., FELSANI, A., CARUSO, M. Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 19(7), 5203-17, 1999.

CHAKRAVARTHY, M.V., ABRAHA, T.W., SCHWARTZ, R.J., FIOROTTO, M.L., BOOTH, F.W. Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 275(46), 35942-52, 2000.

CHARBONNIER, F., GASPERA, B.D., ARMAND, A.S., VAN DER LAARSE, W.J., LAUNAY, T., BECKER, C., GALLIEN, C.L., CHANOINE, C. Two myogenin-related genes are differentially expressed in *Xenopus laevis* myogenesis and differ in their ability to transactivate muscle structural genes. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 277(2):1139-47, 2002.

CHARGÉ, S.B., RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* 84(1), 209-38, 2004.

CHARRASSE, S., COMUNALE, F., FORTIER, M., PORTALES-CASAMAR, E., DEBANT, A., GAUTHIER-ROUVIÈRE, C. M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 18(5):1734-43, 2007.

CHARRASSE, S., COMUNALE, F., GRUMBACH, Y., POULAT, F., BLANGY, A., GAUTHIER-ROUVIÈRE, C. RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 17(2), 749-59, 2006.

CHARRASSE, S., MERIANE, M., COMUNALE, F., BLANGY, A., GAUTHIER-ROUVIÈRE, C. N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 158, 953-965, 2002.

CHOI, J., COSTA, M.L., MERMELSTEIN, C.S., CHAGAS, C., HOLTZER, S., HOLTZER, H. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 87(20):7988-92, 1990.

CHRIST, B., BRAND-SABERI, B. Limb muscle development. *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 46(7), 905-14, 2002.

CHRIST, B., ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. *ANATOMY AND EMBRYOLOGY* 191:381-96, 1995.

CIFUENTES-DIAZ, C., NICOLET, M., ALAMEDDINE, H., GOUDOU, D., DEHAUPAS, M., RIEGER, F., MÈGE, R.M. M-cadherin localization in developing adult and regenerating mouse skeletal muscle: possible involvement in secondary myogenesis. *MECHANISMS OF DEVELOPMENT* 50(1), 85-97, 1995.

CINNAMON, Y., BEN-YAIR, R., KALCHEIM, C. Differential effects of N-cadherin-mediated adhesion on the development of myotomal waves. *DEVELOPMENT* 133(6):1101-12, 2006.

CLARK, K.A., MCELHINNY, A.S., BECKERLE, M.C., GREGORIO, C.C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *ANNUAL REVIEW OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 18, 637-706, 2002.

CLARKE, B.A., DRUJAN, D., WILLIS, M.S., MURPHY, L.O., CORPINA, R.A., BUROVA, E., RAKHILIN, S.V., STITT, T.N., PATTERSON, C., LATRES, E., GLASS, D.J. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *CELL METABOLISM* 6(5), 376-85, 2007.

COHEN, S., BRAULT, J.J., GYGI, S.P., GLASS, D.J., VALENZUELA, D.M., GARTNER, C., LATRES, E., GOLDBERG, A.L. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 185(6), 1083-95, 2009.

COLE, F., ZHANG, W., GEYRA, A., KANG, J.S., KRAUSS, R.S. Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO. *DEVELOPMENTAL CELL* 7, 843-854, 2004.

COLEMAN, M.E., DEMAYO, F., YIN, K.C., LEE, H.M., GESKE, R., MONTGOMERY, C., SCHWARTZ, R.J. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 270(20), 12109-16, 1995.

COLLINS, C.A., GNOCCHI, V.F., WHITE, R.B., BOLDRIN, L., PEREZ-RUIZ, A., RELAX, F., MORGAN, J.E., ZAMMIT, P.S. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLOS ONE* 4, e4475, 2009.

CONRAD, S., STIMPFL, F., MONTAZERI, S., OLDEKAMP, J., SEID, K., ALVAREZ-BOLADO, G., SKUTELLA, T. RGMb controls aggregation and migration of Neogenin-positive cells in vitro and in vivo. *MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE* 43(2), 222-31, 2010.

CONRAD, S., GENTH, H., HOFMANN, F., JUST, I., SKUTELLA, T. Neogenin-RGMa signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 282, 16423-16433, 2007.

CORRADINI, E., BABITT, J.L., LIN, H.Y. The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS* 20(5-6), 389-98, 2009.

COSSU, G., BIRESSI, S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle

regeneration. SEMINARS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY 16(4-5), 623-31, 2005.

DAVIS, R.L., WEINTRAUB, H., LASSAR, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. CELL 51(6):987-1000, 1987.

DE VRIES, M., COOPER, H.M. Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 106, 1483-1492, 2008.

DELFINI, M.C., HIRSINGER, E., POURQUIÉ, O., DUPREZ, D. Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. DEVELOPMENT 127(23):5213-24, 2000.

DICKSON G, PECK D, MOORE SE, BARTON CH, WALSH FS. Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. NATURE,344(6264):348-51, 1990.

DIEFENBACH, T.J., LATHAM, V.M., YIMLAMAI, D., LIU, C.A., HERMAN, I.M., JAY, D.G. Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in amellipodial dynamics of the neuronal growth cone. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 158, 7, 1207-1217, 2002.

DIMARIO, J.X., STOCKDALE, F.E. Both myoblast lineage and innervation determine fiber type and are required for expression of the slow myosin heavy chain 2 gene. DEVELOPMENTAL BIOLOGY 188(1), 167-80, 1997.

DOWLING, J.J., VREEDE, A.P., KIM, S., GOLDEN, J., FELDMAN, E.L. Kindlin-2 is required for myocyte elongation and is essential for myogenesis. BMC CELL BIOLOGY 9, 36, 2008.

DRESSEL, U., BAILEY, P.J., WANG, S.C., DOWNES, M., EVANS, R.M., MUSCAT, G.E. A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 276:17007-13, 2001.

