

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Aline Martins Processi

**CARACTERIZAÇÃO DA MORTE INDUZIDA POR ESTAUROSPORINA E O
PAPEL DA LAMININA NA SOBREVIVÊNCIA DE MIOBLASTOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Ingo Riederer
Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

RIO DE JANEIRO
2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT/FIOCRUZ-RJ

P963 Processi, Aline Martins

Caracterização da morte induzida por estaurosporina e o papel da laminina na sobrevivência de mioblastos humanos. / Aline Martins Processi. – Rio de Janeiro: 2016.

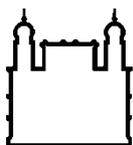
xii, 72 p.; il; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f: 58-72

1. Terapia celular. 2. laminina. 3. mioblasto. 4. morte celular.

CDD 616.02774



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ALINE MARTINS PROCESSI

**CARACTERIZAÇÃO DA MORTE INDUZIDA POR ESTAUROSPORINA E O
PAPEL DA LAMININA NA SOBREVIVÊNCIA DE MIOBLASTOS HUMANOS**

ORIENTADORES: Prof. Dr. Ingo Riederer
Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida

Aprovada em: 18/03/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Mariana Waghbi / Instituto Oswaldo Cruz- RJ (Presidente)

Prof. Dra. Jussara Lagrota / Universidade Federal Fluminense- RJ

Prof. Dra. Claudia Benjamim / Universidade Federal do Rio de Janeiro- RJ

SUPLENTES:

Prof. Dra. Luciana Garzoni / Instituto Oswaldo Cruz- RJ

Prof. Dra. Daniela Areas / Instituto Oswaldo Cruz- RJ (Revisora)

Rio de Janeiro, 18 de março de 2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por ter me dado força e coragem para seguir esse caminho.

Aos meus pais, Maria Cristina Silva Martins Processi e Venilson Antero Processi, e demais familiares, pelo carinho, amor e dedicação. A minha eterna Gratidão!!

Ao Dudu meu namorado, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Seu carinho e amor foram fundamentais nesses dois anos de trabalho. Obrigada!

Ao meu Orientador Dr. Ingo Riederer que mesmo sem me conhecer acreditou em mim e a partir deste momento, sempre teve disponibilidade e atenção para me ensinar, discutir resultados e aos experimentos. A sua orientação e paciência foram fundamentais para minha formação acadêmica. Muito obrigada, por me ajudar a realizar mais um sonho!

Ao Dr. Vinícius Cotta de Almeida, meu orientador e chefe do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo, por ter me acolhido tão bem no laboratório, por toda sua ajuda na discussão de resultados e na minha formação acadêmica.

Às Inguetes, Marina e ao Luís pelo carinho e ajuda. A amizade de vocês e o companheirismo foram importantíssimos.

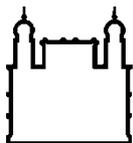
Aos meus amigos mestrandos Fabrício, Gabrielly, Alan e Paula pelo companheirismo nas disciplinas.

A todos os meus colegas do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo por toda ajuda e agradável convívio.

À Dra. Daniela Areas, que gentilmente e com muitas contribuições positivas me ajudou muito na revisão da minha dissertação e pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo. Muito obrigada!

Aos membros da banca Dra. Jussara Lagrota, Dra. Mariana Waghabi, Dra. Claudia Benjamim e a Dra. Luciana Garzoni que mesmo com todas as obrigações do dia a dia, se propuseram a contribuir com minha formação e enriquecimento da minha dissertação.

Às Agências de fomento, CAPES, IOC, FAPERJ pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

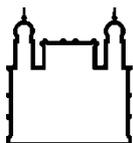
Caracterização da morte induzida por Estaurosporina e o papel da laminina na sobrevivência de mioblastos humanos

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ALINE MARTINS PROCESSI

O transplante de mioblastos tem sido usado para o tratamento de doenças neuromusculares, como a Distrofia Muscular de Duchenne. Entretanto, resultados dos ensaios clínicos não tiveram sucesso, e a morte dos mioblastos injetados é descrita como um dos principais problemas dessa estratégia. O estudo de componentes do microambiente muscular onde os mioblastos são transplantados é central para o entendimento do processo de regeneração. Aqui, destacamos a laminina (LM), uma glicoproteína heterotrimérica composta pelas cadeias α , β e γ , que combinam para formar diferentes isoformas, com a isoforma LM211 (formada pelas cadeias $\alpha 2\beta 1\gamma 1$) sendo o principal componente da membrana basal que envolve a fibra muscular. Nesse contexto, vários estudos mostram que a isoforma LM111 estimula a proliferação, a migração e a sobrevivência de mioblastos *in vitro* e *in vivo*, auxiliando no processo regenerativo muscular em modelos experimentais de distrofia muscular. De forma a abordar a problemática da morte celular na terapia de regeneração muscular com mioblastos, o presente estudo teve como objetivo avaliar como diferentes isoformas de LM podem modular a morte de mioblastos humanos (com o emprego da linhagem denominada CHQ) *in vitro*. Após verificar a existência de diferentes cadeias de LM durante a proliferação ($\alpha 1$) e diferenciação ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$) das células CHQ, caracterizamos a morte induzida por estaurosporina (STS) nessas células. Estudando CHQ em proliferação, verificamos que o tratamento com STS resulta em aumento da deposição da cadeia $\alpha 1$ de LM e da expressão da cadeia $\alpha 6$ integrina, componente de um dos receptores de LM ($\alpha 6\beta 1$). Posteriormente, verificamos que a isoforma LM111 protege os mioblastos da morte por apoptose e que as isoformas 111, 411 e 511 aumentam o percentual de células vivas após tratamento com STS. Observamos também que a LM111 leva a um aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição da expressão de Bax, e que as isoformas LM111 e LM511 promovem maior expressão da cadeia $\alpha 7$ integrina e, paralelamente, aceleram a adesão da CHQ. Em conjunto, esses dados sugerem que as isoformas de LM, particularmente LM111, 511 e 411, regulam o processo de apoptose e as propriedades adesivas de células CHQs induzidas à morte por STS *in vitro*. Além disso, esses estudos contribuem para a noção de que as isoformas de LM são potenciais alvos terapêuticos na regeneração muscular com mioblastos humanos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of the staurosporin-induced cell death and the role of laminin on the survival of human myoblasts

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELL BIOLOGY

ALINE MARTINS PROCESSI

The myoblasts transplantation has been used for the treatment of neuromuscular diseases such as Duchenne Muscular Dystrophy. However, results of clinical trials were unsuccessful, and the death of the injected myoblasts is described as one of the main problems of this strategy. The study of components present in the muscle microenvironment where myoblasts are transplanted is central to the understanding of the regeneration process. Here, we highlight the laminin (LM), a heterotrimeric glycoprotein, composed by α , β and γ chains (which combine to form different isoforms), with the isoform LM211 (composed by $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ chains) as the main component of the basement membrane that surrounds the muscle fiber. In this context, several studies show that the LM111 isoform stimulates the proliferation, migration and survival of myoblasts *in vitro* and *in vivo*, supporting the muscle regenerative process in experimental models of muscular dystrophy. In order to address the problem of cell death in therapy for regeneration using myoblasts, the present study aimed to evaluate how different LM isoforms can modulate the death of human myoblasts (by employing the cell line called CHQ) *in vitro*. After verifying the existence of different LM chains during proliferation ($\alpha 1$) and differentiation ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$) of CHQ cells, we characterize the death induced by staurosporin (STS) in these cells. Studying proliferating CHQ cells, we noted that STS treatment resulted in increased deposition of the LM $\alpha 1$ chain and also the expression of integrin $\alpha 6$ chain, a component of the LM receptor ($\alpha 6\beta 1$). Later, we showed that the LM111 protected the myoblasts from the death by apoptosis, and the 411, 511 and 111 isoforms increased the percentage of living cells after treatment with STS. We also noted that the LM111 leads to an increase of Bcl-2 expression and reduction of Bax expression, and that the isoforms LM111 and LM511 promoted enhanced expression of Integrin $\alpha 7$ chain and accelerated the adhesion of CHQ. Together, these data suggest that LM isoforms, particularly LM111, 411, and 511, might regulate the apoptosis process and the adhesive properties of CHQ cells induced by *in vitro* STS treatment. In addition, these studies contribute to the notion that LM isoforms are potential therapeutic targets in muscle regeneration using human myoblast.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Células Satélites e Regeneração muscular.....	1
1.1.1	Diferenciação das SC do tecido muscular esquelético	2
1.2	Terapia celular	5
1.2.1	Limitações do transplante de mioblastos.....	6
1.3	Laminina como alvo terapêutico: Papel protetor da LM na sobrevivência dos mioblastos	10
2	Justificativa	16
3	Objetivos.....	19
3.1	Objetivo geral	19
3.2	Objetivos específicos	19
4	Material e Métodos	20
4.1	Cultura celular	20
4.2	Reagentes.....	21
4.3	Tratamento e “coating” com a isoformas de LM.....	22
4.4	Citometria de Fluxo	22
4.5	Imunofluorescência	24
4.6	Tunel.....	24
4.7	Western blotting	25
4.8	PCR em tempo real da cadeia α de LM e a cadeia α de integrina	25
4.9	Análise Estatística.....	26
5	Resultados.....	27
5.1	Expressões das isoformas de LM e seus receptores na proliferação de CHQs <i>in vitro</i>	27
5.2	Caracterização da morte induzida por STS nas CHQs	29
5.2.1	Escolha da STS como definidor de apoptose, definição dos parâmetros de análise citofluorimétricos.....	29
5.3	Modulação da expressão de cadeias de LM após a indução da morte por STS.....	36
5.4	Avaliação do papel da LM na proteção da morte induzida por STS....	39
5.5	Estratégia de tratamento das CHQs por LM111.	46
5.6	Possíveis Mecanismos de proteção da morte celular pela LM.....	46

6	Discussão	49
7	Conclusão.....	58
8	Referências bibliográficas.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Organização da estrutura do musculo esquelético.....	2
Figura 1.2 Representação esquemática da ativação de SC e a progressão da formação de fibras musculares/regeneração muscular através do programa miogênico.....	5
Figura 1.3 Estrutura da laminina	11
Figura 1.4 Estruturas do complexo de interações e localização das principais proteínas envolvidas nesse complexo.....	14
Figura 2.1 Expressão de marcadores apoptóticos e anti-apoptóticos em mioblastos humanos após o transplante em camundongos imunodeficientes RAG-/- γ C-/-	17
Figura 4.1 Miogenicidade das CHQs <i>in vitro</i>	21
Figura 5.1 Expressão de diferentes cadeias de LM durante a proliferação e diferenciação das CHQs <i>in vitro</i>	28
Figura 5.2 Expressão de receptores de LM nas CHQs em proliferação	29
Figura 5.3 Dotplots” representativos das CHQs tratadas com 5 μ M de STS por 16 h	30
Figura 5.4 Detecção de apoptose em CHQs tratadas com STS.	31
Figura 5.5 Expressão de caspase-3 ativa em CHQs tratadas com STS	32
Figura 5.6 Expressão de Bcl-2 (anti-apoptótica) nas CHQs.....	32
Figura 5.7 DotPlots representativos de CHQs tratadas com diferentes indutores de morte	33
Figura 5.8 Percentuais de células vivas, apoptóticas e necróticas após a indução da morte por STS	35
Figura 5.9 Tratamento das CHQs com diferentes concentrações de STS.....	36
Figura 5.10 Análise da expressão de cadeias de LM após tratamento com STS	37
Figura 5.11 Análise da expressão das cadeias de LM após tratamento com STS por RT-PCR.....	38
Figura 5.12 Análise da expressão das cadeias de integrina após tratamento com STS por RT-PCR.....	38
Figura 5.13 Tempo de aderência das CHQs na cultura em meio de proliferação	40
Figura 5.14 Percentual de células vivas, apoptóticas e necróticas após adesão das CHQs sobre LM111 e tratamento com STS	41
Figura 5.15 Percentual de células apoptóticas nos experimentos em que as CHQs	42
Figura 5.16 Percentual do aumento de sobrevivência e diminuição da apoptose nas CHQs cultivadas sobre diferentes isoformas de LM e induzidos a morte por STS	43

Figura 5.17 Papel das diferentes isoformas de LM na proteção da morte de CHQs	44
Figura 5.18 LM111 protege as CHQs da morte por apoptose. As CHQs foram tratadas com 5 μ M de STS por 16 h, sobre o “coating” da isoforma de LM111.	45
Figura 5.19 Expressão de Parp-clivada em CHQs tratadas com STS	45
Figura 5.20 Concentrações de LM diluída na cultura de CHQs e posteriormente tratadas com STS.....	46
Figura 5.21 Expressão da integrina α 7 e tratamento com diferentes isoformas de LM	47
Figura 5.22 Expressão de moléculas anti-apoptótica e pró-apoptótica após o tratamento com STS em CHQs cultivadas sobre LM111	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 : Descrição de “primers” utilizados. (F) do inglês, Forward, (R) do inglês, “Reverse”	26
Tabela 2 : Tabela de observação da alteração morfológica e aderência dos cultivos de mioblastos humanos tratados com STS em diferentes concentrações e tempo.	34

ABREVIATURAS E SIGLAS

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne (do inglês, Duchenne muscular dystrophy).

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dubelco (do inglês, “Dulbecco’s modified Eagles médium”).

FGF: Fator de crescimento de fibroblasto (do inglês, “Fibroblast growth factor”).

HGF: Fator de crescimento de hepatócito (do inglês, “Hepatocyte growth factor”).

IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo-1 (do inglês, “Insulin-like growth factor I”).

ECM: matriz extracelular (do inglês, “extracellular matrix”).

LFA-1: Antígeno 1 associado a função leucocitária (do inglês, Lymphocyte function associated antigen-1).

LM: laminina.

LAMA: nomenclatura comum que define gene e proteína de cada cadeia α de laminina.

Myf5: Fator miogênico 5 (do inglês, “Myogenic fator 5”).

MyoD: Fator de determinação miogênico 1 (do inglês, “Myogenic determination factor 1”).

Mrf4: Fator de regulação miogênico 4 (do inglês, “Myogenic fator 4”).

MFRs: fatores reguladores miogênicos (do inglês, “myogenic regulatory factors”).

NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês, “Nuclear Factor kappa B”).

Pax3/Pax7: Fatores de transcrição da família “paired box”.

PI: iodeto de propídio (do inglês, “propidium iodide”).

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, reverse transcription polymerase chain reaction).

SC: células satélites (do inglês, “satellite cells”).

STS: estaurosporina (do inglês, “staurosporine”).

1 Introdução

1.1 Células Satélites e Regeneração muscular

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano, correspondendo quase 40 a 50% do peso total do indivíduo (1). É um tecido especializado na locomoção, manutenções da postura, atividade metabólica, compõem-se de fibras musculares e por uma população minoritária de células progenitoras indiferenciadas, denominada células satélites (SC), localizadas entre o sarcolema da fibra muscular e a membrana basal. As fibras musculares são unidades contráteis que se agrupam em feixes circundados por bainhas de tecido conjuntivo. O epimísio é um tecido conjuntivo denso não modelado que envolve o músculo inteiro. O perimísio é um tecido conjuntivo mais frouxo e envolve feixes ou fascículos de células musculares. O endomísio é uma camada delicada de fibras reticulares que circunda a fibra muscular. Os vasos sanguíneos e nervos usam as bainhas de tecido conjuntivo para alcançar o interior do músculo. Uma rede flexível de capilares suporta as alterações decorrentes da contração e do relaxamento (2) (3). (Figura 1.1).

Nos vertebrados superiores, durante a embriogênese, o conjunto da musculatura do corpo e dos membros deriva dos somitos. Neste local, células mesenquimais sofrem uma transformação, influenciadas por fatores de transcrição da família do MyoD, os MRFs (Fatores Reguladores Miogênicos, que serão discutidos com mais detalhes posteriormente), membros da família de proteínas Pax, como Pax3 e Pax7 e sinais secretados pelo microambiente (4) (5), diferenciando-se em mioblastos. Estas células ficam alinhadas por suas extremidades e se fundem, formando um miotubo multinucleado (sincício) pós-mitótico, onde os núcleos não podem reentrar no ciclo proliferativo e dessa forma contribuir com núcleos adicionais. Miotubos recém-formados sintetizam proteínas citoplasmáticas contráteis chamadas de miofibrilas, amadurecem e se transformam em uma longa estrutura muscular de diâmetro que varia de 10 μM a 100 μM . A membrana plasmática das fibras musculares (denominada sarcolema) é circundada por uma lâmina basal. O sarcolema tem uma estrutura similar às outras membranas plasmáticas, entretanto possui uma característica

distinta: emite longas invaginações digitiformes denominadas de túbulos T (túbulos transversais). Os túbulos T são invaginações que se dispõem entre as miofibrilas. Quase todo o citoplasma das fibras musculares (denominado sarcoplasma) é ocupado por miofibrilas. As miofibrilas são compostas principalmente por dois filamentos de proteínas contráteis a actina (filamentos delgados) e a miosina (filamentos espessos) que se organizam em estruturas repetitivas, os sarcômeros, que são estruturas que respondem a estímulos neuromusculares e promovem o movimento de contração (2) (3).

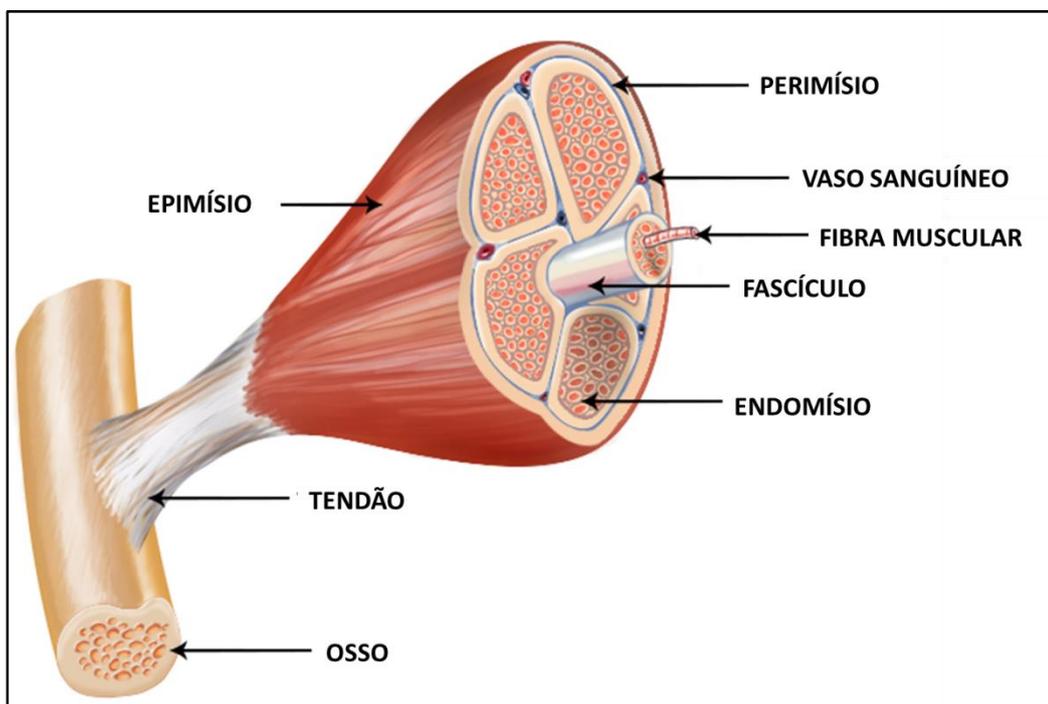


Figura 1.1: Organização da estrutura do músculo esquelético. Organização da estrutura do músculo esquelético. Cada fibra muscular é envolvida pelo endomísio, os fascículos de fibras envolvidos pelo perimísio e o epimísio envolve toda fibra muscular. Fonte: National Institute of health. <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/muscular/structure.htm>

1.1.1 Diferenciação das SC do tecido muscular esquelético

Mauro (1961) observou, por microscopia eletrônica, a presença de células intimamente associadas com a fibra muscular, denominadas de SC, e que estavam localizadas entre o sarcolema da fibra e a lâmina basal (7), que é uma estrutura contínua sobre a fibra muscular e a SC.

No desenvolvimento pós-natal, o crescimento muscular, a hipertrofia provocada pelo exercício e regeneração são promovidos, principalmente, pela atividade das SC residentes, que vão diminuindo em número até o indivíduo alcançar a fase adulta. Em camundongo, no nascimento, os núcleos das células satélites representam por volta de 30% dos núcleos observados no músculo, enquanto que na fase adulta eles representam 5%. Essa diminuição se deve principalmente, devido a incorporação das SC nos músculos em fase de crescimento (8).