DUAN, R., GALLAGHER, P.J. Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA. DEVELOPMENTAL BIOLOGY 325(2), 374-85, 2009.

EDMONDSON, D.G., OLSON, E.N. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. GENES AND DEVELOPMENT 3(5):628-40, 1989.

EMERSON, C.P. Myogenesis and developmental control genes. CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY 2(6):1065-75, 1990.

ENDO, M., YAMASHITA, T. Inactivation of Ras by p120GAP via Focal Adhesion Kinase Dephosphorylation Mediates RGMa-Induced Growth Cone Collapse. The Journal of Neuroscience, 29(20):6649 - 6662 •6649, 2009.

EPSTEIN, N.D., DAVIS, J.S. Sensing stretch is fundamental. *CELL* 112(2), 147-50, 2003.

FENG, J., WANG, T., LI, Q., WU, X., QIN, X. RNA interference against repulsive guidance molecule A improves axon sprout and neural function recovery of rats after MCAO/reperfusion. *EXPERIMENTAL NEUROLOGY* 238(2), 235-42, 2012.

FIELITZ, J., KIM, M.S., SHELTON, J.M., LATIF, S., SPENCER, J.A., GLASS, D.J., RICHARDSON, J.A., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E.N. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 117(9), 2486-95, 2007.

FISHER, M.E., ISAACS, H.V., POWNALL, M.E. eFGF is required for activation of XmyoD expression in the myogenic cell lineage of *Xenopus laevis*. *DEVELOPMENT* 129(6):1307-15, 2002.

FRANK, D., KUHN, C., KATUS, H.A., FREY, N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (BERLIN)* 84(6), 446-68, 2006.

FUCHS, E., WEBER, K. Intermediate filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. *ANNUAL REVIEWS BIOCHEMISTRY* 63:345-82, 1994.

FÜRST, D.O., OSBORN, M., NAVE, R., WEBER, K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 106(5), 1563-72, 1988.

GALLO, G., LETOURNEAU, P.C. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *JOURNAL OF NEUROBIOLOGY* 58(1):92-102, 2004.

GALLO, G., YEE, H.F.JR., LETOURNEAU, P.C. Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 158(7), 1219-28, 2002.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *BLOOD JOURNAL* 102(3), 783-8, 2003.

GAVARD, J., MARTHIENS, V., MONNET, C., LAMBERT, M., MÈGE, R.M. N-cadherin activation substitutes for the cell contact control in cell cycle arrest and myogenic differentiation: involvement of p120 and beta-catenin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 279(35), 36795-802, 2004.

GEISBRECHT, B.V., DOWD, K.A., BARFIELD, R.W., LONGO, P.A., LEAHY, D.J. Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 278(35), 32561-8, 2003.

GESSERT, S., MAURUS, D., KÜHL, M. Repulsive guidance molecule A (RGM A) and its receptor neogenin during neural and neural crest cell development of *Xenopus laevis*. *BIOLOGY OF THE CELL* 100(11), 659-73, 2008.

GIBSON, M.C., SCHULTZ, E. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *THE ANATOMICAL RECORD* 202(3), 329-37, 1982.

GOICHBERG, P., GEIGER, B. Direct involvement of N-cadherin-mediated signaling in muscle differentiation. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 9(11):3119-31, 1998.

GOLDSTEIN, M.A., MICHAEL, L.H., SCHROETER, J.P., SASS, R.L. Structural states in the Z band of skeletal muscle correlate with states of active and passive tension. *JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY* 92:113-119, 1988.

GOLDSTEIN, M.A., SCHROETER, J.P., SASS, R.L. Two structural states of the vertebrate Z band. *ELECTRON MICROSCOPY REVIEWS* 3:227-248, 1990.

GROS, J., MANCEAU, M., THOMÉ, V., MARCELLE, C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *NATURE* 435(7044), 954-8, 2005.

GUASCONI, V., PURI, P.L. Chromatin: the interface between extrinsic cues and the epigenetic regulation of muscle regeneration. *TRENDS IN CELL BIOLOGY* 19(6):286-94, 2009.

GUSTAFSSON, M.K., PAN, H., PINNEY, D.F., LIU, Y., LEWANDOWSKI, A., EPSTEIN, D.J., EMERSON, C.P.Jr. Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *GENES AND DEVELOPMENT* 16(1):114-26, 2002.

HALBROOKS, P.J., DING, R., WOZNEY, J.M., BAIN, G. Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *Journal of Molecular Signaling* 2, 4, 2007.

HATA, K., FUJITANI, M., YASUDA, Y., DOYA, H., SAITO, T., YAMAGISHI, S., MUELLER, B.K., YAMASHITA, T. RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 173, 47-58, 2006.

HATA, K., KAIBUCHI, K., INAGAKI, S., YAMASHITA, T. Unc5B associates with LARG to mediate the action of repulsive guidance molecule. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 184, 737-750, 2009.

HAWKINS, T.A., HARAMIS, A.P., ETARD, C., PRODROMOU, C., VAUGHAN, C.K., ASHWORTH, R., RAY S., BEHRA, M., HOLDER, N., TALBOT, W.S., PEARL, L.H.,

STRÄHLE, U., WILSON, S.W. The ATPase-dependent chaperoning activity of Hsp90a regulates thick filament formation and integration during skeletal muscle myofibrillogenesis. *DEVELOPMENT* 135, 1147-1156, 2008.

HINTERBERGER, T.J., SASSOON, D.A., RHODES, S.J., KONIECZNY, S.F. Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 147(1):144-56, 1991.

HIRSINGER, E., MALAPERT, P., DUBRULLE, J., DELFINI, M.C., DUPREZ, D., HENRIQUE, D., ISH-HOROWICZ, D., POURQUIÉ, O. Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *DEVELOPMENT* 128(1):107-16, 2001.

HOLLENBERG, S.M., CHENG, P.F., WEINTRAUB, H. Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 90(17), 8028-32, 1993.