Schultz demonstrou em 1976 que as SC de camundongos jovens são metabolicamente ativas e entram rapidamente em quiescência à medida que o animal envelhece (9). No músculo adulto, células satélites estão em sua grande parte em estado de quiescência (10).

Como descritas acima, no adulto, as SC são raras e seus núcleos estão presentes no músculo de mamíferos adultos em proporção muito menor que os núcleos das fibras musculares diferenciadas. Entretanto, quando ocorre uma lesão ou trauma muscular, as SCs são ativadas. Uma parte dessas células renova o “pool” de SC e a outra parte prolifera, e, nesse estágio, essas células passam a ser denominadas de mioblastos. Após ciclos de proliferação, essas células diferenciam, formando novas fibras musculares, ou regenerando fibras danificadas (11) (Figura 1.2).

As SC quiescentes podem ser identificadas por marcadores de superfície, como CD56, M-caderina, CD34, C-MET, desmina, assim como Pax7, membro da família de fatores de transcrição “paired box” (12). O primeiro sinal que ativa a SC é a interação do HGF, que fica retido na matriz extracelular (ECM) que envolve a fibra, com o receptor C-MET, presente nas SCs. A ativação leva a transição do ciclo celular de G0 para G1 (saída do estado de quiescência), e o aumento rápido da expressão dos MRFs (assim como no desenvolvimento embrionário, para a formação dos músculos, os MRFs também são fundamentais no desenvolvimento pós-natal e na regeneração do músculo adulto), como MyoD e Myf5, e começam a proliferar (13). O MyoD, por exemplo, induz a célula a sair do ciclo celular, etapa essa essencial para que o processo de diferenciação ocorra (14) (15). Além disso, vários fatores derivados das fibras musculares danificadas e do infiltrado inflamatório, estão envolvidos na ativação e proliferação das SC, incluindo o HGF, FGF, IGF-1 e o óxido nítrico (16).

A saída irreversível do ciclo celular marca o início do processo de diferenciação, e mioblastos (ou, nessa fase, definidos como miócitos) começam a expressar outros dois membros dos MRFs como o Mrf4 e a miogenina, que ativa genes envolvidos na diferenciação, como as miosinas (17). Posteriormente as células migram, se alinham e aderem, com posterior fusão das membranas (etapa denominada de fusão), a partir da qual irá ocorrer a formação de miotubos multinucleados (fibra muscular) (Figura 1.2) (18) (19). Apesar de existirem outras células progenitoras no músculo, somente SC (que expressam Pax-7) são capazes de regenerar um músculo esquelético adulto após injúria (20). Cabe destacar que o infiltrado inflamatório tem papel importante nesse processo e macrófagos são fundamentais para que a regeneração do músculo ocorra (21). Essas células protegem mioblastos e miotubos da morte celular e, através da produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, regulam e orquestram o processo de regeneração (22). Mioblastos podem ser identificados por marcadores como desmina, N-CAM, Myf4, Myf5, MEF2C e MyoD, mas são negativos para Pax7, enquanto células diferenciadas podem ser identificadas por proteínas do sistema contrátil, como a miosina, actina e a troponina I (23) (24).

Este processo, que se inicia após dano com consequente ativação da SC, proliferação e diferenciação destes progenitores musculares e formação de novas fibras e/ou recuperação das fibras danificadas é definido como regeneração muscular.

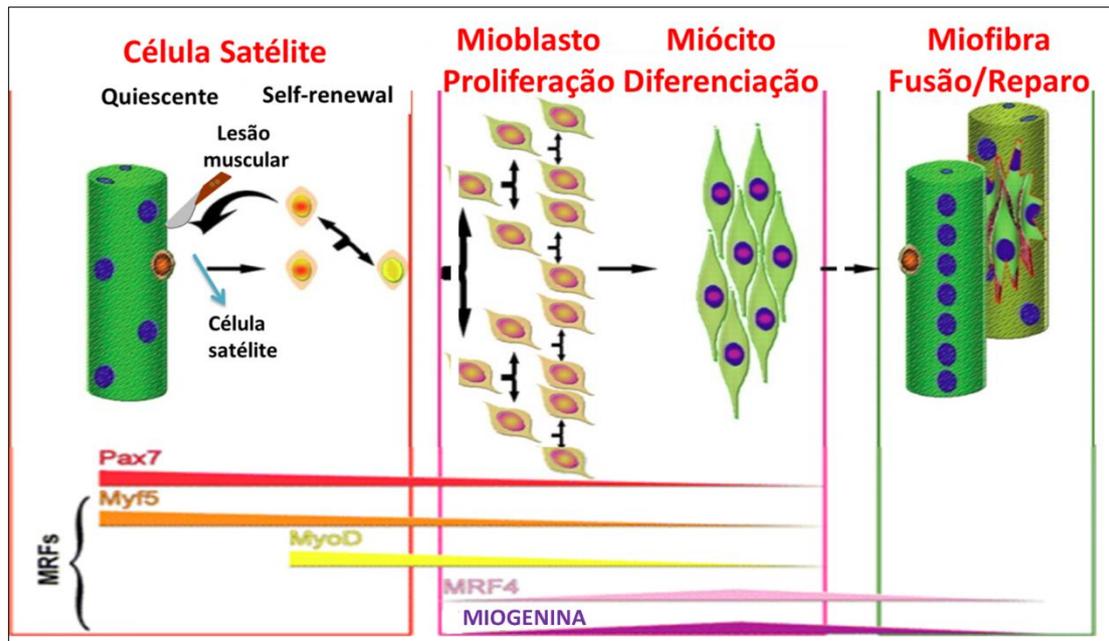


Figura 1.2: Representação esquemática da ativação de SC e a progressão da formação de fibras musculares/regeneração muscular através do programa miogênico. (Adaptado de Boldrin *et. al.*, 2010).

1.2 Terapia celular

Devido à capacidade dos mioblastos regenerarem o músculo danificado (por formar novas fibras e/ou regenerar fibras danificadas, tal como descrito anteriormente), a injeção destes progenitores musculares tem sido utilizada como estratégia em terapia gênica e celular. SC podem ser isoladas *in vitro* a partir de tecidos obtidos por biópsias, amplificadas e posteriormente injetadas, ou modificadas geneticamente antes do transplante (25). Estas células podem ser introduzidas no músculo em regeneração com o objetivo de produzir uma cópia normal de um gene ausente ou defeituoso, que será expresso no contexto dos sincícios da fibra muscular, não sendo limitado a uma célula isolada.

Essa propriedade tem sido utilizada no domínio da terapia celular para o tratamento de doenças neuromusculares, como as distrofias musculares. A distrofia muscular é uma doença caracterizada por atrofia, fraqueza muscular, elevação dos níveis séricos das enzimas musculares (creatina-quinase) e destruição do tecido muscular. As distrofias musculares são causadas pela perda de diversos tipos de proteínas como as moléculas da ECM, proteínas formadoras de complexos transmembrana, proteínas citosólicas e nucleares

(26). Já foram descritas mais de 30 tipos de distrofias geneticamente diferentes (27), dentre elas a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), uma doença neuromuscular hereditária e progressiva mais comum entre as distrofias musculares.

A DMD é uma doença genética recessiva ligada ao Cromossomo X, que é causada por um defeito no gene da distrofina, localizado no locus Xp21.2Xp21, desta forma os meninos são afetados, de 1 entre 3500 no gênero masculino. A distrofina é uma proteína localizada no sarcolema, responsável pela manutenção da integridade e estabilidade da fibra muscular (28) (29) (30). O complexo de proteínas ligado à distrofina conecta o complexo de proteínas do sarcolema com o citoesqueleto. Essa interação é um importante mecanismo de ancoragem das fibras musculares com a ECM. Em pacientes com DMD, esse “link” é perdido, o sarcolema torna-se suscetível ao dano durante a contração e relaxamento, resultando em consequente necrose nas fibras musculares. As SC são ativadas e regeneram a fibra danificada, mas, com a ausência da distrofina, o problema continua. Nesse sentido, ciclos de regeneração e degeneração levam o “pool” de SC à exaustão, pois elas se tornam senescentes. Ainda, a subsequente resposta inflamatória poderia aumentar a necrose das fibras musculares. Dessa forma, os pacientes perdem a capacidade de marcha por volta dos 10 anos e são acometidos com enfraquecimento muscular, insuficiência respiratória e comprometimento cardíaco.

1.2.1 Limitações do transplante de mioblastos

A terapia celular tem utilizado o transplante de mioblastos tanto em modelos animais, como em ensaios clínicos, principalmente em pacientes com DMD e pacientes com problemas cardíacos (31) (32) (33) (34). O grupo de T. Partridge (1978) evidenciou, pela primeira vez, a participação de mioblastos murinos transplantados na regeneração do músculo de um camundongo receptor (35). Posteriormente, diversos trabalhos confirmaram a capacidade regeneradora dos mioblastos, principalmente em modelos murinos (36) (37) (38). Em 1989, esse mesmo grupo mostra que a transplantação de mioblastos de camundongos normais restaurou a expressão de distrofina em fibras musculares

de camundongo mdx (modelo animal para a DMD), com importante participação das células doadoras na regeneração muscular no músculo receptor (31). Por outro lado, o grupo de Tremblay (1992) demonstrou a eficácia do transplante de mioblastos humanos em camundongos imunodeficientes (33) (39). Esses trabalhos abriram portas para a possibilidade de utilização de precursores musculares no tratamento de distrofias musculares.

Esses resultados promissores levaram, de forma muito rápida, à realização de ensaios clínicos em pacientes com DMD no início da década de 90 (34) (40) (41). Entretanto, essa estratégia se apresentou ineficaz nos ensaios clínicos realizados até o momento (42) (20).

Dados da literatura, abrangendo tanto os modelos animais, quanto os ensaios clínicos até agora realizados, têm mostrado que a morte (que será abordada com mais detalhes adiante), a reduzida proliferação e a limitada migração das células transplantadas são as principais limitações do transplante de mioblastos como terapia celular. Poucos são os estudos que avaliaram de forma detalhada a proliferação das células injetadas. *In vitro*, mioblastos têm uma capacidade proliferativa limitada, devido a uma redução progressiva do tamanho do DNA telomérico, e após um número determinado de divisões celulares, estas células entram em um estado de senescência (43). Quando as SCs são isoladas, elas precisam ser amplificadas em grande número antes do transplante. Dessa forma, os mioblastos já podem estar com sua capacidade proliferativa reduzida no momento da injeção. Além disso, nosso grupo demonstrou que mioblastos humanos possuem uma baixa proliferação após a injeção em músculos de camundongos imunodeficientes (44). Outro problema descrito é a migração dessas células após injeção. Satoh e colaboradores (1993) demonstraram que os mioblastos transplantados têm uma migração muito reduzida, permanecendo localizados próximos ao sítio de injeção (45). O tratamento dos mioblastos com um inibidor de metaloproteinase diminui a migração dessas células após injeção (46), indicando que, apesar de uma migração limitada *in vivo*, esta seria pelo menos parcialmente dependente da ECM. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a diferenciação precoce dos mioblastos transplantados estava correlacionada com a diminuição da proliferação e migração dos mioblastos humanos, indicando que a diferenciação destas células, que de fato é o objetivo

final dessa estratégia, também possa ser um problema na terapia celular quando ocorre de forma precoce após a injeção (47).

No músculo, após injúria e durante a regeneração, processos como necrose, apoptose e autofagia estão presentes, e defeitos na regulação desses fenômenos, como na ação dos macrófagos, pode levar a uma remodelação defeituosa e promover, por exemplo, fibrose (48).

A morte dos mioblastos transplantados também tem sido descrita como um dos principais problemas da terapia celular em músculo. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos que levam à perda desses progenitores musculares após o transplante (42). A rejeição imunológica pode certamente contribuir com essa morte, porém, os estudos que mostram uma morte rápida das células injetadas, e os trabalhos com animais imunodeficientes ou imunossuprimidos, que também apresentam uma importante perda das células transplantadas, indicam que outros mecanismos devam estar contribuindo para a morte dos mioblastos injetados.

É importante salientar que os dados da literatura são conflitantes, tanto no que diz respeito à intensidade, quanto à cinética desta morte (49). Por exemplo, vários estudos mostram que a maioria das células injetadas morre nos primeiros dias após a transplantação (50) (51) (52). Por outro lado, alguns trabalhos têm demonstrado que a maioria das células injetadas está ainda viva após alguns dias de transplantação (46) (44). A influência de outros fatores relacionados com o procedimento de transplantação e o microambiente do hospedeiro, não associado com a resposta imune (inata e adaptativa), deve ser também considerada. Nesse sentido, diversos são os exemplos de fatores que podem também causar ou contribuir para a morte dos mioblastos: condições da cultura celular, “descolamento” (por ação enzimática) e manutenção das células em condições “ótimas” até a transplantação, dano físico provocado pelo processo da injeção, estresse oxidativo (53), isquemia devido à baixa vascularização no sítio de injeção e a ausência de interações das células injetadas com a matriz extracelular (53) (54).

Conseqüentemente, células da imunidade inata também foram implicadas como possíveis causadores dessa morte rápida e inicial. Como descrito anteriormente, macrófagos possuem um efeito benéfico na regeneração muscular (21), porém pouco se sabe sobre o feito dessas células na sobrevivência

dos mioblastos transplantados. Mais recentemente, foi demonstrado que co-injeção de macrófagos humanos e mioblastos humanos em camundongos MDX aumenta a sobrevivência, proliferação e migração dos mioblastos transplantados (55). Com uma estratégia semelhante, nosso grupo demonstrou que macrófagos pró-inflamatórios aumentam a capacidade regenerativa dos mioblastos transplantados em músculos lesionados de camundongos imunodeficientes (56), confirmando a potencial benéfico dessas células em protocolos de terapia celular. Células NK foram descritas como responsáveis em promover uma rápida e importante morte dos mioblastos transplantado (57) (58). Porém, trabalho posterior do mesmo grupo mostrou que a imunidade inata, incluindo células NKs, não eram responsáveis pela morte rápida dos mioblastos injetados (59). Por outro lado, trabalhos do grupo do Dr. Tremblay, utilizando anticorpo anti-LFA-1, mostraram que o bloqueio da interação LFA-1/ICAM-1, importante para a transmigração de leucócitos do sangue para o sítio inflamatório, reduz a morte aguda dos mioblastos transplantados, e sugeriram que neutrófilos eram responsáveis por essa morte (60) (51). Porém, observamos que os dados da literatura não estão claros acerca dos possíveis mecanismos causadores da morte dos mioblastos transplantados.

Compreender os mecanismos determinantes dessa morte e diminuí-la ou impedi-la em protocolos de terapia celular utilizando mioblastos, pode, com certeza, ser importante para a eficácia dessa estratégia. Alguns estudos tiveram um impacto positivo no transplante de mioblastos humanos em músculo de camundongos imunodeficientes. Por exemplo, a supra-regulação das proteínas de choque térmico (HSPs) aumenta a sobrevivência de mioblastos de camundongos e de mioblastos humanos injetados no músculo de camundongos imunodeficientes (61). Ainda, tratamento com AG490, um inibidor específico da tirosina-quinase JAK2, aumenta a sobrevivência celular *in vivo* (62), e o aumento da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) reduz a morte celular por hipóxia (63). Foi demonstrado também que o beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB), um metabólito do aminoácido leucina, reduz a apoptose de células musculares induzidas à morte celular por estaurosporina e por deprivação de soro no meio de cultura, de maneira dependente da via de sinalização de PI3K/AKT (64).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a apoptose é uma das principais razões dessa morte (65). A apoptose é um tipo de morte celular programada, caracterizada por eventos específicos, como a fragmentação do DNA, intensa condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de “blebs” na membrana e formação de corpos apoptóticos. Entretanto, dados relativos à morte por apoptose de mioblastos transplantados são escassos (65), e as cascatas de morte celular desencadeadas nas células transplantadas ainda não foram estudadas.

Assim, para que a terapia celular possa vir a ser considerada eficiente, tais problemas devem ser resolvidos antes que o transplante de mioblastos seja feito em situações clínicas. Diversas estratégias têm sido realizadas com o objetivo de solucionar essa problemática, e têm sido aplicadas em modelos experimentais para o transplante de progenitores musculares humanos, incluindo a utilização de drogas imunossupressoras, irradiação e a utilização de camundongos imunodeficientes (20).

O grupo francês liderado pelos pesquisadores Gillian Butler Browne e Vincent Mouly desenvolveu um modelo de xenotransplante em camundongos imnodeficientes $RAG2^{-/-}\gamma C^{-/-}$ (duplo nocaute para o gene que codifica a recombinase RAG2 e para o gene que codifica a cadeia γ comum de receptores de citocinas), que toleram a implantação de células humana. As células transplantadas são capazes de formar fibras humanas, e mesmo fibras híbridas, no músculo receptor (66). Em 2005, nosso grupo realizou um trabalho comparativo de transplante de mioblastos humanos em diferentes “linhagens” de camundongos imunodeficientes (67), e partir desse trabalho nossa colaboração continua até o presente momento.

1.3 Laminina como alvo terapêutico: Papel protetor da LM na sobrevivência dos mioblastos

Riederer e colaboradores (2012) demonstraram que mioblastos transplantados no músculo de camundongo imunodeficiente estavam em contato com as moléculas da ECM especificamente com a laminina, e com células do infiltrado inflamatório e fatores solúveis (como fatores de crescimento, citocinas e, particularmente, quimiocinas) que estão presentes no sítio da injeção. Nesse

contexto, o “nicho” do transplante onde as células serão injetadas deve ser considerado (44).

Nosso laboratório vem nos últimos anos desenvolvendo vários estudos sobre o papel das moléculas da ECM em diversos sistemas, fisiológicos, patológicos e no sistema imune. Uma das proteínas mais abundantes na ECM é a laminina (LM) (68). Esta molécula, é uma importante família de glicoproteínas da ECM (Figura 1.3).

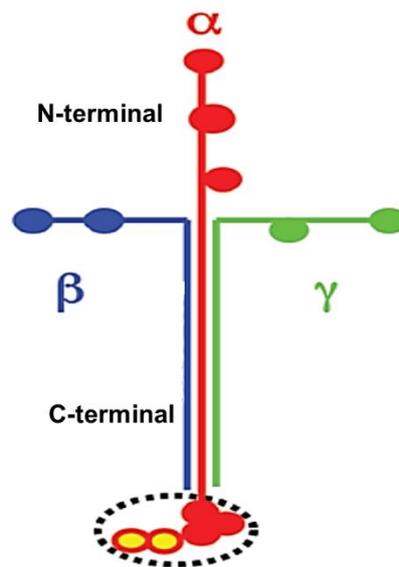


Figura 1.3: Estrutura da laminina. (Adaptado Aumalley,2013)

Até o momento foram descritas 16 isoformas de LM, que contribuem na organização da ECM, particularmente das membranas basais em diferentes tecidos. Cada molécula de LM é um trímero formado pela associação de três subunidades – α , β e γ – que se combinam formando as diferentes isoformas. Por exemplo, a LM111 é composta pelas cadeias α 1, β 1 e γ 1 (ou LAMA1, LAMB1, LAMC1, seguindo a nomenclatura das proteínas derivadas dos respectivos genes). A LM é composta por uma porção N-terminal que interage com outras proteínas da ECM (como o colágeno tipo IV e o nidogênio), levando à montagem e estabilidade da membrana basal, e uma porção C-terminal que interage com receptores de superfície, levando à modulação de processos biológicos celulares (69) (70).

Os receptores de LM são classificados como receptores não-integrinas e os receptores de tipo integrina, os quais desempenham um papel central na adesão e funções das LMs (Figura 1.4). Os receptores de tipo integrina são heterodímeros com uma cadeia α e uma β , e são consideradas os principais receptores de adesão capazes de integrar o sinal extracelular com o citoesqueleto, modulando também os mecanismos de transdução de sinal intracelular. Na literatura, já estão descritos 24 subtipos de integrinas que foram identificados em mamíferos (71). Dentre estes tipos alguns apresentam a capacidade de se ligar à LM (72). Até o momento, identificaram-se como receptores de LM a integrina $\alpha6\beta4$, 6 membros da família de β -integrina (73) ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$, $\alpha9\beta1$), e ainda 3 membros com sub-unidade $\alpha\nu$ ($\alpha\nu\beta3$, $\alpha\nu\beta5$, $\alpha\nu\beta8$) (71). Os receptores não integrinas incluem o distroglicano, a proteína precursora do amiloide e a proteína prion celular (74) (75) (61). Essa interação entre a ECM e o espaço intracelular envolve a indução de vias de sinalização e a organização do citoesqueleto intracelular (76). O vasto repertório de mecanismos de vias de transdução de sinais, tais como a ativação de GTPases que levam a organização do citoesqueleto, ativação de vias MAPK e ativação de diversas vias mediadas por proteínas quinases podem influenciar a expressão gênica e conseqüentemente modular diferentes processos biológicos (77).

No músculo, a LM é o principal componente da membrana basal que envolve as fibras musculares, e as isoformas predominantes são a LM211 (merosina) e a LM221, que estão preferencialmente localizadas nas junções neuromusculares e miotendíneas (78) (79) (70). As mutações na cadeia $\alpha2$ da LM são responsáveis pelas distrofias musculares congênitas graves que cursam com a perda da força e contração do músculo esquelético (Figura 1.4) (80). As interações entre as fibras musculares e SC com as LM211/221 são mediadas pela integrina $\alpha7\beta1$ e pelo α -distroglicano. A $\alpha7\beta1$ é importante para integração da fibra com o citoesqueleto (81) e para a sobrevivência da fibra (57) (82). Camundongos nocautes para essa integrina apresentam grave distrofia muscular (83), com características semelhantes ao observado em pacientes DMD (84) e a supra-expressão de $\alpha7\beta1$ reduz a distrofia em camundongos deficientes no gene LAMA2, que codifica a cadeia $\alpha2$ da LM, e que, dessa forma, não possui as isoformas 211 e 221 (85). O trabalho de Langebach e Rando

(1995) demonstrou que o uso de um anticorpo contra o α -dístroglicano rompe a interação com a LM e induz a apoptose de miotubos em cultura, impedindo a sinalização da via PI3K/AK (86).

Durante a regeneração muscular, foi observado a expressão transitória das cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ de LM em miotubos recém-formados e a expressão da integrina $\alpha 6$, indicando que outros ligantes e receptores de LM estão presentes no processo de cura muscular e podem ter funções importantes nesse processo (87) (88) (89).

Dependendo dos sinais do microambiente, a interação das moléculas da ECM com as integrinas tem a habilidade de modular a sobrevivência celular, e a não ligação com as integrinas pode promover uma cascata pró-apoptótica. A ligação com a integrina aumenta a sobrevivência celular através de vários mecanismos, incluindo o aumento da expressão de Bcl-2 (62) (63) e C-FLIP (90), ativação da via PI3K/AKT (91) e da via do NF- κ B (92), e também pela inativação do p53 (75).

O processo denominado morte celular mediada por integrinas (IMD) ocorre quando as integrinas que não se ligam a ECM, que estão na superfície de células aderentes, recrutam e ativam caspase-8 (93). A IMD é diferente do “anoikis”, fenômeno onde ocorre apoptose pela falta de aderência à ECM (94). O bloqueio de moléculas de adesão, como as integrinas e caderinas, pode rapidamente induzir apoptose em células de cultura, e a perda do contato célula-célula ou células-substrato resulta em “anoikis” em diferentes tipos de células (90) (95)(96). Além disso, a perda dessas interações resulta na redução da expressão de Bcl-2, e Bad, Bid e Bax são translocados para o citoplasma da mitocôndria levando à liberação de citocromo c, ativação de caspases e repressão de FLIP (97). Uma das hipóteses pela perda de células pós-transplantação é que os mioblastos injetados no músculo formam um “pocket”, que reduz o contato com as moléculas da ECM e leva à morte por apoptose.

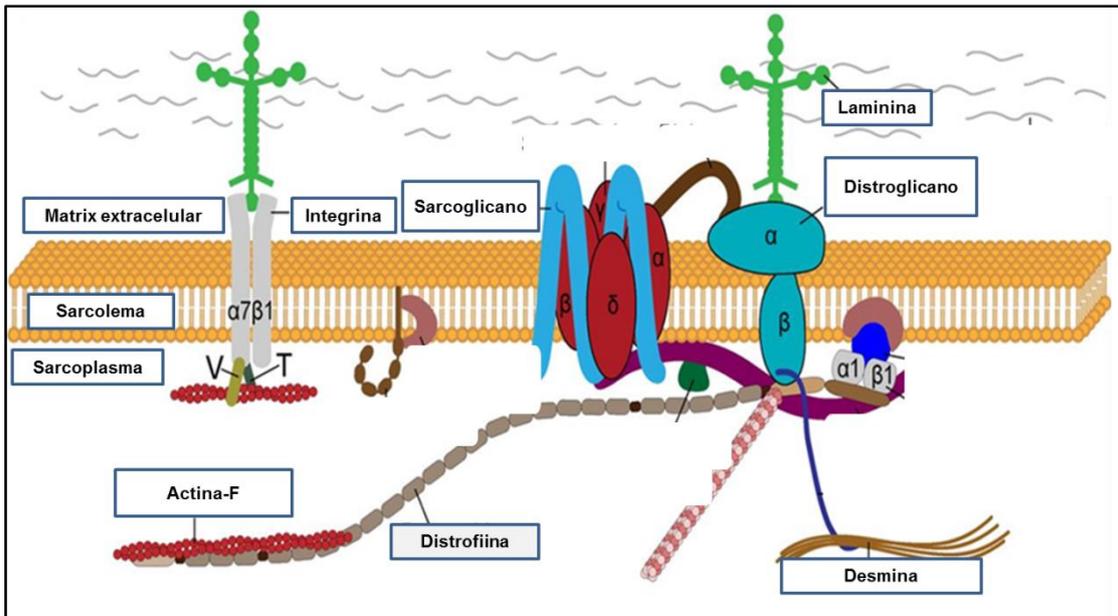


Figura 1.4: Estruturas do complexo de interações e localização das principais proteínas envolvidas nesse complexo. A mutação das proteínas do complexo sarcoglicano, podem acarretar diferentes tipos de distrofias, como a distrofia muscular congênita, que é causada pela mutação na cadeia $\alpha 2$ da laminina. Observamos também a interação das proteínas da ECM (Laminina 211, específica do músculo esquelético) com os receptores de membrana, como as integrinas e o complexo distroglicano. (Adaptado Ranimov e Kunkei, 2013).

Silva-Barbosa e colaboradores (2008) demonstraram que a irradiação dos músculos de camundongos promoveu um aumento significativo da deposição da molécula de LM, e mioblastos humanos transplantados no músculo de camundongo imunodeficiente estavam localizados em áreas ricas em LM (98). Nos experimentos *in vitro*, os autores demonstraram um aumento na migração e sobrevida dos mioblastos, "plaqueadas" sobre a LM111 (98). Este trabalho mostra como os processos biológicos (sobrevivência, proliferação e migração) estão relacionados e são alvos para estudo em modelos experimentais e em ensaios pré-clínicos.

Posteriormente, Goudenege e colaboradores (2009), baseados no trabalho de Silva-Barbosa e colaboradores (2008), demonstraram que a injeção dos mioblastos com a LM111, melhorou a capacidade regenerativa das células injetadas em músculo de camundongo, e demonstrou que esta isoforma aumentou a proliferação e migração dos mioblastos *in vitro* (99). Além disso, outro estudo evidenciou que a injeção de LM111 em músculos de camundongos $dy^{w/-}$ (possui uma mutação na cadeia $\alpha 2$ de LM), e que apresentam severa distrofia muscular, aumentou a expressão da integrina $\alpha 7$, estabilizando o

sarcolema, restaurando os níveis de creatina-quinase (CK) e protegendo o músculo do dano causado por exercício (100). De forma complementar, foi também relatado que a terapia com a LM111 reduz a patologia muscular em *dy^w*^{-/-} (73).

2 Justificativa

O transplante de células precursoras de músculo esquelético tem sido visto como potencial estratégia no tratamento de distrofias musculares (101) (20). No contexto da terapia celular utilizando mioblastos, a morte das células transplantadas tem sido descrita como um dos principais obstáculos desta estratégia (42). Vários trabalhos mostram uma morte massiva de mioblastos de camundongos após a transplantação nos músculos receptores. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos causadores da morte de mioblastos humanos após o transplante e os dados da literatura são conflitantes em relação à intensidade e quantidade dessa morte, e necessitam ser melhor compreendidos (101) (49). Utilizando modelo de xenotransplante, no qual mioblastos humanos são transplantados no músculo tibialis anterior de camundongos imunodeficientes (RAG2-/- γ C-/-) após criação muscular, nosso grupo demonstrou uma diminuição progressiva na proliferação e dispersão dos mioblastos humanos transplantados. De forma interessante, foi observada uma correlação entre a diferenciação precoce destas células com a redução da proliferação e migração (44). Com o mesmo modelo descrito acima, dados preliminares do grupo indicam que mioblastos humanos não sofrem uma morte rápida e maciça após a transplantação na cinética de até 3h, como demonstrado na literatura para mioblastos murinos. Porém, uma importante morte é observada 12 h e 24 h após a injeção (Figura 2.1), que parece ser causada por apoptose visto que estas células expressam caspase-3 ativa. O fato de a maioria das células humanas apresentarem uma diminuição da expressão de caspase-3 após 24 h da injeção, pode ser consequência destas células expressarem moléculas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e FLIP (Figura 2.1), o que reforça a apoptose como principal mecanismo causador da morte das células injetadas.

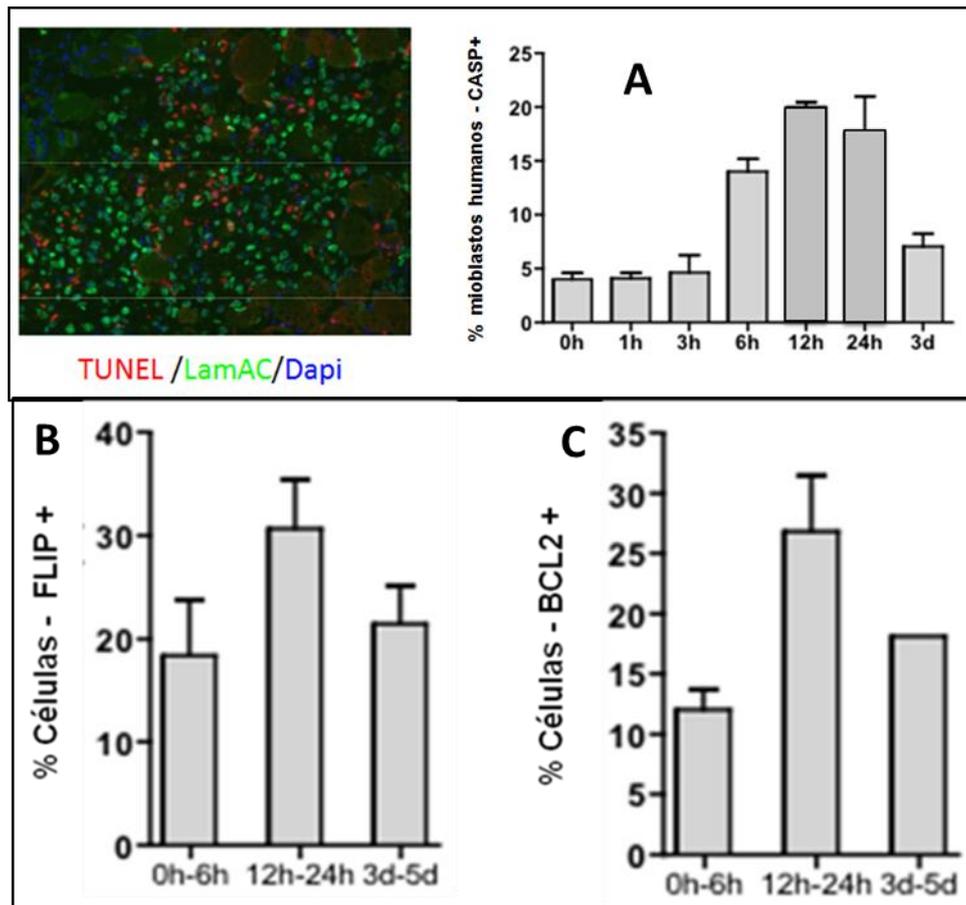


Figura 2.1: Expressão de marcadores apoptóticos e anti-apoptóticos em mioblastos humanos após o transplante em camundongos imunodeficientes RAG-/- γ C-/-. A imagem representada mostra, por imunofluorescência, mioblastos humanos (em verde, marcados com anticorpo monoclonal anti-lamina a/c específica humana; em vermelho, os núcleos são marcados com TUNEL e em azul, os núcleos das células viáveis são marcados com Dapi). Podemos observar células duplo positivas (mioblastos humanos em verde, em apoptose, em vermelho) e núcleos corados em azul (DAPI). n=3. Os gráficos mostram o percentual de mioblastos humanos positivos para (a) caspase-3, (b) c-FLIP e (c) Bcl-2. Na figura (a), (b), (c) observamos um maior percentual de células marcadas com esses marcadores de morte entre 12 h e 24 h após a transplantação no músculo de camundongos imunodeficientes.

Ainda utilizando o mesmo modelo descrito acima, nosso grupo demonstrou que mioblastos humanos injetados se localizam em áreas ricas em LM (98) (44). Apesar do músculo maduro expressar somente as isoformas LM211 e LM221, vários trabalhos vêm demonstrando o papel da isoforma LM111 na melhora do processo de regeneração muscular e como coadjuvante em protocolos de terapia celular, melhorando a eficácia dos mioblastos transplantados (102). Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos que promovem a regeneração muscular melhorada pela LM111. Mais ainda, alguns dados da literatura sugerem a presença transitória de outras isoformas, além das

que possuem a cadeia $\alpha 2$, no processo de regeneração muscular. Visto que o nicho onde as células são injetadas pode influenciar o comportamento das células transferidas, esse conhecimento também será importante para melhorar a eficácia da terapia celular (102).

Dessa forma, torna-se indispensável compreender os mecanismos de morte e entender o papel protetor das diferentes isoformas LM na sobrevivência dos mioblastos *in vitro*, que pode não somente contribuir para uma melhor eficácia do uso de mioblastos em terapia celular, mas também pode fornecer conhecimento básico sobre o papel de diferentes isoformas de LM (ainda pouco explorado na literatura) na biologia da regeneração muscular e nas vias de apoptose.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar o papel das diferentes isoformas de LM na sobrevivência de mioblastos *in vitro* em proliferação, visando promover uma melhor utilização da LM em protocolos de terapia celular.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão de cadeias de LM na proliferação e diferenciação de mioblastos humanos.
- Caracterizar o efeito da STS na morte dos mioblastos humanos; avaliando a concentração e tempo de tratamento.
- Verificar a modulação da expressão de cadeias de LM e seus receptores após a indução da morte por STS.
- Avaliar o papel de diferentes isoformas de LM na proteção da morte de mioblastos humanos induzida por STS.
- Estudar as vias de sinalização de morte induzidas por STS, tratadas ou não por isoformas de LM.
- Estudar os possíveis mecanismos de proteção à morte promovidos pela LM.

4 Material e Métodos

4.1 Cultura celular

A linhagem de mioblastos humanos (denominados CHQ) isolados a partir de biopsia de tecido muscular (103) (104) foram gentilmente cedidos pelo grupo coordenado pelo Dr. Vincent Mouly (Paris, França). Para replicação, as CHQs foram cultivadas em meio X (meio 199 (LGC) + DMEM), suplementado com 20% de soro bovino fetal (Gibco) e 50 µg/ml de gentamicina (**meio de proliferação**). Para induzir a formação de miotubos, as células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) sem soro bovino fetal, suplementado com 50 µg/ml de gentamicina (Gibco) mais 10 µg/ml de insulina recombinante humana (pH= 2 – 2.5) (SAFC Biosciences) (**meio de diferenciação**) a 37°C em 5% de CO₂ atmosférico (44).

As alíquotas contendo CHQ são estocadas em nitrogênio líquido e foram descongeladas em banho maria a 37°C e ressuspensas em 10 mL de meio X suplementado com 20% de soro e 50 µg/ml de gentamicina (Gibco). As CHQs foram expandidas em estufa, a 37°C em 5% de CO₂ atmosférico em placas de petri de 100 mm, até obter uma confluência de aproximadamente 70% (para evitar a indução da diferenciação). Para a replicação das CHQs, o sobrenadante foi descartado, e em seguida, as células foram lavadas com PBS (Sigma-Aldrich) e posteriormente incubadas com a solução de Tripsina 0,25%/EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich). Após o bloqueio da tripsina, com a solução de meio X suplementado com soro fetal bovino (Gibco), a contagem celular foi feita a partir de uma amostra da suspensão celular em câmara de “Malassez” para obtenção do número de células presentes na solução total, com o auxílio do microscópio óptico de campo claro. Em seguida, as CHQs foram distribuídas em placas de Petri de 100 mm, em baixa confluência e incubadas na estufa.

O número de divisões da população de CHQ nas placas de cultura devem ser contabilizados e controlados. Como é uma linhagem obtida de cultura primária, e não imortalizada, entram em senescência após um número limitado de divisões (cerca de 60). Essa capacidade proliferativa limitada é devida a uma redução progressiva do tamanho do DNA telomérico, gerando senescência (43). Em experimentos *in vitro*, utilizamos células com menos de 40 divisões. O marcador desmina é expresso em células musculares e está ausente em

fibroblastos, contaminantes “naturais” dessas culturas. A “pureza miogênica” da cultura é determinada pelo número de CHQs positivas para desmina (anticorpo primário anti-desmina feito em coelho, clone D33-DAKO) (Figura 6). Para a realização dos experimentos, utilizamos culturas com uma “pureza miogênica” superior a 70%.

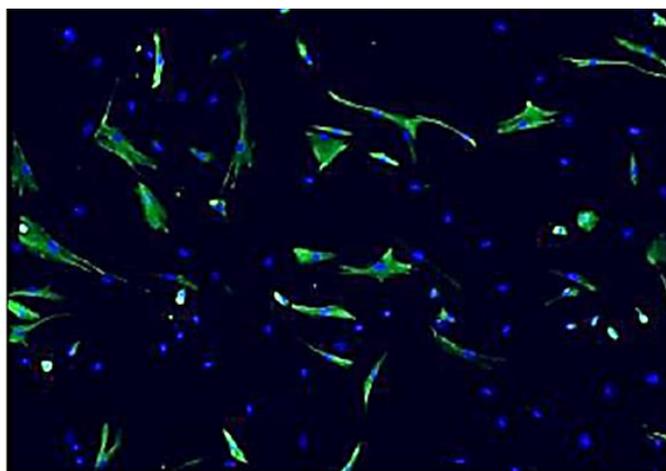


Figura 4.1 : Miogenicidade das CHQs *in vitro*. Marcação para desmina em verde (anticorpo primário purificado anti-desmina feito em coelho e anticorpo secundário anti-coelho FITC) e o núcleo em azul marcado com DAPI. Aumento 200x.

4.2 Reagentes

Utilizamos as isoformas de LM 111, 211, 311, 332, 411, 421 e 511 (Biolamina, Sundbyberg, SWE), e em alguns experimentos a LM111 de camundongo (derivada do tumor EHS) (Sigma-Aldrich), albumina do soro bovino (BSA) e o diluente da LM (PBS, 0,02% NaN₃ e 10% glicerol).

As CHQs, foram tratadas com diferentes concentrações e em diferentes tempos com estaurosporina (STS) (Sigma, USA), que já foi descrita na literatura como uma molécula capaz de induzir vários tipos de células a apoptose (105) (98), ou a β -lapachona (Sigma, USA) uma molécula capaz de induzir a morte celular por apoptose em vários tipos de células cancerígenas humanas *in vivo* e *in vitro* (106) ou o H₂O₂ (Merck Millipore, EUA), um indutor de estresse oxidativo, que tem sido demonstrado induzir apoptose em diferentes tipos celulares (107) (108) inclusive em mioblastos (109).