HOLLNAGEL, A., OEHLMANN, V., HEYMER, J., RÜTHER, U., NORDHEIM, A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 274(28), 19838-45, 1999.

HONG, K., HINCK, L., NISHIYAMA, M., POO, M.M., TESSIER-LAVIGNE, M., STEIN, E. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC Family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *CELL* 97(7), 927-41, 1999.

HORSLEY, V., FRIDAY, B.B., MATTESON, S., KEGLEY, K.M., GEPHART, J., PAVLATH, G.K. Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 153(2), 329-38, 2001.

HORSLEY, V., JANSEN, K.M., MILLS, S.T., PAVLATH, G.K. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *CELL* 113(4), 483-94, 2003.

HUANG, F.W., PINKUS, J.L., PINKUS, G.S., FLEMING, M.D., ANDREWS, N.C. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 115, 8, 2005.

ITOKAZU, T., FUJITA, Y., TAKAHASHI, R., YAMASHITA, T. Identification of the neogenin-binding site on the repulsive guidance molecule A. *PLOS ONE* 7, e32791, 2012.

JACOBS-EL, J., ZHOU, M.Y., RUSSELL, B. MRF4, Myf-5, and myogenin mRNAs in the adaptive responses of mature rat muscle. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 268(4 Pt 1):C1045-52, 1995.

ITOKAZU, T., FUJITA, Y., TAKAHASHI, R., YAMASHITA, T. Identification of the neogenin-binding site on the repulsive guidance molecule A. PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE ONE 7(3), e32791, 2012.

JANSEN, K.M., PAVLATH, G.K. Molecular control of mammalian myoblast fusion. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 475, 115-33, 2008.

JORGE, E.C., AHMED, M.U., BOTHE, I., COUTINHO, L.L., DIETRICH, S. RGMa and RGMB expression pattern during chicken development suggest unexpected roles for these repulsive guidance molecules in notochord formation, somitogenesis, and myogenesis. DEVELOPMENTAL DYNAMICS 241, 1886-1900, 2012.

KABLAR, B., KRASTEL, K., YING, C., ASAKURA, A., TAPSCOTT, S.J., RUDNICKI, M.A. MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. DEVELOPMENT 124(23):4729-38, 1997.

KANG, J.S., YI, M.J., ZHANG, W., FEINLEIB, J.L., COLE, F., KRAUSS, R.S. Netrins and neogenin promote myotube formation. THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY 167, 493-504, 2004.

KANOMATA, K., KOKABU, S., NOJIMA, J., FUKUDA, T., KATAGIRI, T. DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. GENES TO CELLS 14, 695-702, 2009.

KASSAR-DUCHOSSOY, L., GIACONE, E., GAYRAUD-MOREL, B., JORY, A., GOMÈS, D., TAJBAKSH, S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. GENES AND DEVELOPMENT 19(12), 1426-31, 2005.

KATAGIRI, T., AKIYAMA, S., NAMIKI, M., KOMAKI, M., YAMAGUCHI, A., ROSEN, V., WOZNEY, J., FUJISAWA-SEHARA, A., SUDA T. Bone Morphogenetic Protein-2 Inhibits Terminal Differentiation of Myogenic Cells by Suppressing the Transcriptional Activity of MyoD and Myogenin. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 230, 342-351, 1997.

KEE, N., WILSON, N., DE VRIES, M., BRADFORD, D., KEY, B., COOPER, H.M. Neogenin and RGMa Control Neural Tube Closure and Neuroepithelial Morphology by Regulating Cell Polarity. THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 28(48):12643-12653, 2008.

KENNEY, A.M., ROWITCH, D.H. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. Mol Cell Biol. 20(23):9055-67, 2000.

KIM, S., SHILAGARDI, K., ZHANG, S., HONG, S.N., SENS, K.L., BO, J., GONZALEZ, G.A., CHEN, E.H. A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. DEVELOPMENTAL CELL 12(4), 571-86, 2007.

KITAYAMA, M., UENO, M., ITAKURA, T., YAMASHITA, T. Activated microglia inhibit axonal growth through RGMa. PLOS ONE 6, e25234, 2011.

KNUDSEN, K.A., HORWITZ, A.F. Tandem events in myoblast fusion. DEVELOPMENTAL BIOLOGY 58(2), 328-38, 1977.

KONG, Y., ROGERS, M.R., QIN, X. Effective neuroprotection by ischemic postconditioning is associated with a decreased expression of RGMa and inflammation mediators in ischemic rats. NEUROCHEMICAL RESEARCH 38, 815-825, 2013.

KRAUSS, R.S. Regulation of promyogenic signal transduction by cell-cell contact and adhesion. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 316, 3042-3049, 2010.

KRAUSS, R.S., COLE, F., GAIO, U., TAKAESU, G., ZHANG, W., KANG, J.S. Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. JOURNAL OF CELL SCIENCE 118, 2355-2362, 2005.

KUANG, S., GILLESPIE, M. A., RUDNICKI, M. A. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. CELL STEM CELL, 2(1):22-31, 2008.

KUBO, T., ENDO, M., HATA, K., TANIGUCHI, J., KITAJO, K., TOMURA, S., YAMAGUCHI, A., MUELLER, B.K., YAMASHITA, T. Myosin IIA is required for neurite outgrowth inhibition produced by repulsive guidance molecule. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, 105, 113-126, 2008.

KUCHARCZUK, K.L., LOVE, C.M., DOUGHERTY, N.M., GOLDHAMER, D.J. Fine-scale transgenic mapping of the MyoD core enhancer: MyoD is regulated by distinct but overlapping mechanisms in myotomal and non-myotomal muscle lineages. DEVELOPMENT 126(9):1957-65, 1999.