4.3 Tratamento e “coating” com a isoformas de LM

Nos experimentos de “coating”, as diferentes isoformas de LM foram adicionados às placas em concentração e tempo seguindo as instruções do fabricante (Biolamina). As diferentes isoformas de LM foram usadas na concentração de 10 µg/ml diluída em DPBS (LGC) e foram adicionadas às placas de cultura de forma a cobrir toda a superfície. O “coating” foi mantido por 2 h a 37°C na estufa ou a 4°C “overnight”. O excesso de LM foi retirado e as células foram plaqueadas. O BSA e a LM111 de camundongo seguiram o mesmo protocolo. Nos experimentos de “tratamento”, diferentes concentrações de LM111 foram adicionadas diretamente nas culturas de CHQ em meio de proliferação e deixadas por 2 h. Posteriormente, as CHQs foram induzidas a morte com os diferentes indutores de morte (5 µM ou 1 µM STS, 100 µM H₂O₂ e 10 µM β-lapachona). Após a indução, as células foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 2 h, 3 h, 6 h e 16 h. O sobrenadante foi recuperado e adicionado às células que foram obtidas após a tripsinização com a solução de Tripsina 0,25%/EDTA 0,02% (Sigma-Aldrich). Em seguida, células foram neutralizadas com meio de proliferação mais soro fetal bovino (Gibco).

4.4 Citometria de Fluxo

Após os ensaios de indução de morte, as células foram recolhidas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS e novamente centrifugadas. Posteriormente, as células foram ressuspensas com tampão anexina (BD Pharmigen) e foi adicionado em cada amostra 10 µg/mL Anexina-V APC (BD Pharmigen) ou 10 µg/mL Anexina-V FITC (BD Pharmigen) e incubados ao abrigo da luz, a 4°C por 10 minutos. A seguir, 10 µg/ml iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich) foram adicionados antes do início da leitura das amostras no citômetro de fluxo.

A análise dos receptores de LM foi realizada por citometria de fluxo, em placas de fundo V, em concentração de 5 x10⁴ células por poço. Para marcação das cadeias α de integrina foram utilizados os anticorpos primários anti-α6 conjugado a FITC (CD49f, BD Pharmigen) e o anti-α3 conjugado PE (CD49c,

BD Pharmigen), incubados a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas, ressuspensas com PBS (Sigma-Aldrich), e adquiridas para análise em citômetro de fluxo.

Para marcação de proteínas intracelulares como Caspase-3, Bcl-2, Bax. As células foram plaqueadas em placas de fundo V, na concentração de 5×10^4 . Em seguida, as células foram centrifugadas à 300G por 5 minutos. Posteriormente, o bloqueio da marcação foi realizado com soro humano por 15 minutos a 4°C. Após o bloqueio, as células foram fixadas e permeabilizadas com o kit BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C. Subsequentemente, as células foram lavadas 2 vezes com a solução "Perm/wash" (1/10, BD Biosciences) por 5 minutos. A seguir, foi realizado o bloqueio dos receptores da porção Fc de imunoglobulinas pela marcação com anticorpo anti-receptor Fc (24g2, BD Pharmigen) por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram marcadas com o anticorpo primário por 30 minutos a 4°C. Para marcação de caspase-3 ativa foi utilizado o Kit Apoptose caspase-3 ativa PE (1/6, BD Pharmigen), e após a marcação as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo. O Bcl-2 foi marcado com o anticorpo primário purificado anti-Bcl2 feito em Hamster (1/10, Clone N19, Santa Cruz) e o Bax com o anticorpo primário purificado anti-Bax feito em coelho (1/10 Santa Cruz) diluídos em "Perm/wash" (BD Biosciences). Após a marcação com os anticorpos primários purificados, as células foram lavadas novamente com o Permwash (BD Biosciences). Em seguida, as células foram marcadas com o anticorpo secundário anti-hamster conjugado com FITC (Invitrogen) e o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com PE (Invitrogen) por 30 minutos à 4°C. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com "Perm/wash" e ressuspensas com PBS (Sigma-Aldrich) e adquiridas para análise em citômetro de fluxo.

Os dados foram adquiridos no FACS canto II-BD Biosciences ou no aparelho MoFlo ASTRIOS *Cell Sorter* (Beckman Coulter). A análise dos resultados foi realizada utilizando os programas Summit 6.2.3 (Dako Cytomation) ou BD FACSDiva.

4.5 Imunofluorescência

As CHQs foram plaqueadas na placa de Petri de 35mm na concentração de 3×10^4 por placa, ou na concentração de 1×10^4 após 24 h, foram induzidas a morte com $1 \mu\text{M}$ de STS por 3 h, 6 h e 16 h para investigar as moléculas envolvidas nas vias de morte, como a caspase-3 (anticorpo primário purificado anti-caspase-3 ativa, ABCAM); Parp (anticorpo primário anti-Parp clivada (Dy light 488), ABCAM). Verificamos como a modulação da expressão das cadeias α de LM (anticorpo primário anti- $\alpha 1$ R&D; anticorpo anti- $\alpha 2$ Millipore; anticorpo anti- $\alpha 4$ Santa Cruz; anticorpo anti- $\alpha 5$ (clone 4c7) DAKO) e a expressão das cadeias α de integrina (anticorpos anti- $\alpha 7$ (CD49g, ABCAM) e anti- $\alpha 6$ (CD49f, BD Pharmingen) após a indução com STS. Os anticorpos secundários utilizados foram o alexa 488 e alexa 555 (Invitrogen).

As células foram fixadas e permeabilizadas com etanol e lavadas com PBS (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. Em seguida, foram bloqueadas (PBS, 2% de soro de cabra, 1% de BSA e 0,3% de triton-X) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o bloqueio da marcação, os anticorpos primários foram incubados por 1 h nas mesmas condições. Posteriormente, a marcação foi revelada usando o anticorpo secundário com incubação de 30 minutos. Para a visualização nuclear foi utilizado o intercalante de DNA DAPI (Life). As imagens foram observadas em microscópio fluorescência ZEISS AXIO IMAGER A2 com aumento de 100 a 400 vezes e as imagens foram analisadas com o programa Image J (Broken Symmetry Software versão 1.4.3.67).

4.6 TUNEL

Para determinar a apoptose celular *in vitro*, utilizamos a técnica de TUNEL (“terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling”). As CHQs foram plaqueadas com a concentração de 5×10^3 em cada poço das placas de Lab-Tek com 8 poços, e foram mantidas em meio de proliferação. Após três horas de tratamento com $1 \mu\text{M}$ STS, nós avaliamos a apoptose a partir do ensaio de TUNEL, utilizando-se o kit Apoptag® RED *In Situ* Apoptosis detection kit (Chemicon, USA & CA). Para a visualização nuclear, foi utilizado o intercalante de DNA DAPI (Life). As imagens foram observadas em microscópio

de fluorescência ZEISS AXIO IMAGER A2 com aumento de 100 a 400 vezes e as imagens foram analisadas com o programa Image J (Broken Symmetry Software versão 1.4.3.67).

4.7 Western blotting

As CHQs em placas de cultura de 100mm foram induzidas com 5 μ M STS por 3 h, 6 h e 16 h em meio de proliferação a 37°C. Após o período de incubação, as células aderentes foram retiradas, lavadas duas vezes com PBS (Sigma-Aldrich) e lisadas com PBS (Sigma-Aldrich) mais inibidores de proteases e fosfatases. Após serem recolhidas, as proteínas obtidas desse processo foram quantificadas no Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, USA) e foi adicionado 80 μ g de proteína por poço. O lisado total foi submetida à SDS em gel de 4%-12% acrilamida. As bandas resultantes foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando o kit iBlot[®] Dry Blotting System (Invitrogen, USA). Em seguida, as membranas foram bloqueadas com TBS 1x mais 5% de leite em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-caspase-3 ativa (1/200, ABCAM) diluído em TBS + Tween 0,1% a 4° C “overnight”. Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS + Tween 0,05% durante 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho HRP (1/1500, Cell signaling). A revelação da reação foi visualizada usando a solução ECL (GE-Healthcare, Amersham, Brasil) e as imagens das bandas foram obtidas no scanner C-DIGIT (Li-COR, USA).

4.8 PCR em tempo real da cadeia α de LM e a cadeia α de integrina

As CHQs em placas de cultura foram induzidas ou não com 5 μ M STS por 3 h, 6 h e 16 h em meio de proliferação a 37°C. Após o período de incubação as células foram retiradas e lavadas duas vezes com PBS e as amostras foram mantidas a 4°C até o uso. O isolamento do RNA mensageiro (RNAm) usando RNeasy minikit (Qiagen, Brasil) e da síntese do DNA complementar (cDNA) a partir de 2 μ g de RNAm das amostras usando a SuperScriptTMII RT (Invitrogen, USA). O RT-PCR foi realizado com SyberGreen[®] PCR Master Mix (Applied

Byosystems, USA) e a máquina StepOne Plus™ (Applied Biosystem, USA), e os oligonucleótidos (“primers”) específicos listados na (Tabela 1). As sondas moleculares já foram projetadas através do programa Primer express® (Applied Byosystems, USA). A análise dos resultados foi realizada no software SDS 2.3 (Applied Byosystems, USA), e os valores do ciclo de “threshold” (Ct) para cada RNAm foram normalizados contra RNAm de RPL13A, e cada nível de expressão relativa do gene alvo foi calculado pela seguinte fórmula: $n = 2^{-\Delta Ct}$, onde ΔCt representa ΔCt (Alvo) das células tratadas – ΔCt (housekeeping) das células tratadas.

Tabela 1 : Descrição de “primers”utilizados. **(F) do inglês, Forward, (R) do inglês, “Reverse”**.

Gene	Sequência do "primer"	Cadeia	Isoformas de LM
LAMA1 (F)	TGGAGTACGTTCCCGGCGCT	α1	111, 121
LAMA1 (R)	AGGCGAACGTGCGGATGCTT		
LAMA2 (F)	GGGCTCAGGAATGGCTTCCGTTG	α2	211,221,212/222, 213
LAMA2 (R)	TTCTCAGCGTTGGCAGGCCAC		
LAMA4 (F)	AGCAGAAGCGACCTGCAAGCA	α4	411,421,423
LAMA4 (R)	GTTCCGGCCGCTTCACAGGG		
LAMA5 (F)	GGCCTGGAGTACAACGAGGTCAAC	α5	511,521,522,523
LAMA5 (R)	CCAGGGGCACGATGCGTGAGT		
ITGA6 (F)	GGCCATGCACGCGGATCGA	α6	-
ITGA6 (R)	CGACCTTGCCCCCTGGACCTT		
ITGA7 (F)	GGTGAGGGGCGAGAGAGCCA	α7	-
ITGA7 (R)	CTTTCTGCCAGGCCCTGC		

4.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estaticamente utilizando os testes t-Student e Anova, e foram considerados significativos quando os valores de p foram menores que 0,05 ($p < 0,05$). Para tais análises foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.

5 Resultados

5.1 Expressão das isoformas de LM e seus receptores na proliferação de CHQs *in vitro*.

É sabido que a membrana basal que circunda a fibra muscular possui as isoformas LM211 e LM221 como seus principais componentes, que juntamente com outros elementos da ECM, como colágenos IV e VI, formam essa estrutura que é fundamental para a estabilidade e sobrevivência da fibra. Porém, nenhuma das outras isoformas de LM são expressas na fibra muscular madura.

Como diversos trabalhos vêm demonstrando o potencial da isoforma LM111 em melhorar o processo de regeneração muscular em diferentes modelos animais de patologias musculares (102), e que a expressão transitória das cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ de LM foi observada durante o processo de regeneração muscular em camundongos (110) (88), decidimos investigar *in vitro*, a expressão das cadeias de LM durante a regeneração muscular, ou seja, na proliferação e diferenciação dos mioblastos humanos (CHQ). Observamos que na proliferação, células CHQ expressam somente a cadeia $\alpha 1$ de LM. Com a indução da diferenciação, essa cadeia continua presente, mas outras cadeias são expressas temporalmente de forma diferente na cinética: a cadeia $\alpha 4$ no início da diferenciação, quando poucos miotubos estão presentes; a cadeia $\alpha 5$ no dia 3 de diferenciação, bem expressa nos miotubos e a cadeia $\alpha 2$, detectada mais tardiamente (Figura 5.1). Pelo menos até o dia 7 após a indução da diferenciação *in vitro*, todas as cadeias de LM acima descritas estão presentes preferencialmente nos miotubos (formados a partir da fusão dos mioblastos).

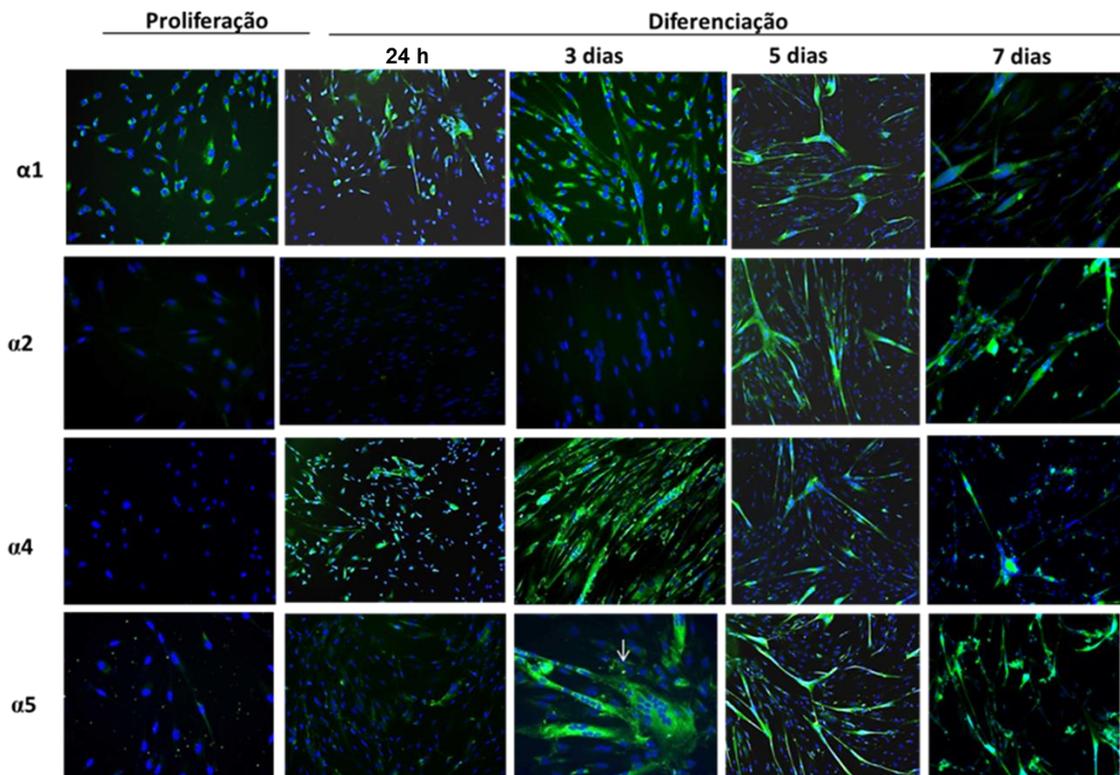


Figura 5.1: Expressão de diferentes cadeias de LM durante a proliferação e diferenciação das CHQs *in vitro*. Os núcleos estão marcados com DAPI (azul). As diferentes cadeias de LM estão marcadas em verde. Os pontos de diferenciação foram: 24h, 3, 5 e 7 dias. No dia 3 pós-diferenciação, a formação de miotubos é evidente (seta). Resultado representativo de 6 experimentos independentes. Aumento de 100x para $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e aumento de 200x para $\alpha 4$ e $\alpha 5$.

A interação da fibra muscular e das células satélites com a LM211 e 221 que circunda esses elementos são mediadas por dois receptores, a integrina $\alpha 7\beta 1$ e o complexo distroglicano (111). Visto que foi demonstrado que a integrina $\alpha 6$ foi expressa transitoriamente em células miogênicas durante a regeneração em músculos de camundongos, decidimos investigar a expressão de alguns receptores de LM nas CHQs (88). Confirmamos a expressão da integrina $\alpha 7$ por imunofluorescência, mas observamos uma expressão muito baixa da integrina $\alpha 6$ por citometria de fluxo (Figura 5.2). Além desses receptores, também investigamos a expressão da cadeia $\alpha 3$ de integrina, que não é ligante exclusivo de LM (Figura 5.2). Esses resultados indicam que as CHQs em proliferação expressam diferentes receptores capazes de se ligar a LM.

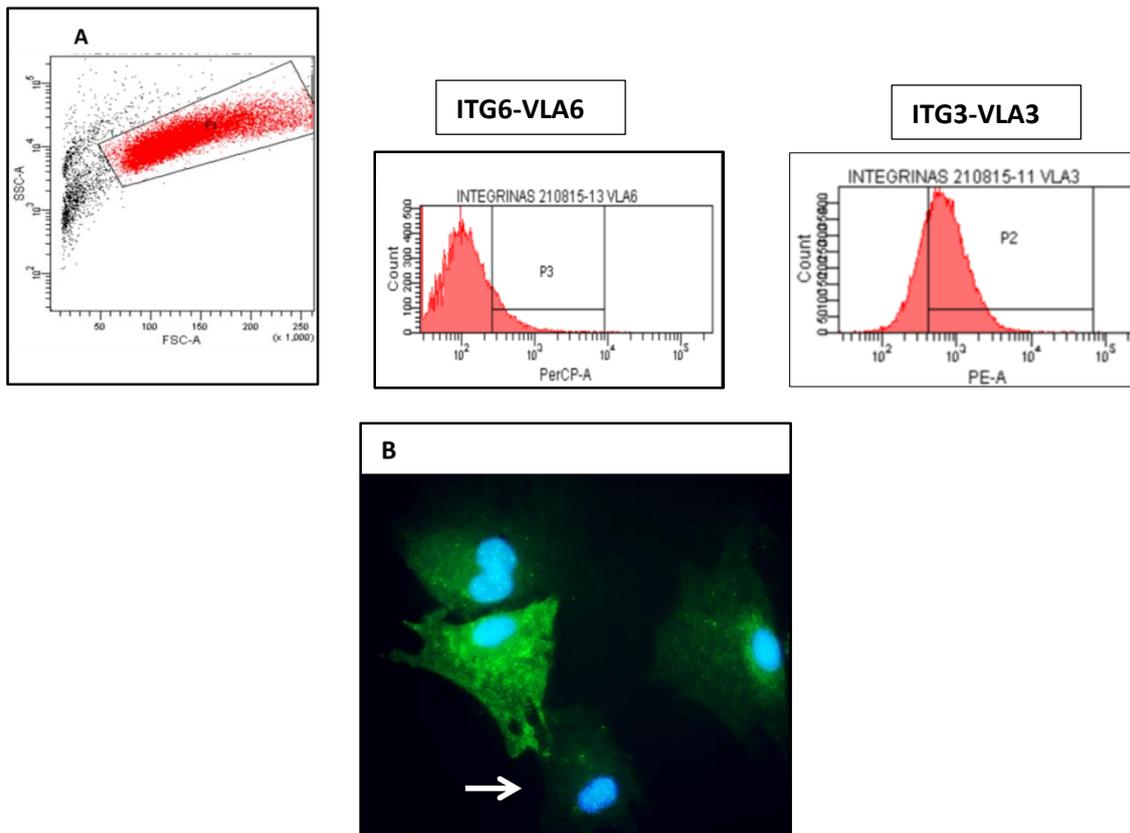


Figura 5.2: Expressão de receptores de LM nas CHQs em proliferação. (A) A esquerda podemos observar o “DotPlot” representativo da região dos mioblastos humanos. Podemos observar dois histogramas representativos da marcação das integrinas $\alpha 3$ e $\alpha 6$ (VLA-3 e VLA-6 respectivamente). O “DotPlot” e os histogramas de citometria de fluxo são representativos de três experimentos independentes. (B) Marcação para a integrina $\alpha 7$ (verde) nas CHQs em cultura, em meio de proliferação. A seta mostra célula negativa para $\alpha 7$ (fibroblasto) ou mioblasto que expressa muito pouco a molécula. Aumento 400x. N=3

5.2 Caracterização da morte induzida por STS nas CHQs

5.2.1 Escolha da STS como indutor de apoptose e definição dos parâmetros de análise citofluorométricos.

Nosso próximo objetivo foi o de analisar se as isoformas de LM poderiam promover um aumento da sobrevivência dos mioblastos humanos. Para isso, utilizamos a STS como indutora de morte por apoptose. Nos nossos primeiros experimentos, utilizamos doses de STS entre 0,5 e 1 μ M, fundamentados em estudos já publicados (116) (117).

Nessa etapa do trabalho, decidimos caracterizar de forma detalhada a concentração de STS ideal para o estudo de morte celular e os protocolos para a adequada análise dessas células e dos efeitos de indução de apoptose por

citometria de fluxo. Primeiramente, a região 1 (P1) foi definida para retirada dos debrís (Figura 5.3 a). A partir da região de exclusão de debrís, nós obtivemos uma região com os percentuais de células vivas, necróticas e apoptóticas (Figura 5.3 b), com a definição das regiões de células vivas (P2 – AnexinaV e PI negativos), apoptóticas (P3 – Anexina V positivo e PI negativo) e necróticas/apoptóticas tadius (P4- Anexina V e PI positivos). Os dados demonstrados no retângulo vermelho mostram os percentuais das mesmas populações sem a região P1, considerando todo o “Dotplot” na figura 5.3 a, enquanto o retângulo azul mostra os percentuais dentro da região P1 mostrando as regiões vivas P2, apoptóticas P3 e necróticas P4.

A figura 5.3 c é representativa de um experimento em que a autofluorescência foi observada nos “DotPlots”, que é geralmente um problema nas análises das CHQs. Dependendo do citômetro e das condições experimentais, uma importante autofluorescência nas CHQs é observada, e as regiões de células vivas, apoptóticas e necróticas foram modificadas para que essa autofluorescência não interferisse nos resultados.

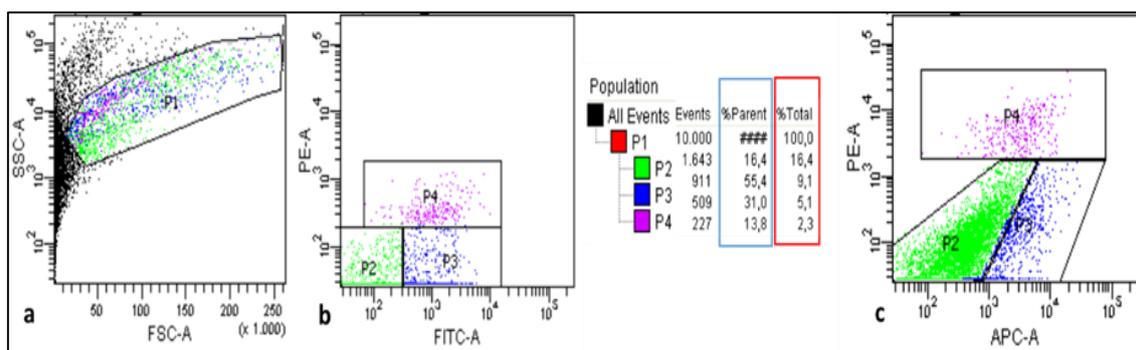


Figura 5.3: Dotplots” representativos das CHQs tratadas com 5 µM de STS por 16 h. (a) A figura A mostra um “DotPlot” representativo de tamanho e granulosidade. O P1 mostra a região de células vivas, necróticas e apoptóticas, excluindo os debrís, pontos (dots) pretos a esquerda do “DotPlot”. (b) A figura b mostra o “DotPlot” obtido a partir da região P1, com a definição das regiões de células vivas (P2 – AnexinaV e PI negativos), apoptóticas (P3 – Anexina V positivo e PI negativo) e necróticas/apoptóticas tadius (P4- Anexina V e PI positivos). O retângulo vermelho mostra os percentuais das mesmas populações sem a região P1, considerando todo o “Dotplot” na figura 5.3, enquanto o retângulo azul mostra os percentuais dentro da região P1 (c) o “Dotplot” mostrando as regiões vivas (P2), apoptóticas (P3) e necróticas (P4) de um experimento representativo em que a autofluorescência foi observada e as regiões foram adaptadas. Nos experimentos de citometria de fluxo utilizamos PI (PE-A) e a anexina utilizada foi APC ou FITC.

Na figura anterior demonstramos a estratégia de análise da morte induzida por STS na técnica de citometria de fluxo. Para confirmar a indução da

apoptose, decidimos utilizar dois marcadores de fase terminal de apoptose, TUNEL e Parp (118) (119) (120) (121). Verificamos que a concentração de 1 μM de STS induz a apoptose, e de forma rápida (Figura 5.4). É importante notar que a STS começa também a modificar a morfologia das células logo no início do tratamento (Figura 5.4d, quando comparada com a 5.4c).

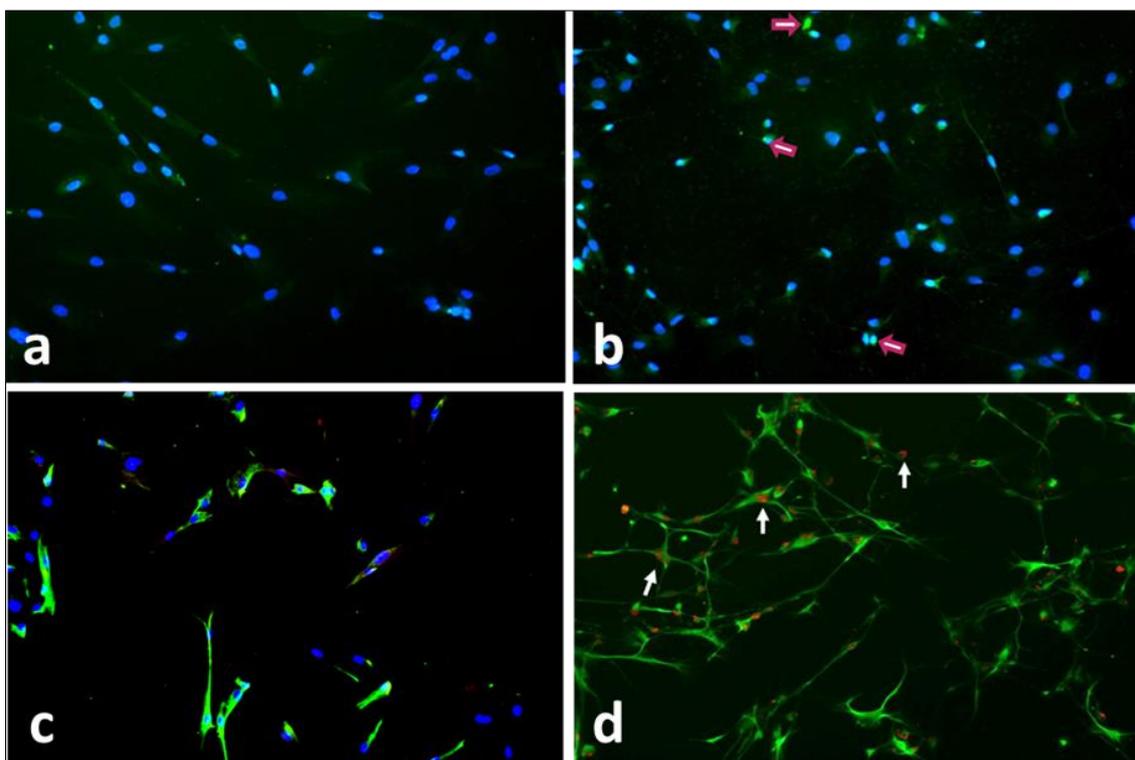


Figura 5.4: Detecção de apoptose em CHQs tratadas com STS. As CHQs foram tratadas com 1 μM de STS por 3 h (b,d). (a, c) são células controles. O tratamento induziu apoptose, verificada em (b) por Parp-clivada (marcação nuclear, em verde, setas vermelhas), e em (d) por TUNEL (marcação nuclear em vermelho, setas brancas). Na marcação por TUNEL (c, d) foi realizada dupla marcação, onde podemos observar as CHQs, positivas para desmina (verde). As imagens de imunofluorescência são representativas de cinco experimentos independentes. Aumento de 200x.

Além das marcações por anexina V/PI, Parp e TUNEL, fizemos marcações para caspase-3 ativa. Esse marcador poderia confirmar a morte por apoptose nas células. Consideramos esse um dos marcadores importantes para esse projeto, não só pelo descrito acima, mas também porque foi utilizado como o marcador de morte em trabalho anterior do grupo, no qual mioblastos humanos (CHQs) foram pré-tratados por HSP70 antes do transplante em camundongos imunodeficientes, e a caspase-3 foi utilizada para mostrar que esse tratamento

diminuiu a morte por apoptose (61). Ao contrário dos resultados obtidos no trabalho citado, não verificamos a presença de caspase-3 ativa após a indução por apoptose por STS (Figura 5.5). Outro marcador utilizado foi o Bcl-2, que é uma molécula pró-apoptótica que protege as células da morte por apoptose e é expressa nas CHQs (122). Observamos que o tratamento por STS diminuiu a expressão de Bcl-2 (Figura 5.6)

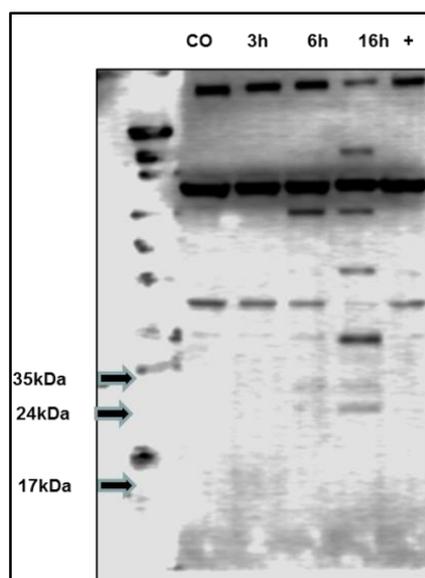


Figura 5.5: Expressão de caspase-3 ativa em CHQs tratadas com STS. As CHQs foram tratadas com STS por 16 h em meio de proliferação (Meio X+ 20% de SFB). Análise de western blotting do extrato de células que foram estimulados ou não com 5 μ M STS por 3 h, 6 h e 16 h, usando anticorpo anti-caspase-3 ativa. A análise da expressão proteica foi comparado ao controle 17kDa. Não observamos a expressão de caspase-3 ativa. A imagem representativa de três experimentos independentes.

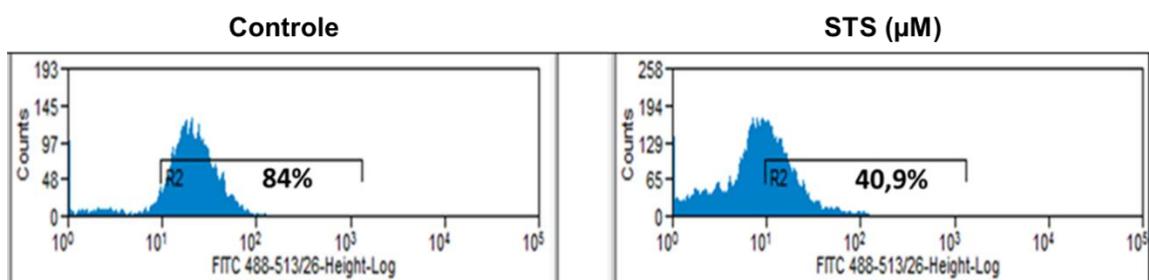


Figura 5.6: Expressão de Bcl-2 (anti-apoptótica) nas CHQs. As CHQs foram tratadas com 5 μ M de STS por 16 h. CHQs induzidas a morte por STS apresentam uma diminuição da expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica). A região R2 foi definida a partir do controle Ig. Os histogramas de citometria de fluxo são representativos de um experimento independente feito em duplicata.

Reforçando a capacidade da STS em induzir apoptose, comparamos o efeito dessa molécula com dois outros indutores de morte, a β -lapachona e H₂O₂.

Esses ensaios mostram como a STS induz preferencialmente a apoptose, enquanto a β -lapachona e o H_2O_2 , induzem preferencialmente necrose, além de promoverem uma maior mortalidade. Nos percentuais de apoptose (P3) e necrose (P4), observamos que a relação apoptose/necrose é maior no grupo tratado por STS (Figura 5.7, quadrados vermelhos). Visto isso, foi decidido continuar com a STS e verificamos a melhor concentração desse indutor de morte.

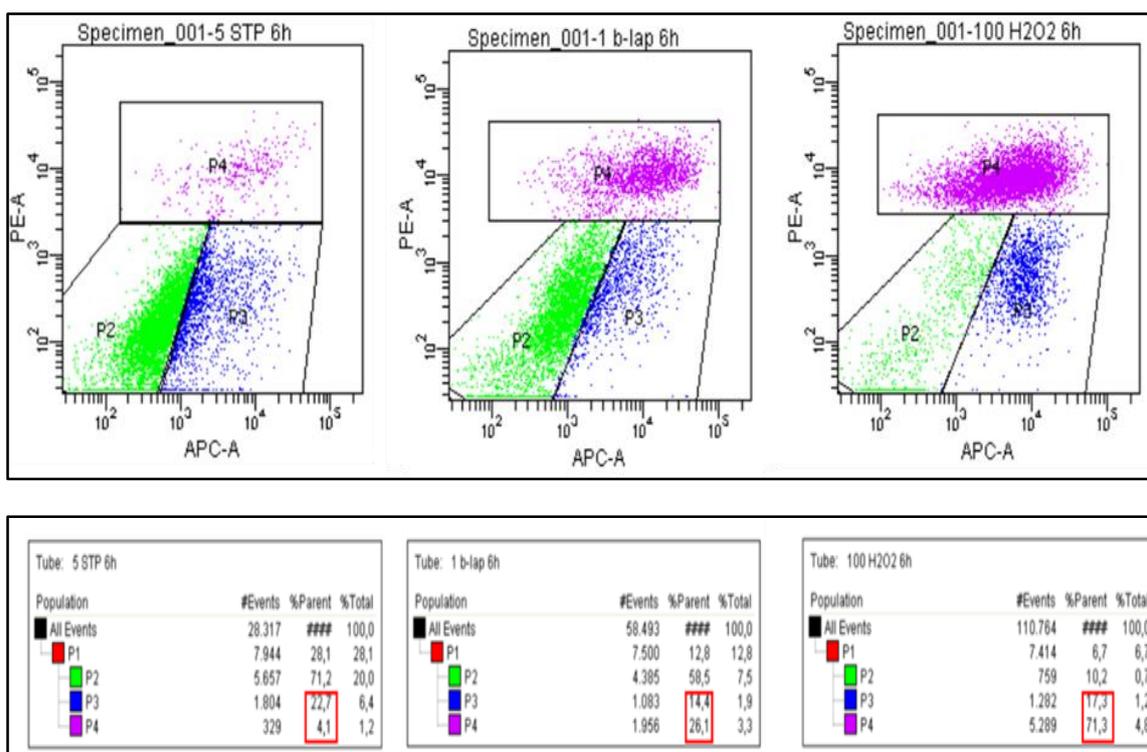


Figura 5.7 : DotPlots representativos de CHQs tratadas com diferentes indutores de morte. Da esquerda para a direita temos os tratamentos com 5 μ M de STS, 10 μ M de β -Lapachona e 100 μ M de H_2O_2 , respectivamente, por 6 h. Os quadrados em vermelho mostram que a razão de células apoptóticas em relação às necróticas no tratamento com STS é bem maior que os outros dois indutores. Podemos também notar que o tratamento com H_2O_2 , “DotPlot” à direita induz uma considerável morte por necrose, já em 6 h. Os “DotPlots” são representativos de cinco experimentos independentes.

Para definir a melhor concentração de STS para analisar as células por imunofluorescência, as CHQs foram plaqueadas, e após três dias foram tratadas com diferentes concentrações de STS (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M) nos pontos de cinética de 1 h, 3 h, 6 h e 16 h. Observação microscópica demonstrou uma mudança drástica na morfologia das células em todas as concentrações, comparadas ao controle sem estímulo. Em 1 h, as concentrações de 0,5 μ M, 1

μM , 2 μM de STS mudaram moderadamente a morfologia celular (as células diminuíram de tamanho) e a maior parte das células estavam aderidas. No ponto de 3 h, a concentração 1 μM , em relação às concentrações de 0,5 μM e 2 μM , apresentou o maior número de células aderidas e menor número de células no sobrenadante. Em 6 h, em todas as concentrações, o número de células aderidas diminuiu (Tabela 2). Devido a essas observações, decidimos usar 1 μM para células aderidas.

Tabela 2: Tabela de observação da alteração morfológica e aderência dos cultivos de mioblastos humanos tratados com STS em diferentes concentrações e tempo.

Concentração (μM)	Tempo (horas)		
	1	3	6
0,5	Pouca alteração na morfologia e poucas células no sobrenadante	Menos células aderidas e mais células no sobrenadante	Poucas células aderidas e muitas células no sobrenadante
1	Pouca alteração na morfologia e poucas células no sobrenadante	mais células aderidas e menos células no sobrenadante	Poucas células aderidas e muitas células no sobrenadante
2	Pouca alteração na morfologia e poucas células no sobrenadante	menos células aderidas e mais células no sobrenadante	Poucas células aderidas e muitas células no sobrenadante

Também testamos diferentes concentrações para os experimentos por citometria de fluxo. Ao contrário dos experimentos com células aderidas, verificamos que a concentração de 5 μM apresentou um maior percentual de células apoptóticas, sem muita necrose. Quando analisamos todos os experimentos, comparando o percentual de células vivas, apoptóticas e necróticas, não observamos diferenças significativas entre as doses de 1 μM e 5 μM , apesar de que na concentração mais alta, uma tendência de mais células apoptóticas foi observada (figuras 5.8 e 5.9). Apesar de não termos observado diferenças significativas no percentual de células apoptóticas entre os grupos tratados com 1 μM e 5 μM por citometria de fluxo nos experimentos de análise da apoptose em células aderidas, a concentração de 1 μM foi necessária, pois doses maiores podem soltar as células da placa de cultura. Também observamos que na dose de 0,5 μM a frequência de morte celular é baixa, e na concentração de 10 μM , o percentual de células necróticas aumenta em relação ao de células apoptóticas (Figuras 5.8 e 5.9).

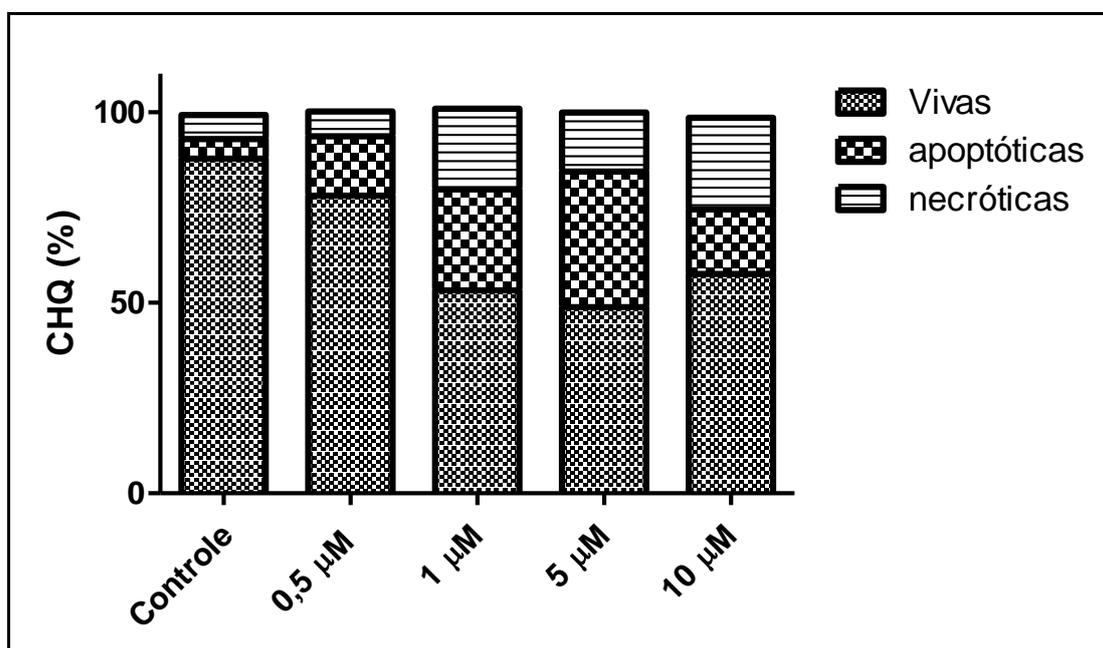


Figura 5.8 : Percentuais de células vivas, apoptóticas e necróticas após a indução da morte por STS. Gráficos que mostram o aumento da apoptose e redução das células vivas após o tratamento com STS em diferentes concentrações 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM . Apesar da diferença no número de células apoptóticas, os resultados não apresentaram diferença significativa. O controle foi normalizado como sendo 100% em cada experimento. Concentrações de STS 0,5 μM N=2, 1 μM N=3, 5 μM N=8, 10 μM N=2 em experimentos independentes.