KUIPER, J.W., PLUK, H., OERLEMANS, F., VAN LEEUWEN, F.N., DE LANGE, F., FRANSEN, J., WIERINGA, B. Creatine kinase-mediated ATP supply fuels actin-based events in phagocytosis. PLOS BIOLOGY 6(3), e51, 2008.

KUNINGER, D., KUNS-HASHIMOTO, R., KUZMICKAS, R., ROTWEIN, P. Complex biosynthesis of the muscle-enriched iron regulator RGMc. JOURNAL OF CELL SCIENCE 119, 3273-3283, 2006.

KUNINGER, D., KUNS-HASHIMOTO, R., NILI, M., ROTWEIN, P. Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. BMC BIOCHEMISTRY 9, 9, 2008.

LAFUSTE, P., SONNET, C., CHAZAUD, B., DREYFUS, P.A., GHERARDI, R.K., WEWER, U.M., AUTHIER, F.J. ADAM12 and alpha9beta1 integrin are

instrumental in human myogenic cell differentiation. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 16(2), 861-70, 2005.

LAH, G.J., KEY, B. Dual roles of the chemorepellent axon guidance molecule RGMA in establishing pioneering axon tracts and neural fate decisions in embryonic vertebrate forebrain. *DEVELOPMENTAL NEUROBIOLOGY* 72(11), 1458-70, 2012.

LANGE, S., EHLER, E., GAUTEL, M. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *TRENDS IN CELL BIOLOGY* 16(1), 11-8, 2006.

LANGLEY, B., THOMAS, M., BISHOP, A., SHARMA, M., GILMOUR, S., KAMBADUR, R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 277(51), 49831-40, 2002.

LASSAR, A.B., DAVIS, R.L., WRIGHT, W.E., KADESCH, T., MURRE, C., VORONOVA, A., BALTIMORE, D., WEINTRAUB, H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *CELL* 66(2):305-15, 1991.

LECKER, S.H., GOLDBERG, A.L., MITCH, W.E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY* 17(7), 1807-19, 2006.

LEE, S.J., MCPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 98(16), 9306-11, 2001.

LI, S., CZUBRYT, M.P., MCANALLY, J., BASSEL-DUBY, R., RICHARDSON, J.A., WIEBEL, F.F., NORDHEIM, A., OLSON, E.N. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 102(4), 1082-7, 2005.

LI, X., GAO, X., LIU, G., XIONG, W., WU, J., RAO, Y. Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *NATURE NEUROSCIENCE* 11(1), 28-35, 2008.

LIN, L., GOLDBERG, Y.P., GANZ, T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *BLOOD* 106, 2884-2889, 2005.

LIN, L., NEMETH, E., GOODNOUGH, J.B., THAPA, D.R., GABAYAN, V., GANZ, T. Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. *BLOOD CELLS, MOLECULES AND DISEASES* 40(1), 122-31, 2008.

LIU, J.P., BAKER, J., PERKINS, A.S., ROBERTSON, E.J., EFSTRATIADIS, A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *CELL* 75 (1), 59-72, 1993.

LIU, X., HASHIMOTO, M., HORII, H., YAMAGUCHI, A., NAITO, K., YAMASHITA, T. Repulsive guidance molecule b inhibits neurite growth and is increased after spinal cord injury. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 382(4), 795-800, 2009.

LÓPEZ-ROVIRA, T., CHALAUX, E., MASSAGUÉ, J., ROSA, J.L., VENTURA, F. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 277(5), 3176-85, 2002.

LU, M., KRAUSS, R.S. N-cadherin ligation, but not Sonic hedgehog binding, initiates CDO-dependent p38alpha/beta MAPK signaling in skeletal myoblasts. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 107(9):4212-7, 2010.

LUTHER, P.K. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *JOURNAL OF MUSCLE RESEARCH AND CELL MOTILITY* 30(5-6), 171-85, 2009.

LYONS, G.E., MOORE, R., YAHARA, O., BUCKINGHAM, M.E., WALSH, F.S. Expression of NCAM isoforms during skeletal myogenesis in the mouse embryo. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 194(2), 94-104, 1992.

MAK, K.L., TO, R.Q., KONG, Y., KONIECZNY, S.F. The MRF4 activation domain is required to induce muscle-specific gene expression. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 12(10):4334-46, 1992.

MATSAKAS, A., PATEL, K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY* 24(5), 611-29, 2009.

MATSUNAGA, E., NAKAMURA, H., CHEDOTAL, A. Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. *THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE : THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE* 26, 6082-6088, 2006.

MATSUNAGA, E., TAUSZIG-DELAMASURE, S., MONNIER, P.P., MUELLER, B.K., STRITTMATTER, S.M., MEHLEN, P., CHEDOTAL, A. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *NATURE CELL BIOLOGY* 6, 749-755, 2004.

MAWDSLEY, D.J., COOPER, H.M., HOGAN, B.M., CODY, S.H., LIESCHKE, G.J., HEATH, J.K. The Netrin receptor Neogenin is required for neural tube formation

and somitogenesis in zebrafish. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 269(1), 302-15, 2004.

MCCROSKERY, S., THOMAS, M., MAXWELL, L., SHARMA, M., KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 162(6), 1135-47, 2003.

MCFARLANE, C., PLUMMER, E., THOMAS, M., HENNEBRY, A., ASHBY, M., LING, N., SMITH, H., SHARMA, M., KAMBADUR, R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 209(2), 501-14, 2006.

MCKINSEY, T.A., ZHANG, C.L., OLSON, E.N. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *CURRENT OPINION IN GENETICS AND DEVELOPMENT* 11(5):497-504, 2001.

MCPHERRON, A.C., LAWLER, A.M., LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *NATURE* 387(6628), 83-90, 1997.

MERZ, D.C., ZHENG, H., KILLEEN, M.T., KRIZUS, A., CULOTTI, J.G. Multiple signaling mechanisms of the UNC-6/netrin receptors UNC-5 and UNC-40/DCC in vivo. *GENETICS* 158(3), 1071-80, 2001.