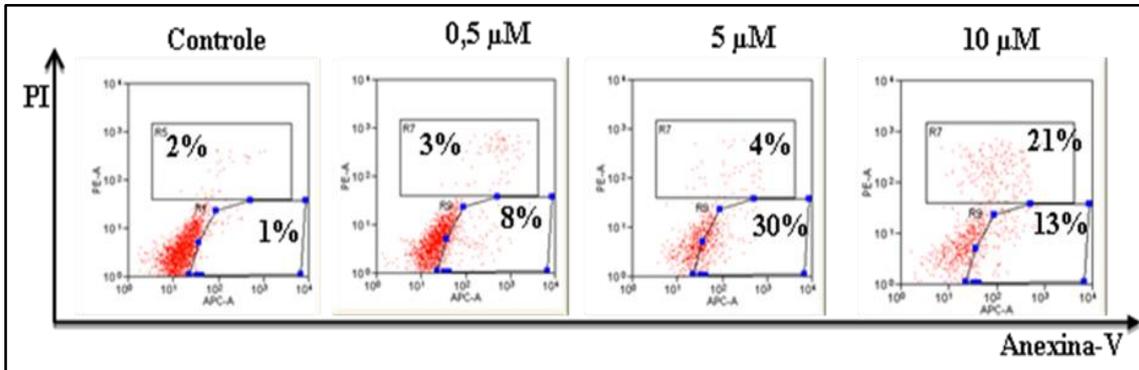


Figura 5.9 : Tratamento das CHQs com diferentes concentrações de STS. A figura mostra “DotPlots” de CHQs tratadas com as concentrações 0,5 μM, 5 μM e 10μM de STS.

5.3 Modulação da expressão de cadeias de LM após a indução da morte por STS.

Uma vez definidas as concentrações e os efeitos da STS numa cinética de tratamento sobre as CHQs, decidimos investigar se a STS poderia modular a expressão das cadeias de LM na fase proliferativa. Observamos que a STS não modulou a expressão das cadeias $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$ de LM (figura 5.10), que continuaram negativas nas CHQs como observado na figura 5.1. Porém, a expressão da cadeia $\alpha 1$ foi modulada, com aumento da deposição nas primeiras horas e posterior diminuição com o tempo de tratamento (Figura 5.10).

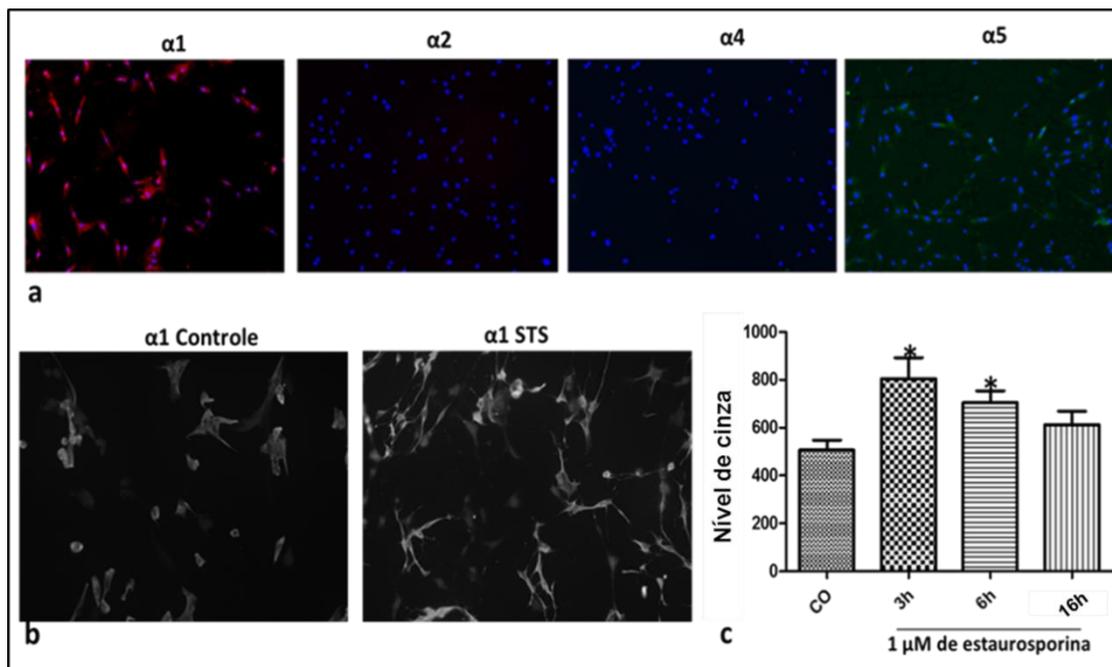


Figura 5.10 : Análise da expressão de cadeias de LM após tratamento com STS. (a) O tratamento das CHQs com 1 μ M de STS não modulou a expressão das cadeias de LM $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$ numa cinética de tempo de 3, 6 e 16 h. A cadeia $\alpha 1$, já expressa nas CHQs em proliferação, teve um aumento rápido na expressão após o tratamento, com posterior diminuição até 16 h. Em (a), temos os núcleos marcados por DAPI (azul) e as cadeias de LM marcadas em vermelho. (b) em cinza temos a marcação de LM $\alpha 1$. Aumento de 200x. Em (c) temos um gráfico mostrando a quantificação dos níveis de cinza da marcação positiva para $\alpha 1$, com auxílio do programa Image J. O teste anova foi utilizado nas análises estatísticas. Os asteriscos indicam os resultados que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Para confirmar se a modulação observada na cadeia $\alpha 1$ após o tratamento por STS foi realmente consequência de uma maior produção da molécula, fizemos o mesmo tratamento e avaliamos a expressão das cadeias de LM por RT-PCR. Verificamos que, diferentemente da imunofluorescência, nenhuma modulação da cadeia $\alpha 1$ foi observada. Porém, observamos uma maior expressão da cadeia $\alpha 2$, não significativa, e um aumento da expressão de LM $\alpha 4$ após 16 h de tratamento (Figura 5.11). Também analisamos se a expressão dos receptores de LM poderia ser modulada pelo tratamento por STS. Verificamos por PCR que a cadeia $\alpha 7$ de integrina apresenta uma tendência à diminuição após o tratamento, enquanto que a cadeia $\alpha 6$ de integrina apresenta um aumento de expressão 16 h após o tratamento (Figura 5.12).

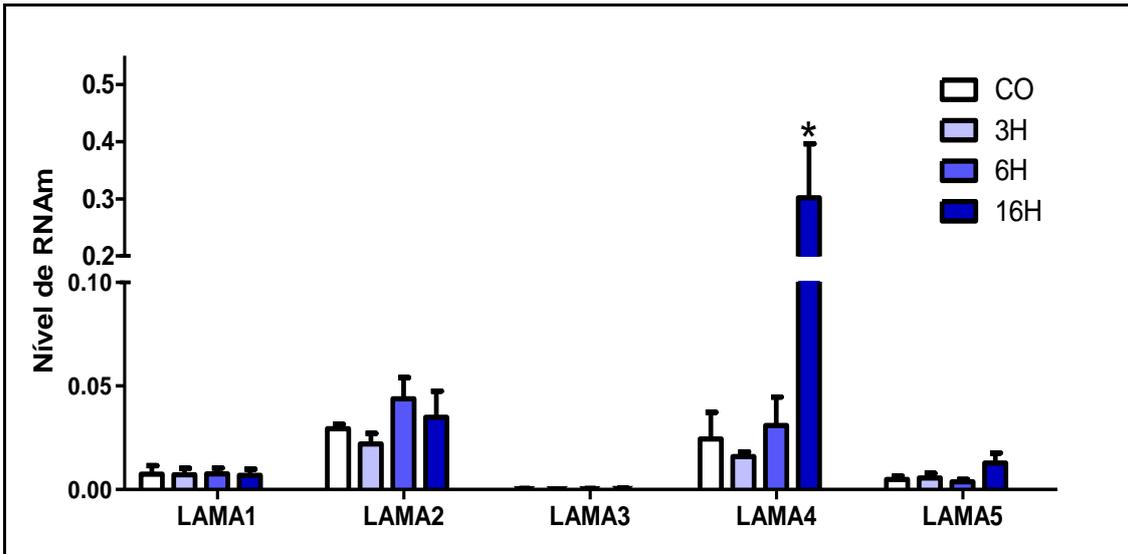


Figura 5.11 : Análise da expressão das cadeias de LM após tratamento com STS por RT-PCR. O tratamento das CHQs com 1 μ M de STS não modulou a expressão das cadeias de LM α 1, α 2 e α 5 de LM numa cinética de tempo de 3 h, 6 h e 16 h. Porém, a cadeia α 4 teve um importante aumento após 16 h de tratamento. N=3

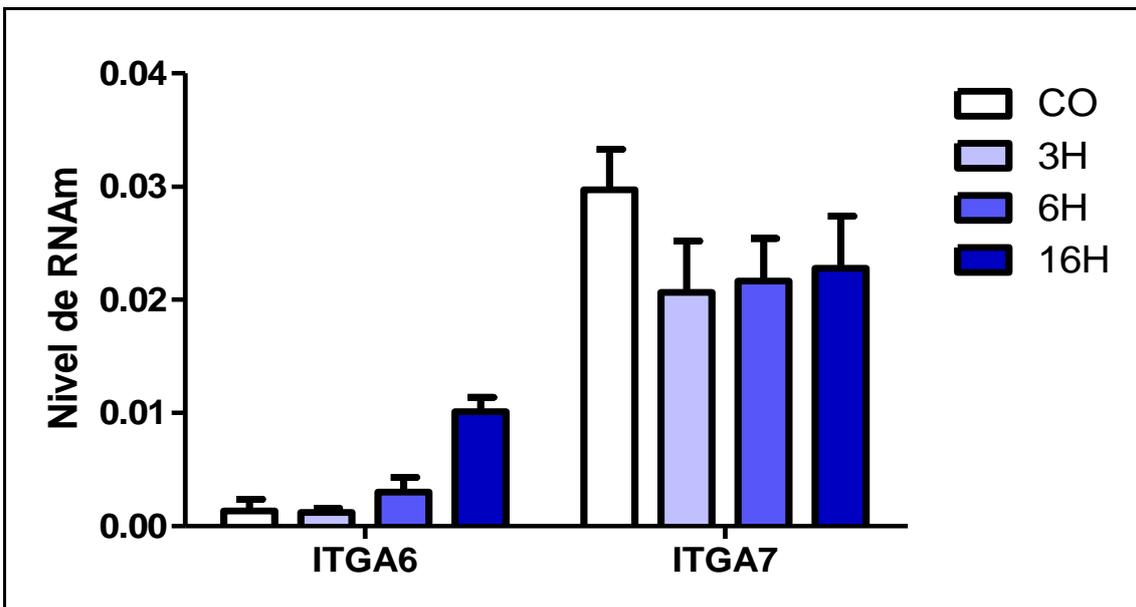


Figura 5.12 : Análise da expressão das cadeias de integrina após tratamento com STS por RT-PCR. O tratamento das CHQs com 1 μ M de STS modulou a expressão da cadeia α 7 de integrina (ITGA7) em relação a cadeia α 6 de integrina (ITGA6) numa cinética de tempo de 3 h, 6 h e 16 h. N=3.

5.4 Avaliação do papel da LM na proteção da morte induzida por STS.

Dados da literatura mostram que a LM111 protege os mioblastos da morte (98) (99) (100) (73). Para confirmar essa capacidade protetora em nosso trabalho, as células foram plaqueadas nas placas de cultura cobertas por 10 µg/ml e posteriormente tratadas com 5 µM de STS (1 h, 2 h, 6 h, 8 h). O tempo de 8 h de adesão sobre a LM foi escolhido tendo por base o tempo mínimo de adesão das células às placas de cultura sem nenhum tipo de “coating”. Nesse sentido qualquer efeito positivo da LM não se daria por causa de um possível aumento da adesão provocada pela LM.

O tempo de 8 h realmente parece ser um tempo mínimo para que as células controle, nas placas de cultura, estejam bem aderidas (Figura 5.13).

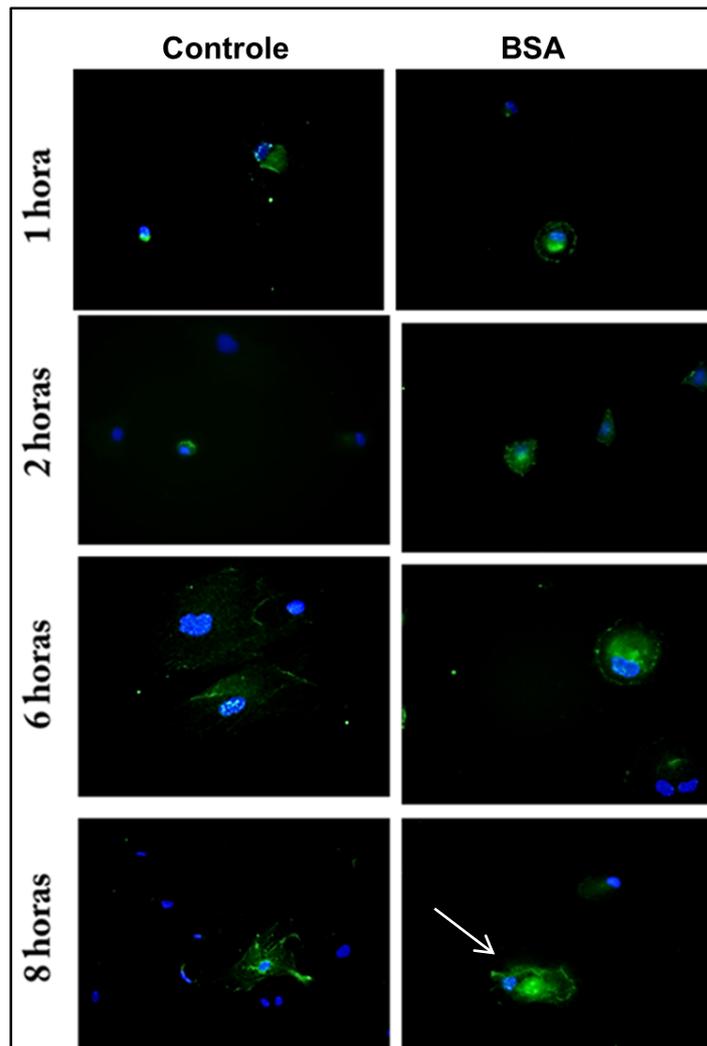


Figura 5.13 : Tempo de aderência das CHQs na cultura em meio de proliferação. As CHQs com os núcleos marcados em DAPI (azul) foram marcadas para a integrina $\alpha 7$ (verde). As células foram diretamente plaqueadas no plástico ou sobre placas tratadas com BSA. A seta indica o espreadimento das células. As imagens de imunofluorescência são representativas de três experimentos independentes. Aumento 400x.

Diversos trabalhos da literatura, vem demonstrando que a isoforma de LM111, melhora o processo de regeneração muscular. Uma vez definido o tempo de tratamento das CHQs com a LM antes da indução da morte por STS, fomos verificar se a LM111 era capaz de aumentar a sobrevivência das CHQs em processo de apoptose. Numa cinética de 4 h, 8 h e 16 h, não foram observadas diferenças significativas entre o percentual de células vivas, apoptóticas e necróticas após o cultivo das CHQs sobre a LM, quando comparados ao BSA (Figura 5.14). Porém, uma análise detalhada de cada experimento individualmente indica que a LM111 diminui a apoptose quando comparado ao controle STS ou BSA. A figura 5.15 mostra a grande variação de morte e apoptose em vários

experimentos quando comparado ao controle, sem tratamento com STS. Baseado nessa variação, achamos pertinente normalizar o número de células vivas, apoptóticas e necróticas pelo controle positivo (CHQs tratadas com STS).

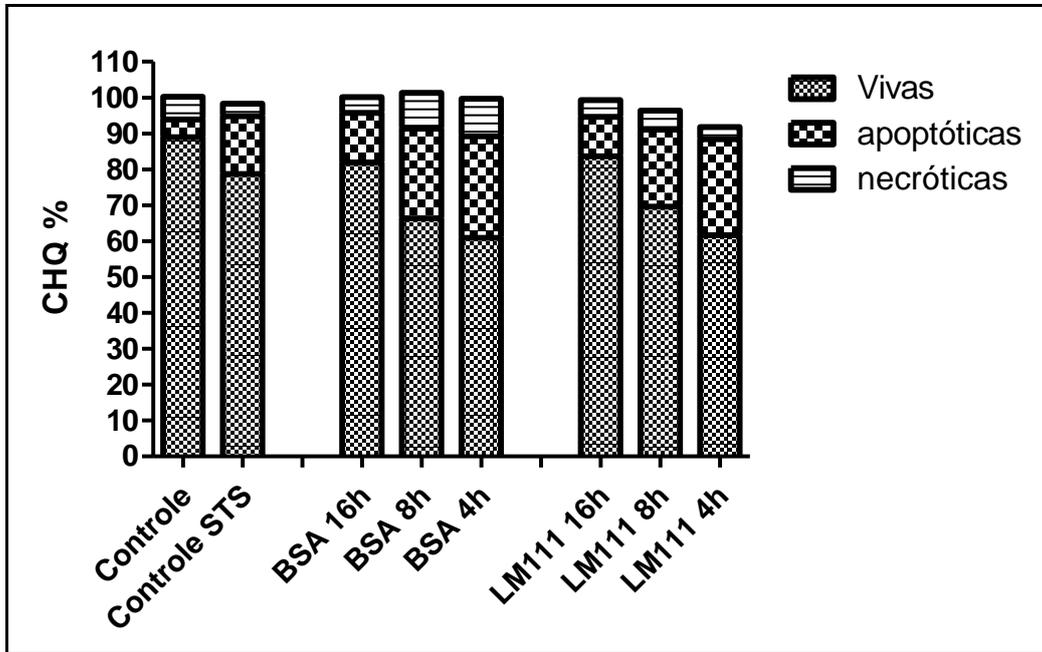


Figura 5.14 : Percentual de células vivas, apoptóticas e necróticas após adesão das CHQs sobre LM111 e tratamento com STS. As CHQs foram cultivadas sobre LM111 a 10 µg/ml por 8 h e posteriormente foram induzidas a morte com 5 µM de STS, em diferentes tempos da cinética (4 h, 8 h, 16 h). O controle positivo são CHQs tratados com STS por 16 h. O controle foi normalizado como sendo 100% em cada experimento. N=3.

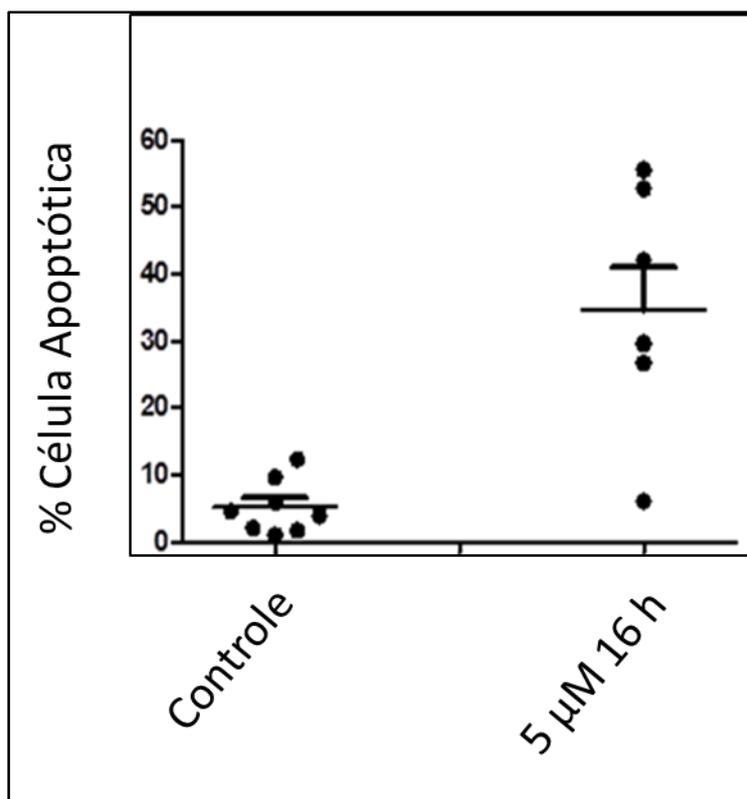


Figura 5.15 : Percentual de células apoptóticas nos experimentos em que as CHQs foram tratadas com 5 μ M de STS por 16 h. O controle representa o percentual de células apoptóticas sem o tratamento por STS. N=8

Utilizando a concentração de 5 μ M e 16 h de tratamento, comparamos o efeito das diferentes isoformas de LM na proteção da morte induzida por STS. Apesar de não estatisticamente significativo, observamos que a LM111 parece promover uma diminuição da apoptose quando comparado aos controles e as outras isoformas. Por outro lado, o percentual de células vivas foi aumentado de forma significativa quando as células foram cultivadas sobre as isoformas LM11, 411 e 511 previamente à indução da morte celular por STS (Figura 5.16). A figura 5.17 mostra um experimento representativo do tratamento das diferentes isoformas.