MESSINA, G., COSSU, G. The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. *GENES AND DEVELOPMENT* 23(8), 902-5, 2009.

METZGER, M., CONRAD, S., ALVAREZ-BOLADO, S., SKUTELLA, T., JUST L. Gene expression of the repulsive guidance molecules during development of the mouse intestine. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 234:169 -175, 2005.

METZGER, M., CONRAD, S., SKUTELLA, T., JUST, L. RGMA inhibits neurite outgrowth of neuronal progenitors from murine enteric nervous system via the neogenin receptor in vitro. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* 103(6), 2665-78, 2007.

MINER, J.H., WOLD, B. Herculim, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 87(3):1089-93, 1990.

MIYAZONO, K., MIYAZAWA, K. Id: a target of BMP signaling. *SCIENCE SIGNALING* 2002(151), pe40, 2002.

MONNIER, P.P., SIERRA, A., MACCHI, P., DEITINGHOFF, L., ANDERSEN, J.S., MANN, M., FLAD, M., HORNBERGER, M.R., STAHL, B., BONHOEFFER, F.,

MUELLER, B.K. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *NATURE* 419, 392-395, 2002.

MORISSETTE, M.R., COOK, S.A., BURANASOMBATI, C., ROSENBERG, M.A., ROSENZWEIG, A. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - CELL PHYSIOLOGY* 297(5), C1124-32, 2009.

MOSS, F.P., LEBLOND, C.P. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *THE ANATOMICAL RECORD* 170(4), 421-35, 1971.

MUELLER, B.K., YAMASHITA, T., SCHAFFAR, G., MUELLER, R. The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system. *BIOLOGICAL SCIENCES* 361, 1513-1529, 2006.

MÜLLER, B.K., JAY, D.G., BONHOEFFER, F. Chromophore-assisted laser inactivation of a repulsive axonal guidance molecule. *CURRENT BIOLOGY* 6(11), 1497-502, 1996.

NABESHIMA, Y., HANAOKA, K., HAYASAKA, M., ESUMI, E., LI, S., NONAKA, I., NABESHIMA, Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *NATURE* 364(6437):532-5, 1993.

NEMETH, E., TUTTLE, M.S., POWELSON, J., VAUGHN, M.B., DONOVAN, A., WARD, D.M., GANZ, T., KAPLAN, J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *SCIENCE* 306(5704), 2090-3, 2004.

NICOLAS, N., MIRA, J.C., GALLIEN, C.L., CHANOINE, C. Neural and hormonal control of expression of myogenic regulatory factor genes during regeneration of *Xenopus* fast muscles: myogenin and MRF4 mRNA accumulation are neurally regulated oppositely. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS* 218(1):112-22, 2000.

NIEDERKOFER, V., SALIE, R., SIGRIST, M., ARBER, S. Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. *THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE* 24, 808-818, 2004.

NIEDERKOFER, V., SALIE, R., ARBER, S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, 115, 8, 2005.

NOWICKI, J.L., BURKE, A.C. Hox genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *DEVELOPMENT* 127:4265-75, 2000.

O'CONNOR, R.S., STEEDS, C.M., WISEMAN, R.W., PAVLATH, G.K. Phosphocreatine as an energy source for actin cytoskeletal rearrangements during myoblast fusion. *THE JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 586(Pt 12), 2841-53, 2008.

OKAMURA, Y., KOHMURA, E., YAMASHITA, T. TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule. *NEUROSCIENCE RESEARCH* 71, 63-70, 2011.

OLDEKAMP, J., KRÄMMER, N., ALVAREZ-BOLADO, G., SKUTELLA, T. Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. *Gene Expression Patterns* 4, 283-288, 2004.

OLSON, E.N., ARNOLD, H.H., RIGBY, P.W., WOLD, B.J. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *CELL* 85(1):1-4, 1996.

OTTEN, A.D., FIRPO, E.J., GERBER, A.N., BRODY, L.L., ROBERTS, J.M., TAPSCOTT, S.J. Inactivation of MyoD-mediated expression of p21 in tumor cell lines. *CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION* 8(11), 1151-60, 1997.

OTTO, A., PATEL, K. Signalling and the control of skeletal muscle size. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 316(18), 3059-66, 2010.

PAGE, S., MILLER, J.B., DIMARIO, J.X., HAGER, E.J., MOSER, A., STOCKDALE, F.E. Developmentally regulated expression of three slow isoforms of myosin heavy chain: diversity among the first fibers to form in avian muscle. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 154(1), 118-28, 1992.

PAPANIKOLAOU, G., SAMUELS, M.E., LUDWIG, E.H., MACDONALD, M.L., FRANCHINI, P.L., DUBE, M.P., ANDRES, L., MACFARLANE, J., SAKELLAROPOULOS, N., POLITOU, M., NEMETH, E., THOMPSON, J., RISLER, J.K., ZABOROWSKA, C., BABAKAUFF, R., RADOMSKI, C.C., PAPE, T.D., DAVIDAS, O., CHRISTAKIS, J., BRISSOT, P., LOCKITCH, G., GANZ, T., HAYDEN, M.R., GOLDBERG, Y.P. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *NATURE GENETICS* 36, 77-82, 2004.

PAULIN, D., LI, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 301 1-7, 2004.

PARDO, J.V., SILICIANO, J.D., CRAIG, S.W. A vinculincontaining cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ('costameres') mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *PROCEEDINGS OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE* 80, 1008-1012, 1983.

PAVLATH, G.K. Spatial and functional restriction of regulatory molecules during mammalian myoblast fusion. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 316(18), 3067-72, 2010.

PAVLATH, G.K., HORSLEY, V. Cell fusion in skeletal muscle--central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *CELL CYCLE* 2(5), 420-3, 2003.

PECK D, WALSH FS. Differential effects of over-expressed neural cell adhesion molecule isoforms on myoblast fusion. *J. Cell Biol.* 123: 1587- 1595, 1993.