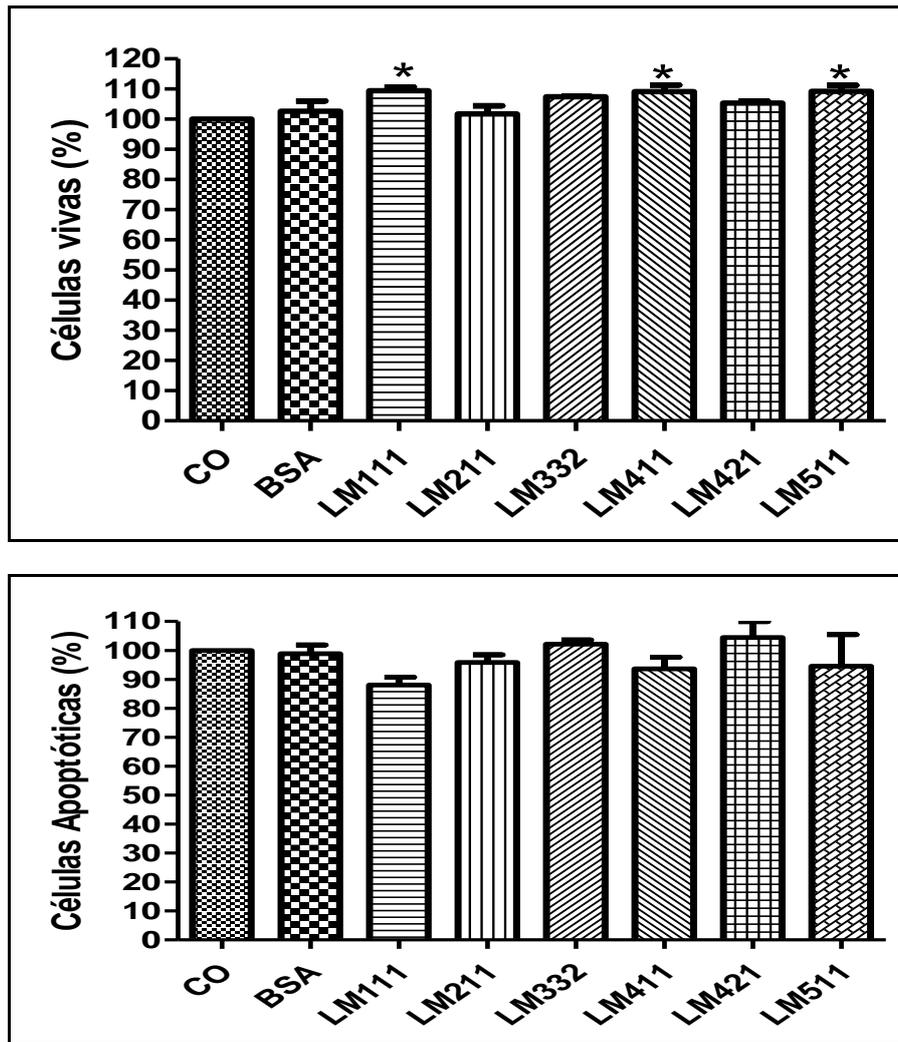


Figura 5.16 : Percentual do aumento de sobrevivência e diminuição da apoptose nas CHQs cultivadas sobre diferentes isoformas de LM e induzidos a morte por STS. As CHQs foram tratadas com 5 μ M de STS por 16 h, sobre o “coating” de diferentes isoformas de LM. O controle foi normalizado como sendo 100% em cada gráfico. O teste anova foi utilizado nas análises estatísticas. Os asteriscos indicam os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle. O gráfico do percentual de células apoptóticas não apresenta diferença significativa.

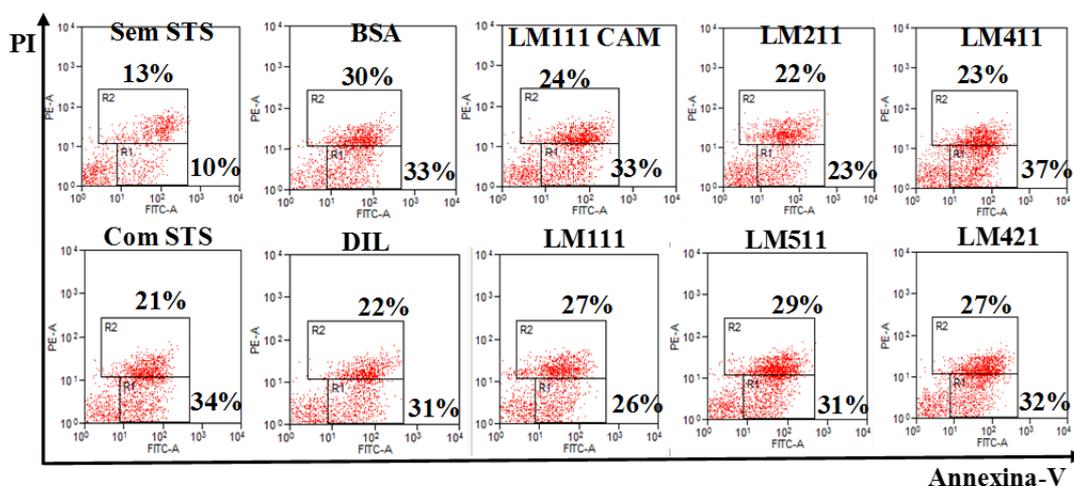


Figura 5.17 : Papel das diferentes isoformas de LM na proteção da morte de CHQs. As células foram tratadas com STS na concentração de 5 μ M por 16 h. A figura mostra “DotPlots” representativos de 4 experimentos em que CHQs cultivadas sobre diferentes substratos na concentração de 10 μ g/ml foram induzidas a apoptose por STS. Os “DotPlots” são representativos de 4 experimentos independentes.

Esses resultados mostram que as isoformas 111, 411 e 511 promovem uma maior sobrevivência das células quando induzidas a morte por STS. Por outro lado, nenhum resultado significativo foi observado em relação à diminuição da apoptose pelas LMs, apesar da isoforma de LM111 ter mostrado uma tendência em diminuir a apoptose. Os gráficos da figura 5.16 foram obtidos a partir de 4 experimentos. Decidimos então agrupar os experimentos que foram utilizados para fazer os gráficos das figuras 5.14 e 5.16, e que tinham a mesma condição experimental (tempo de tratamento 16 h e concentração de 5 μ M STS), mas somente para BSA e LM111. Como esperado, os resultados obtidos foram mais evidentes, mostrando o potencial da LM111 em promover a proteção da morte por apoptose (Figura 5.18).

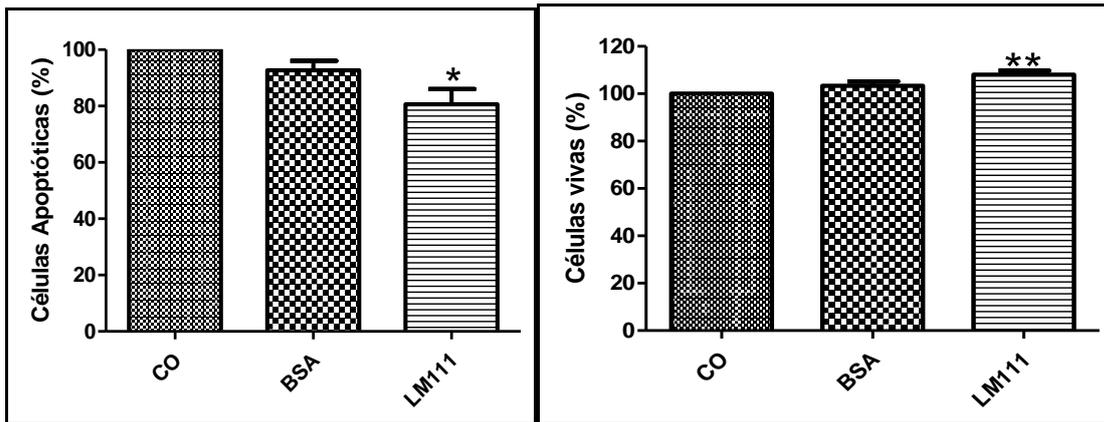


Figura 5.18 : LM111 protege as CHQs da morte por apoptose. As CHQs foram tratadas com 5 μ M de STS por 16 h, sobre o “coating” da isoforma de LM111. A LM111 diminuiu o percentual de células apoptóticas e aumentou o percentual de células viáveis. O controle foi normalizado como sendo 100% em cada experimento. O teste anova foi utilizado nas análises estatísticas. Os asteriscos indicam os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

A partir desses dados, tratamos as CHQs aderidas sobre o “coating” de BSA, LM111 e LM511 com 1 μ M de STS numa cinética tempo e analisamos a indução da morte por imunofluorescência. As células apoptóticas foram identificadas por Parp-clivada. Observamos que nas placas tratadas com STS, poucas células estavam aderidas, e muitas eram positivas para Parp (Figura 5.19). Nas placas com o “coating” de LM111, uma maior quantidade de células aderidas foi observada, com menos células Parp-clivada positivas. Podemos notar que apesar de uma importante marcação para Parp-clivada (verde), poucos núcleos estavam marcados (Figura 5.19a). As células que estavam aderidas sobre a LM511 apresentavam-se na sua grande maioria aderidas, com pouca mudança morfológica e pouca marcação para Parp-clivada (Figura 5.19c).

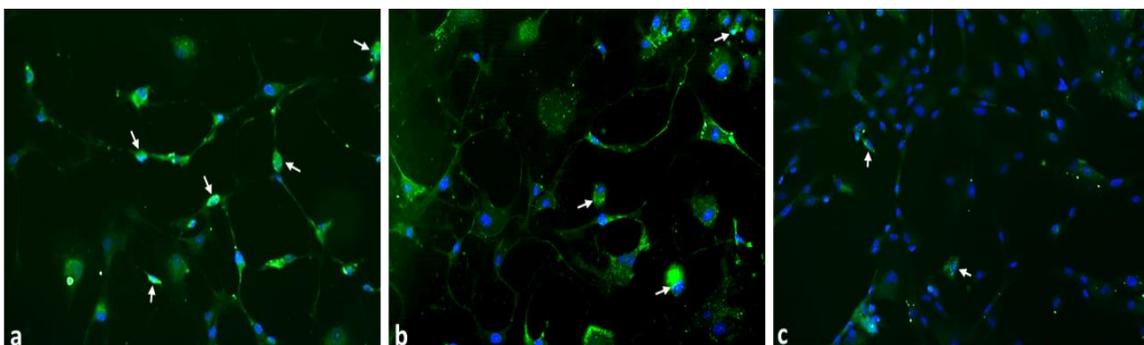


Figura 5.19 : Expressão de Parp-clivada em CHQs tratadas com STS. As CHQs aderidas sobre BSA, LM111 e LM511 foram tratadas com 1 μ M de STS e por 6 h em meio de proliferação

(Meio X+ 20 % SFB). (a) BSA (b) LM111 (c) LM511. Foram marcados com anticorpo anti-Parp clivada (verde) na diluição de 1:50. As setas indicam células marcadas com Parp-clivada. As imagens de imunofluorescência são representativas de cinco experimentos independentes. Aumento de 200x. N=5

5.5 Estratégia de tratamento das CHQs por LM111.

Nos experimentos clássicos de estudo do papel da ECM na proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência, as células são geralmente aderidas sobre placas pré-tratadas com moléculas da ECM. O mecanismo através do qual o tratamento com LM reduz a apoptose induzida por STS ainda precisa ser investigado. Dessa forma, resolvemos investigar se o tratamento da LM, diluindo a molécula no sobrenadante de cultura, previamente à indução da morte por STS, poderia ter um efeito semelhante à estratégia do “coating”. Testando diferentes concentrações de LM observamos que a adição de LM111 no sobrenadante de cultura, método aqui chamado por nós de tratamento, parece aumentar a sobrevivência e diminuir a apoptose das CHQs que foram induzidas a morte por STS, principalmente na concentração de 10 µg/ml (Figura 5.20)

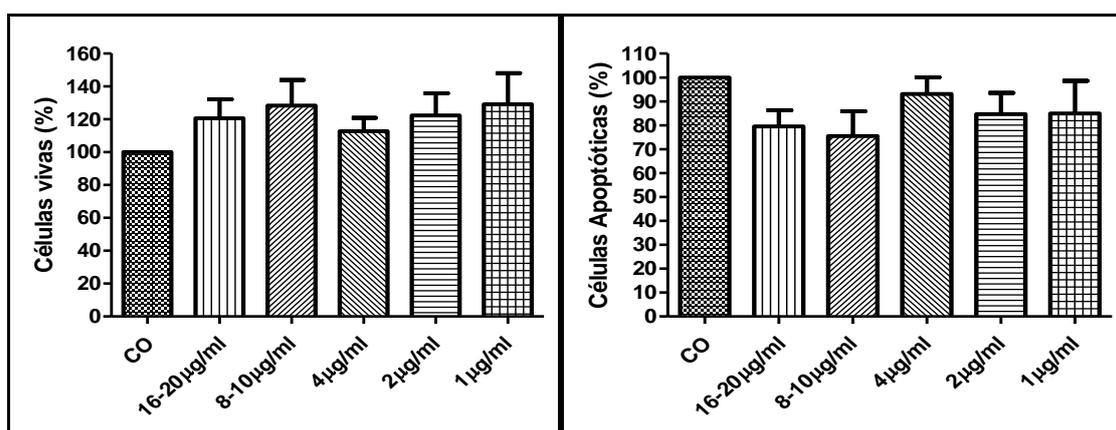


Figura 5.20 : Concentrações de LM diluída na cultura de CHQs e posteriormente tratadas com STS. No gráfico, a apoptose do grupo controle foi normalizada como 100% e foi possível observar que a LM111 diminuiu o percentual de células apoptóticas e parece aumentar o percentual de células vivas. O gráfico do percentual de células apoptóticas e viáveis não apresentaram diferença significativa.

5.6 Mecanismos de proteção da morte celular pela LM

Observamos que a adesão das CHQs sobre as LMs 111 e 511 parece não somente acelerar a adesão, mas também aumentar a expressão do receptor de LM integrina $\alpha 7$ (figura 5.21). O aumento da expressão de receptores da LM quando as CHQs estão aderidas sobre a molécula pode ser um fator importante na sobrevivência das células.

Nós também verificamos como as moléculas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas poderiam estar sendo modulados durante a morte por apoptose das CHQs induzidos com STS. Nós observamos que as células que foram tratadas com LM111, e induzidas à morte com STS, aumentou a expressão de Bcl-2 (anti-apoptótica), enquanto a expressão de Bax (pró-apoptótica) se encontrava diminuída (Figura 5.22).

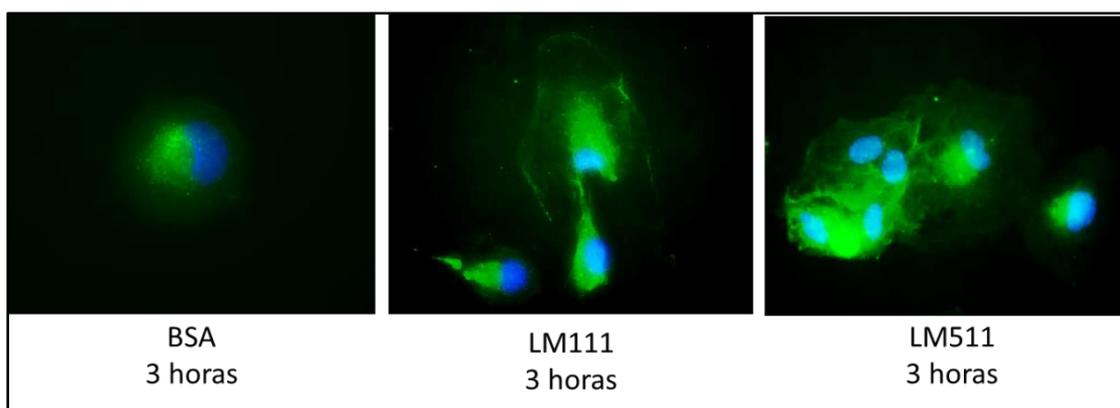


Figura 5.21: Expressão da integrina $\alpha 7$ e tratamento com diferentes isoformas de LM. As CHQs com os núcleos marcados em DAPI (azul) foram marcados para a integrina $\alpha 7$ (verde). As células foram plaqueadas no plástico diretamente ou sobre placas tratadas com BSA, LM111, LM511 por 3 h. Nós podemos observar o espalhamento (seta) e o maior número de células aderidas. As imagens de imunofluorescência são representativas de três experimentos independentes. Aumento 400x. N=1

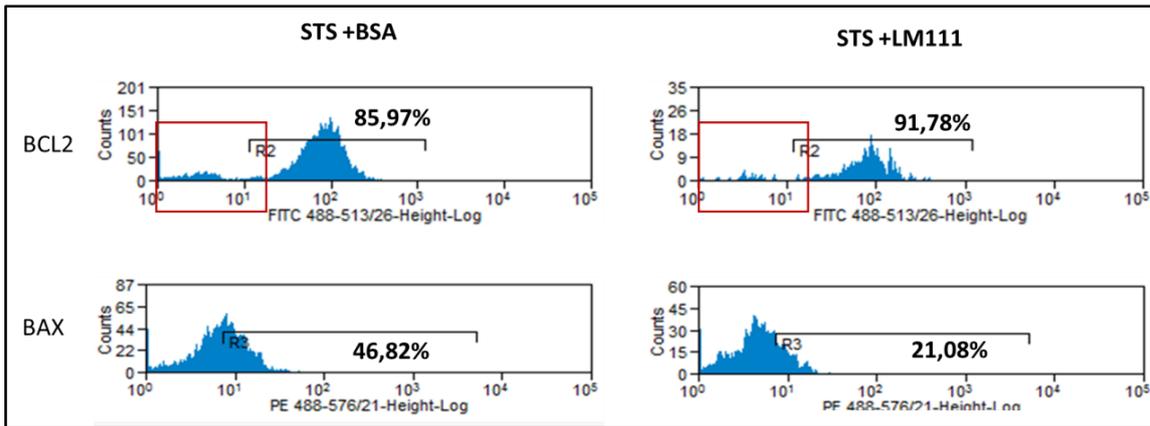


Figura 5.22 : Expressão de moléculas anti-apoptótica e pró-apoptótica após o tratamento com STS em CHQs cultivadas sobre LM111. As CHQs foram tratadas com 5 μ M de STS por 16 h, sobre o “coating” da isoforma de LM111. A LM111 modula a expressão de Bax (pró-apoptótico) e Bcl-2 (anti-apoptótico). N=1

6 Discussão

Um dos maiores problemas do transplante de mioblastos humanos como terapia celular em doenças neuromusculares é a morte das células injetadas (64) (61) (101) (49) (42) (123). Além das limitações do procedimento do transplante, outros fatores podem influenciar a eficácia da transplantação dos progenitores musculares, tais como a isquemia no sítio de injeção e a ausência das interações das células com a ECM (53) (124). Nesse sentido, o nicho aonde essas células serão injetadas deve ser considerado. Células transplantadas estão em íntimo contato com proteínas da ECM, infiltrado inflamatório (44) e fatores solúveis, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (125). Moléculas da ECM como a LM estão envolvidas em diversos eventos biológicos tais como proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência (126). É importante notar que diversas isoformas de LM vêm sendo descritas e suas distribuições e funções compreendidas, mas o papel dessas moléculas no processo de regeneração muscular e conseqüentemente a importância destas em estratégias de terapia celular são pouco conhecidas.

Dessa forma, acreditamos que compreender os mecanismos de morte e entender o papel protetor da LM na sobrevivência dos mioblastos *in vitro*, pode não somente contribuir para uma melhor eficácia do uso de mioblastos em terapia celular, mas também fornecer conhecimento básico sobre o papel de diferentes isoformas de LM, na biologia da regeneração muscular e nas vias de apoptose.