PECKHAM, M. Engineering a multi-nucleated myotube, the role of the actin cytoskeleton. *JOURNAL OF MICROSCOPY* 231(3), 486-93, 2008.

PIETRANGELO, A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *HEPATOLOGY* 46, 1291-1301, 2007.

POURQUIÉ, O., FAN, C.M., COLTEY, M., HIRSINGER, E., WATANABE, Y., BRÉANT, C., FRANCIS-WEST, P., BRICKELL, P., TESSIER-LAVIGNE, M., LE DOUARIN, N.M. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *CELL* 84(3):461-71, 1996.

POWNALL, M.E., EMERSON, C.P.Jr. Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 151(1):67-79, 1992.

POWNALL, M.E., GUSTAFSSON, M.K., EMERSON, C.P.Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *ANNUAL REVIEW OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 18:747-83, 2002.

PURI, P.L., IEZZI, S., STIEGLER, P., CHEN, T.T., SCHILTZ, R.L., MUSCAT, G.E., GIORDANO, A., KEDES, L., WANG, J.Y., SARTORELLI, V. Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. *MOLECULES AND CELLS* 8(4):885-97, 2001.

PYLE, W.G., SOLARO, R.J. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *CIRCULATION RESEARCH* 94(3), 296-305, 2004.

QUACH, N.L., BIRESSI, S., REICHARDT, L.F., KELLER, C., RANDO, T.A. Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 20(14), 3422-35, 2009.

RAJAGOPALAN, S., DEITINGHOFF, L., DAVIS, D., CONRAD, S., SKUTELLA, T., CHEDOTAL, A., MUELLER, B.K., STRITTMATTER, S.M. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *NATURE CELL BIOLOGY* 6, 756-762, 2004.

- RAJASEKHARAN, S., KENNEDY, T.E. The netrin protein family. *GENOME BIOLOGY* 10(9), 239, 2009.
- RELAIX, F., ROCAN COURT, D., MANSOURI, A., BUCKINGHAM M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *NATURE* 435(7044), 948-53, 2005.
- RESHEF, R., MAROTO, M., LASSAR, A.B. Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *GENES AND DEVELOPMENT* 12(3):290-303, 1998.
- RHODES, S.J., KONIECZNY, S.F. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *GENES AND DEVELOPMENT* 3(12B):2050-61, 1989.
- ROCHAT, A., FERNANDEZ, A., VANDROMME, M., MOLÈS, J.P., BOUSCHET, T., CARNAC, G., LAMB, N.J. Insulin and wnt1 pathways cooperate to induce reserve cell activation in differentiation and myotube hypertrophy. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 15(10), 4544-55, 2004.
- ROCHLIN, K., YU, S., ROY, S., BAYLIES, M.K. Myoblast fusion: when it takes more to make one. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 341(1):66-83, 2009.
- RODRIGUEZ, A., PAN, P., PARKKILA, S. Expression studies of neogenin and its ligand hemojuvelin in mouse tissues. *THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY* 55, 85-96, 2007.
- RUDNICKI, M.A., BRAUN, T., HINUMA, S., JAENISCH, R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *CELL* 71(3):383-90, 1992.
- RUDNICKI, M.A., SCHNEGELSBERG, P.N., STEAD, R.H., BRAUN, T., ARNOLD, H.H., JAENISCH, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *CELL* 75, 1351-1359, 1993.
- RUI, Y., BAI, J., PERRIMON, N. Sarcomere Formation Occurs by the Assembly of Multiple Latent Protein Complexes. *PLOS ONE*, 6, 11, 2010.
- SAITOH, O., ARAI, T., OBINATA, T. Distribution of microtubules and other cytoskeletal filaments during myotube elongation as revealed by fluorescence microscopy. *CELL AND TISSUE RESEARCH* 252(2), 263-73, 1988.
- SALTIN B., HENRIKSSON J., NYGAARD E., ANDERSEN P. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *ANNUAL NEW YORK ACADEMY OF SCIENCE* 301: 3-44, 1977.

SAMAD, T.A., REBBAPRAGADA, A., BELL, E., ZHANG, Y., SIDIS, Y., JEONG, S.J., CAMPAGNA, J.A., PERUSINI, S., FABRIZIO, D.A., SCHNEYER, A.L., LIN, H.Y., BRIVANLOU, A.H., ATTISANO, L., WOOLF, C.J. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 280, 14122-14129, 2005.

SAMAD, T.A., SRINIVASAN, A., KARCHEWSKI, L.A., JEONG, S.J., CAMPAGNA, J.A., JI, R.R., FABRIZIO, D.A., ZHANG, Y., LIN, H.Y., BELL, E., WOOLF, C.J. DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE 24, 2027-2036, 2004.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. PHYSIOLOGY (BETHESDA) 23, 160-70, 2008.

SARTORELLI, V., FULCO, M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. SCIENCE'S STKE: SIGNAL TRANSDUCTION KNOWLEDGE ENVIRONMENT 244(11), 2004.

SARTORI, R., SCHIRWIS, E., BLAAUW, B., BORTOLANZA, S., ZHAO, J., ENZO, E., STANTZOU, A., MOUISEL, E., TONIOLO, L., FERRY, A., STRICKER, S., GOLDBERG, A.L., DUPONT, S., PICCOLO, S., AMTHOR, H., SANDRI, M. BMP signaling controls muscle mass. NATURE GENETICS 45(11), 1309-18, 2013.

SCHAFFAR, G., TANIGUCHI, J., BRODBECK, T., MEYER, A.H., SCHMIDT, M., YAMASHITA, T., MUELLER, B.K. LIM-only protein 4 interacts directly with the repulsive guidance molecule A receptor Neogenin. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 107(2), 418-31, 2008.

SCHIAFFINO, S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. ACTA PHYSIOLOGY, 199, 451-463, 2010.

SCHIAFFINO, S., BORMIOLI, S.P., ALOISI, M. The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. VIRCHOWS ARCHIVE B: CELL PATHOLOGY 21(2), 113-8, 1976.

SCHIAFFINO, S., HANZLIKOVA, V. & PIEROBON, S. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. JOURNAL OF CELLULAR BIOLOGY 47, 107-119, 1970.

SCHIENDA, J., ENGLEKA, K.A., JUN, S., HANSEN, M.S., EPSTEIN, J.A., TABIN, C.J., KUNKEL, L.M., KARDON, G. Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 103(4), 945-50, 2006.

SCHMALBRUCH, H., HELHAMMER, U. The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *THE ANATOMICAL RECORD* 189(2), 169-75, 1977.

SCHMIDTMER, J., ENGELKAMP, D. Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. *GENE EXPRESSION PATTERNS : GEP* 4, 105-110, 2004.

SCHULTZ, E., GIBSON, M.C., CHAMPION, T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* 206(3), 451-6, 1978.

SCHWANDER, M., LEU, M., STUMM, M., DORCHIES, O.M., RUEGG, U.T., SCHITTNY, J., MÜLLER, U. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *DEVELOPMENTAL CELL* 4(5), 673-85, 2003.

SEED, J., HAUSCHKA, S.D. Temporal separation of the migration of distinct myogenic precursor populations into the developing chick wing bud. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 106(2), 389-93, 1984.

SHANELY, R.A., ZWETSLOOT, K.A., CHILDS, T.E., LEES, S.J., TSIKA, R.W., BOOTH, F.W. IGF-I activates the mouse type IIb myosin heavy chain gene. *THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - CELL PHYSIOLOGY* 297(4), C1019-27, 2009.

SHI, J., LUO, L., EASH, J., IBEBUNJO, C., GLASS, D.J. The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *DEVELOPMENTAL CELL* 21(5), 835-47, 2011.

SHI, Y., MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *CELL* 113(6), 685-700, 2003.

SILVESTRI, L., PAGANI, A., NAI, A., DE DOMENICO, I., KAPLAN, J., CAMASCHELLA, C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *CELL METABOLISM* 8(6), 502-11, 2008.

SMALL, J.V., FUERST, D.O., THORNELL, L.-E. The cytoskeletal lattice of muscle cells. *EUROPEAN JOURNAL BIOCHEMISTRY* 208,559-572, 1992.

SNOW, M.H. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *THE ANATOMICAL RECORD* 207(4), 593-604, 1983.

SOHN, R.L., HUANG, P., KAWAHARA, G., MITCHELL, M., GUYON, J., KALLURI, R., KUNKEL, L.M., GUSSONI, E. A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate

skeletal muscle cell fusion. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 106(23):9274-9, 2009.

SQUIRE, J.M., AL-KHAYAT, H.A., KNUPP, C., LUTHER, P.K. Molecular architecture in muscle contractile assemblies. ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY 71, 17-87, 2005.

SRINIVAS, B.P., WOO, J., LEONG, W.Y., ROY, S. A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. NATURE GENETICS 39(6), 781-6, 2007.

STÄDLER, B., BLÄTTLER, T.M., FRANCO-OBREGÓN, A. Time-lapse imaging of in vitro myogenesis using atomic force microscopy. Journal of Microscopy 237(1), 63-9, 2010.

STARON, R.S., PETTE, D. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. Histochemistry, 100, 149-153, 1993.

STOCKDALE, F.E. Myogenic cell lineages. DEVELOPMENTAL BIOLOGY 154(2), 284-98, 1992.

TAJBAKHSH S, BOBER E, BABINET C, POURNIN S, ARNOLD HH, BUCKINGHAM M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. DEVELOPMENTAL DYNAMICS 206:291-300, 1996.

TAJBAKHSH S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, 2009; 266: 372-389, 2009.

TAJBAKHSH, S., BUCKINGHAM, M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. In Somitogenesis, ed. C Ordahl, pp. 225-68, 1999.

TAJBAKHSH, S., ROCANCOURT, D., BUCKINGHAM, M. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. NATURE 384(6606):266-70, 1996.

TAKAHASHI, K., HATTORI, A. Alpha-actinin is a component of the Z-filament, a structural backbone of skeletal muscle Z-disks. THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 105(4), 529-36, 1989.

TASSEW N.G., CHARISH J., CHESTOPALOVA L., MONNIER P.P. Sustained in vivo inhibition of protein domains using single-chain Fv recombinant antibodies and its application to dissect RGMa activity on axonal outgrowth. JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 28;29(4):1126-31, 2009.

TASSEW, N.G., CHARISH, J., SEIDAH, N.G., MONNIER, P.P. SKI-1 and Furin generate multiple RGMa fragments that regulate axonal growth. DEVELOPMENTAL CELL 22, 391-402, 2012.

TASSEW, N.G., CHESTOPOLAVA, L., BEECROFT, R., MATSUNAGA, E., TENG, H., CHEDOTAL, A., MONNIER, P.P. Intraretinal RGMa is involved in retino-tectal mapping. MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE 37(4), 761-9, 2008.

TEN DIJKE, P., KORCHYNSKYI, O., VALDIMARSDOTTIR, G., GOUMANS, M.J. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY 211(1-2), 105-13, 2003.

THOMAS, M., LANGLEY, B., BERRY, C., SHARMA, M., KIRK, S., BASS, J., KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 275(51), 40235-43, 2000.

TINTIGNAC, L. A., LAGIRAND, J., BATONNET, S., SIRRI, V., LEBOVITCH, M. P. AND LEBOVITCH, S. A. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 280, 2847-2856, 2005.

TULLIO, A.N., BRIDGMAN, P.C., TRESSER, N.J., CHAN, C., CONTI, M.A., ADELSTEIN, R.S., HARA, Y. Structural Abnormalities Develop in the Brain After Ablation of the Gene Encoding Nonmuscle Myosin II-B Heavy Chain. THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY, 433, 62-74, 2001.

VAN DEN HEUVEL, D.M., HELLEMONS, A.J., PASTERKAMP, R.J. Spatiotemporal expression of repulsive guidance molecules (RGMs) and their receptor neogenin in the mouse brain. PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE ONE 8(2), e55828, 2013.

VASYUTINA, E., MARTARELLI, B., BRAKEBUSCH, C., WENDE, H., BIRCHMEIER, C. The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 106(22), 8935-40, 2009.

VENUTI, J.M., MORRIS, J.H., VIVIAN, J.L., OLSON, E.N., KLEIN, W.H. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. JOURNAL OF CELL BIOLOGY 128(4):563-76, 1995.

WALSH, D.W., GODSON, C., BRAZIL, D.P., MARTIN, F. Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. TRENDS CELL BIOLOGY 20, 244-256, 2010.

WALSH, K., PERLMAN, H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. CURRENT OPINION IN GENETICS AND DEVELOPMENT 7(5), 597-602, 1997.

WANG, J., SHANER, N., MITTAL, B., ZHOU, Q., CHEN, J., SANGER, J.M., SANGER, J.W. Dynamics of Z-band based proteins in developing skeletal muscle cells. *CELL MOTILITY AND THE CYTOSKELETON* 61(1), 34-48, 2005.

WEINTRAUB, H., DAVIS, R., TAPSCOTT, S., THAYER, M., KRAUSE, M., BENEZRA, R., BLACKWELL, T.K., TURNER, D., RUPP, R., HOLLENBERG, S. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *SCIENCE* 251(4995):761-6, 1991.

WOKKE, J.H., VAN DEN OORD, C.J., LEPPINK, G.J., JENNEKENS, F.G. Perisynaptic satellite cells in human external intercostal muscle: a quantitative and qualitative study. *THE ANATOMICAL RECORD* 223(2), 174-80, 1989.

WRIGHT, W.E., SASSOON, D.A., LIN, V.K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *CELL* 56(4):607-17, 1989.

WU, Q., SUN, C.C., LIN, H.Y., BABITT, J.L. Repulsive Guidance Molecule (RGM) Family Proteins Exhibit Differential Binding Kinetics for Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). *PLOS ONE*, 7, 9, e46307, 2012.

XIA, Y., SIDIS, Y., MUKHERJEE, A., SAMAD, T.A., BRENNER, G., WOOLF, C.J., LIN, H.Y., SCHNEYER, A. Bone morphogenetic protein coreceptor, throughout the reproductive axis localization and action of dragon (Repulsive Guidance Molecule b), a novel. *Endocrinology*, 146:3614-3621, 2005.

XIA, Y., YU, P.B., SIDIS, Y., BEPPU, H., BLOCH, K.D., SCHNEYER, A.L., LIN, H.Y. Repulsive Guidance Molecule RGMa Alters Utilization of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptors by BMP2 and BMP4. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 282, 25, 18129-18140, 2007.

XIA, Y., BABITT, J.L., SIDIS, Y., CHUNG, R.T., LIN, H.Y. Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *BLOOD JOURNAL* 111(10), 5195-204, 2008.

YABLONKA-REUVENI, Z., RUDNICKI, M.A., RIVERA, A.J., PRIMIG, M., ANDERSON, J.E., NATANSON, P. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 210(2), 440-55, 1999.

YAMASHITA, T., MUELLER, B.K., HATA, K. Neogenin and repulsive guidance molecule signaling in the central nervous system. *CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY* 17:29-34, 2007.

YOKOYAMA, T., TAKANO, K., YOSHIDA, A., KATADA, F., SUN, P., TAKENAWA, T., ANDOH, T., ENDO, T. DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 177, 781-793, 2007.

YOON, S., MOLLOY, M.J., WU, M.P., COWAN, D.B., GUSSONI, E. C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. DEVELOPMENTAL BIOLOGY 301(1), 70-81, 2007.

YUTZEY, K.E., RHODES, S.J., KONIECZNY, S.F. Differential trans activation associated with the muscle regulatory factors MyoD1, myogenin, and MRF4. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 10(8):3934-44, 1990.

ZHANG, A.S., ANDERSON, S.A., MEYERS, K.R., HERNANDEZ, C., EISENSTEIN, R.S., ENNS, C.A. Evidence that inhibition of hemojuvelin shedding in response to iron is mediated through neogenin. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 282(17), 12547-56, 2007.

ZHANG, A.S., WEST, A.P. JR., WYMAN, A.E., BJORKMAN, P.J., ENNS, C.A. Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 280(40), 33885-94, 2005.

ZHANG, A.S., YANG, F., WANG, J., TSUKAMOTO, H., ENNS, C.A. Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenic protein-4-induced hepcidin expression. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 284, 22580-22589, 2009.

ZIERATH, J.R., HAWLEY, J.A. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE BIOLOGY 2(10), e348, 2004.

ZHOU, Z., XIE, J., LEE, D., LIU, Y., JUNG, J., ZHOU, L., XIONG, S., MEI, L., XIONG, W.C. Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. DEVELOPMENTAL CELL 19, 90-102, 2010.

8. Anexo



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 18/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Caracterização in situ e funcional da família das moléculas orientadoras de axônio por repulsão (RGM) durante o desenvolvimento da musculatura esquelética**", que tem como responsável(is) **Erika Cristina Jorge**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 04/2011**.

Este certificado expira-se em **13/ 04/ 2016**,

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 18/2011**, related to the project entitled "**In situ and functional characterization of the repulsive guidance molecules (RGM) family during skeletal muscle development**", under the supervisors of **Erika Cristina Jorge**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 13, 2011**.

This certificate expires in **April 13, 2016**.

Belo Horizonte, 18 de Abril de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

(Mod. Cert. v1.0)