No presente estudo, nós avaliamos quais isoformas de LM são expressas nas células em proliferação e diferenciação. A LM é uma glicoproteína formada por três cadeias oriundas de genes diferentes, e não existem anticorpos específicos para os trímeros, que poderiam detectar as isoformas de maneira específica. Então, nesse trabalho, utilizamos anticorpos e “primers” as cadeias de LM. Porém, devido à dificuldade de se encontrar anticorpos para todas as cadeias de LM, e também para restringir um pouco a quantidade de marcadores devido à grande quantidade de cadeias (16 descritas até o momento), focamos o nosso trabalho nas cinco cadeias α . Essa escolha também se baseia no fato de que as isoformas de LM contendo a mesma cadeia α tem muitas vezes funções e principalmente localizações semelhantes *in vivo*, até por estas

possuírem a maioria dos sítios de ligação aos receptores celulares, como as integrinas (127). Por exemplo, no músculo, as isoformas de LM presentes nas fibras musculares são as 211 e 221, e elas se ligam a integrina $\alpha 7\beta 1$ e ao complexo distroglocano (128) (128). Dados preliminares do nosso grupo demonstram uma expressão diferencial de isoformas de LM (cadeias $\alpha 1$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$, além da $\alpha 2$), após o transplante de mioblastos humanos em músculos de camundongos imunodeficientes. Esses dados indicam que isoformas de LM que não possuem a cadeia $\alpha 2$, como as 211 e 221, podem estar presentes após a ativação da célula satélite, e assim desempenhar diferentes funções durante os processos de proliferação, diferenciação, fusão e maturação da fibra.

Nosso grupo vem trabalhando para definir quais as isoformas de LM estão presentes, na proliferação e diferenciação de células CHQ *in vitro*. Corroborando os resultados preliminares *in vivo* do grupo, descritos no item “justificativa”, encontramos uma expressão diferencial da expressão de cadeias de LM na proliferação e na cinética de diferenciação *in vitro*. A nossa observação de que cadeia $\alpha 2$ está presente nos miotubos em fase mais tardia de diferenciação parece ir de encontro com o que se observa *in vivo*, de que as isoformas LM211 e LM221 estão presentes na fibra muscular (79). Se o que estamos observando é uma expressão temporal de isoformas, é plausível que a cadeia $\alpha 2$ seja a última a ser expressa. A expressão das cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ nas fibras, a partir da diferenciação e fusão, também parecem ir de acordo com a literatura, que descreve que as cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ estão presentes transitoriamente no processo de regeneração dos músculos de camundongos normais, em fibras recém-formadas (79) (88).

Observamos também que somente a cadeia $\alpha 1$ de LM é expressa durante a proliferação das CHQs, e que continua presente na diferenciação. É descrito na literatura que a expressão da cadeia $\alpha 1$ de LM é abundante durante o desenvolvimento embrionário, mas com distribuição restrita no indivíduo adulto (127), inclusive com ausência no músculo (88) (69). Nossos dados, mostrados aqui por imunofluorescência, e também por RT-PCR, indicam a produção dessa molécula, tanto na proliferação quanto na diferenciação. Estamos trabalhando de maneira cuidadosa na confirmação da expressão dessa cadeia, visto que a literatura não corrobora esses resultados. No timo, órgão linfóide primário, a cadeia $\alpha 1$ de LM também não é detectada (129) (130), porém células epiteliais

tímicas em cultura expressam essa cadeia (130). É possível que condições de cultura estimulem a produção de isoformas que não estão presentes *in vivo*. Esses resultados indicam que diferentes isoformas estão presentes em diferentes momentos durante a proliferação e diferenciação *in vitro*, e possivelmente na formação da fibra muscular, no processo de regeneração. Nesse sentido, é possível que as isoformas 111, 121, 411, 421, 511, 521, além das isoformas 211 e 221, estejam presentes nas CHQs em proliferação e diferenciação *in vitro*. Não detectamos a cadeia $\alpha 3$ nos nossos experimentos.

O achado de que diferentes cadeias de LM estão expressas tanto na proliferação quanto na diferenciação reforçou a nossa hipótese de que as isoformas de LM poderiam ter um papel importante na sobrevivência de mioblastos e miotubos induzidos à morte por apoptose.

Diversos trabalhos demonstraram que a LM111 aumenta a sobrevivência de mioblastos (131) (132) (133) (134). Como diferentes isoformas parecem estar presentes na proliferação e diferenciação de mioblastos, decidimos verificar se as diferentes isoformas de LM são capazes de modular a sobrevivência das CHQs.

Visto que a apoptose é um dos tipos de morte de células musculares (48) (109), e ser o principal mecanismo envolvido na morte das CHQs transplantadas (135), como descrito anteriormente, decidimos utilizar como indutor de apoptose a STS, um inibidor de proteína quinase C (PKC) e gerador de ROS, e um agente terapêutico usado para inibir o crescimento de células tumorais por indução da via intrínseca e liberação de citocromo C (136). A célula que sofre apoptose é reconhecida por algumas modificações, dentre elas a exposição da fosfatidilserina. A avaliação da quantificação de células apoptóticas se deu pela marcação com Anexina-V em citometria de fluxo. A Anexina-V é uma proteína que se liga ao fosfolípídeo e possui alta afinidade pela fosfatidilserina na presença de íons de cálcio.

Usando Anexina-V e PI, pela técnica de citometria de fluxo, verificamos que nos primeiros experimentos ocorria uma variação muito grande no percentual de células mortas, com um baixo percentual de células apoptóticas. A padronização do uso e da análise da morte induzida por STS se tornou uma etapa extremamente importante nesse projeto. Nesse sentido, definimos a melhor concentração e tempo de tratamento com essa molécula. Um resultado

que consideramos extremamente importante foi a definição de uma região de células vivas e mortas, mas excluída de “debris”. Isso mudou a nossa forma de análise da morte (apoptose e necrose) por citometria de fluxo, aumentando os percentuais dos parâmetros analisados e provavelmente tornando os resultados mais fidedignos.

Mostramos que a STS induz preferencialmente, nas doses ideais, morte por apoptose. Por imunofluorescência confirmamos a indução da apoptose pelas técnicas de TUNEL e marcação de Parp-clivada. Além disso, a demonstração de que ocorre uma diminuição da expressão de Bcl-2 nas células tratadas com STS reforça a apoptose. Em células cancerígenas, STS induz apoptose, clivagem de Parp e reduz a expressão de Bcl-2 (137).

A imunofluorescência permite duplas marcações, para as cadeias de LM, por exemplo, com os marcadores apoptóticos. Além disso, realizamos a marcação de caspase-3, que é uma molécula efetora importante na via de morte celular por apoptose, e resolvemos investigar se essa molécula poderia estar sendo modulada durante a indução da morte e posteriormente se a LM poderia alterar essa expressão. Riederer e colaboradores (2008) demonstraram a expressão da caspase-3 ativa nos mioblastos humanos transplantados em músculos de camundongos imunodeficientes. Usamos diferentes técnicas de detecção dessa protease, como citometria de fluxo, imunofluorescência e western blotting (WB) mas nenhuma das técnicas apresentaram resultados esperados. Uma diferença observada entre os dois trabalhos é que no referido artigo a marcação foi feita nos mioblastos humanos *in situ*, em cortes de criostato (61), enquanto que nessa dissertação a marcação foi feita em mioblastos cultivados *in vitro*. É importante notar que as mesmas células foram utilizadas nos dois trabalhos.

Devido às variações do percentual de morte das CHQs nos experimentos iniciais com STS, decidimos verificar se outros agentes seriam capazes induzir a morte por apoptose ou necrose. Fizemos uma cinética da concentração de H₂O₂ e verificamos que o H₂O₂ promove a morte das células tratadas, principalmente por necrose. A β-Lapachona foi outra molécula utilizada no estudo. Da mesma forma que o H₂O₂, essa droga induziu morte das células, com um maior percentual de células necróticas. Quando comparamos a razão de células apoptóticas/necróticas, verificamos que a STS promove uma morte

preferencial por apoptose. Além disso, testamos diferentes concentrações de H_2O_2 e β -Lapachona nas CHQs para realizarmos os experimentos de imunofluorescência. As CHQs foram visualizadas em microscópio invertido, e verificamos que poucas células estavam aderidas, impossibilitando a realização dos experimentos por imunofluorescência. Visto isso, decidimos nesse momento continuar com a STS e ressaltamos a importância da padronização desse indutor de morte.

Por imunofluorescência, observamos aumento na deposição da cadeia $\alpha 1$ de LM nas primeiras horas após indução da morte, posteriormente essa expressão é diminuída. Pode ser que essa expressão aumentada seja uma resposta da célula em consequência ao estímulo da STS, mas que não é suficiente para impedir a morte com o decorrer do tempo, devido à alta concentração e à presença constante da STS no meio de cultura. A literatura mostra que a interação da célula com ECM é importante para a sobrevivência, então o aumento da expressão da cadeia $\alpha 1$ pode ser difícil de explicar. Além disso, a ativação da PKC, necessária para a adesão de macrófagos à LM via $\alpha 6 \beta 1$ é fortemente reduzida após tratamento com STS (126). Por outro lado, pode ser que esse aumento não seja real, e por causa do estímulo, a LM seja exportada e se adira à membrana das células. Ou até mesmo, devido a uma mudança morfológica da célula, esse aumento seja um artefato provocado pelo tratamento, uma autofluorescência, por exemplo. Nesse sentido, realizamos a técnica de PCR para detectar as cadeias de LM moduladas durante a indução da morte celular. A modulação da cadeia $\alpha 1$ não foi observada, mas houve aumento apenas a expressão de $\alpha 4$, num ponto mais tardio da cinética de tratamento por STS. Também observamos um aumento, não significativo, da cadeia $\alpha 2$, que não é expressa nas CHQs em proliferação. Uma questão importante é que esse resultado por PCR pode ser consequência das células utilizadas nesse experimento. Durante o desenvolvimento da dissertação tivemos problemas com contaminação e com o controle de miogenicidade, o que nos levou a ficar mais de seis meses sem células. Devido a esse problema, usamos em alguns experimentos, CHQs mais velhas, com maior número de divisões em cultura, com mais de 40 divisões. Resultados do nosso grupo mostram que cadeias de LM não expressas na fase proliferativa passam a ser detectadas à medida que envelhecem, (que apresentam um maior número de

divisões em cultura). Esses experimentos devem ser repetidos com as CHQs mais jovens.

Detectamos os receptores de LM que estão sendo expressos nas células em proliferação e observamos a expressão da cadeia $\alpha 7$, $\alpha 3$ e um percentual baixo da expressão da cadeia $\alpha 6$ de integrina. Na literatura, poucos trabalhos descrevem a expressão dessa integrina no músculo e Sorokin (2000) demonstrou que a integrina $\alpha 6$ é expressa em algumas fibras recém-formadas no processo de regeneração (88). Dados preliminares do nosso grupo mostram, por RT-PCR, que durante a diferenciação ocorre um aumento da expressão das integrinas $\alpha 6$ e $\alpha 7$ quando comparados ao controle. Nesse sentido é necessário um estudo mais detalhado para se determinar a real expressão da integrina $\alpha 6$ nos mioblastos. Isso é importante porque o receptor VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$) é a integrina que se liga a praticamente todas as isoformas de LM (70) (138).

Por outro lado, mostramos por RT-PCR que a expressão da integrina $\alpha 6$ é aumentada, no ponto de 16h e a $\alpha 7$ é diminuída (mas não estatisticamente) após tratamento com STS, o que pode colaborar com a morte por apoptose, uma vez que a ausência da interação da célula muscular com a LM pode induzir esse processo (139) (62).

Uma vez definidos os indutores de morte e analisadas as modificações das CHQs relacionados a ligantes e receptores de LM com o tratamento com STS, fomos verificar como diferentes isoformas de LM poderiam proteger as CHQs da morte induzida por STS. Como já mencionado nessa dissertação, diversos trabalhos mostram que a LM111 tem capacidade de estimular a sobrevivência de células musculares humanas e murinas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, inclusive com trabalhos realizados pelo nosso grupo. Essa isoforma também é capaz de melhorar a regeneração muscular em modelos animais com distrofias musculares e de auxiliar a capacidade regenerativa de mioblastos transplantados em protocolo experimental de terapia celular em camundongo (102). Nesses trabalhos, esses resultados positivos foram obtidos usando a isoforma LM111 obtida de célula de sarcoma murino denominado Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Esse tumor produz uma membrana basal rica em ECM e a LM111 é purificada (140). Neste projeto decidimos investigar a capacidade de diferentes isoformas de LM em proteger mioblastos humanos da morte. As

isoformas escolhidas são todas recombinantes humanas (<http://www.biolamina.com/>).

Primeiramente, decidimos verificar se a isoformas recombinante humana LM111 também era capaz de proteger os mioblastos humanos da morte, como demonstrado para a isoforma “natural” 111 derivada do tumor EHS. Inicialmente realizamos os experimentos “tradicionais”, quando se usa moléculas de ECM, sob a forma de “coating”. Seguindo as recomendações de concentração e tempo de incubação das moléculas do fabricante, realizamos o “coating” das diferentes isoformas de LM nas placas de cultura previamente à adição das células. Posteriormente as culturas foram tratadas com STS, nas concentrações e tempo de tratamento definidos na padronização e analisados por citometria de fluxo, usando anexina V e PI. Verificamos que a LM111 protege a morte das células diminuindo o percentual de células apoptóticas quando comparadas ao controle. De forma interessante, verificamos que as isoformas LM111, 411 e 511 aumentaram no percentual de células vivas. É possível que as isoformas 411 e 511 diminuam também o percentual de necrose. Essa análise deverá ser realizada. Utilizando a mesma estratégia de “coating”, observamos por imunofluorescência um maior número de CHQs aderidas em placas cobertas com LM111 e principalmente com LM511 após as células serem estimulados STS. O “coating” de LM diminuiu o número de células positivas para Parp-clivada, principalmente nas CHQs que estavam aderidos sobre a LM511. Dessa forma, acreditamos que a LM511, além da LM111 possa ter um potencial terapêutico na proteção da morte de mioblastos transplantados no músculo de camundongo. Esses resultados não vão de encontro ao efeito da LM511 sobre a morte das CHQs observada nos experimentos de citometria de fluxo. Esses dados precisam ser confirmados, porque a diferença é que no experimento de imunofluorescência, a concentração de 1 μ M foi utilizada. É importante refletir sobre o papel da LM na proteção da morte de um modo geral, e não somente na morte por apoptose (a STS induz pouca necrose nos tempos avaliados). De fato, um resultado ainda preliminar (n=1) mostra que a LM111 diminui de forma importante a morte provocada por H₂O₂, que é em sua grande maioria por necrose.

Resolvemos investigar outra forma de estímulo com as LMs para os mioblastos humanos, que pode ser mais importante para os protocolos de terapia

celular. Assim, ao invés de realizarmos o “coating” das LMs, tratamos as células, adicionando LM ao meio de cultura. Para estabelecer esse protocolo, realizamos os experimentos com a LM111, e testamos diferentes concentrações. Verificamos que na dose de 10 µg/ml, a LM diminuiu a morte por apoptose e aumentou a sobrevivência das CHQs. Porém, esses resultados não foram significativos, e acreditamos que isso pode ter sido causado pela variação do efeito de proteção da LM111 em cada experimento, acreditamos que mais experimentos sejam necessários para mostrar estatisticamente esse efeito. Também precisamos verificar o papel de outras isoformas nessa estratégia, que deve fornecer um estímulo diferente de quando as células estão aderidas sobre a ECM. De fato, é possível que a LM adicionada entre em contato com receptores da membrana celular e ative as células de forma diferente de quando estão aderidas sobre a ECM. A LM pode também interagir com outras moléculas da ECM que já estão aderidas sobre a célula, mudando a estrutura da membrana. Componentes da ECM solúveis podem alterar ou mesmo romper as ligações entre ligantes e receptores de moléculas da ECM (141). Nesse sentido, essa estratégia de tratamento deve ser detalhadamente estudada.

Na literatura trabalhos têm demonstrado que a LM111 tem a capacidade de induzir a sobrevivência das células. No trabalho de Li *et al* (2005), foi demonstrado que a ligação da LM111 com o receptor distroglicano presente na membrana das células de Schwann induziu a fosforilação das quinases, nos quais promoveu a sobrevivência celular (142). Em células musculares, a interação da LM com o receptor distroglicano ativou a via de sinalização PI3K/AKT e modulou a sobrevivência das células (139). De uma forma geral, a interação da célula com a LM induz adesão, prevenindo a morte por anoikis (143). Essa interação ativa a via de PI3K/AKT, NFκB, induzindo por exemplo, a expressão de Bcl-2 (144).

Outro mecanismo possível, é que uma maior adesão ao substrato impede a morte por apoptose causada pela falta de adesão, denominada anoikis (143). As LMs influenciam as funções celulares induzindo várias vias de sinalização, via receptores de membrana. Baseado nos nossos resultados, nós acreditamos que o tratamento com a LM modula a adesão dos mioblastos, a expressão de receptores de LM e a via de sinalização de apoptose, e conseqüentemente aumenta a sobrevivência dos mioblastos humanos.

É importante ressaltar que nos experimentos de indução da apoptose por STS, as células sempre foram cultivadas em meio de proliferação. Assim, não avaliamos o efeito dessa molécula na diferenciação de mioblastos, e já foi descrito na literatura que a caspase-3 é expressa na fase de diferenciação celular (114). Outro dado interessante, demonstrado na literatura, é que corpos apoptóticos (que expõem fosfatidilserina) poderiam influenciar no desenvolvimento do músculo, especificamente na fusão dos mioblastos (145). Futuramente, nós iremos estudar a morte das células musculares em diferenciação *in vitro* e essas informações são relevantes para o nosso estudo.

Em conjunto, a nossa hipótese de estudar o papel das diferentes isoformas de LM protegendo os mioblastos humanos da morte, tem uma grande importância para o uso dessas células em terapia celular. Nós sugerimos que o tratamento da LM pode promover a proteção da morte nas CHQs em proliferação quando são injetados no músculo de pacientes com distrofias musculares, especificamente a LM111, já descrita na literatura como uma isoforma que aumenta a regeneração do musculo esquelético. Sugerimos também que outras isoformas, como a LM411 e a LM511 possam ter potencial terapêutico, ao aumentar a sobrevivência dos mioblastos transplantados. Como essas isoformas também são expressas durante a diferenciação dos mioblastos e na regeneração muscular, essas moléculas devem ter uma participação importante no processo fisiológico de cura no músculo após trauma ou lesão. Compreender os mecanismos de sobrevivência promovidos pelas isoformas de LM, poderá ter impactos importantes no entendimento do processo de regeneração muscular e ter relevância para o tratamento de doenças neuromusculares em protocolos de terapia celular.

7 Conclusão

Com base nos resultados demonstrados nesse estudo, podemos concluir que:

- Nossos resultados mostram a expressão da cadeia $\alpha 1$ de LM e dos receptores cadeia $\alpha 3$, $\alpha 7$ e uma menor expressão da cadeia $\alpha 6$ de integrina nas células em proliferação.
- Caracterizamos a molécula de STS como um indutor de morte nas CHQs em proliferação *in vitro*.
- Demonstramos nas CHQs morte por apoptose após a indução com STS, confirmada pela marcação de anexina V/PI, TUNEL e parp, e pela diminuição da expressão de Bcl-2 (anti-apoptótica).
- Verificamos que a indução de morte nas CHQs em proliferação por STS aumenta a expressão da cadeia $\alpha 1$ de LM por imunofluorescência, mas que somente a cadeia $\alpha 4$ de LM é aumentada quando analisamos por RT-PCR. Esse tratamento aumenta a expressão da integrina $\alpha 6$, e parece diminuir a expressão de $\alpha 7$.
- A isoforma LM111 protege a morte por apoptose e juntamente com as isoformas LM411 e 511 aumentam o percentual de células vivas tratadas com STS.
- O tratamento das isoformas LM111 e LM511 acelera a adesão e aumenta a expressão dos receptores de LM (cadeia $\alpha 7$ integrina) e diminuiu a expressão de Parp em CHQs induzidas a morte por STS.
- O Tratamento da isoforma de LM111 aumentou a expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 nas CHQs induzidas a morte por STS.
- Acreditamos que isoformas de LM possam ser alvos terapêuticos em protocolos de terapia celular utilizando mioblastos.

8 Referências bibliográficas

1. Carlson BM, Faulkner JA. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury - a review. *Med Sci Sports Exerc.* 1983; 15(3): 187-98.
2. Kierszenbaum, Abraham L. *Histologia e Biologia Celular : Uma Introdução à Patologia.* Rio de Janeiro: 2 ed. Elsevier Editora Ltda, 2008. 199p..
3. Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory Factors and Cell Populations Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *J Cell Physiol.* 2010; 224(1): 7–16.
4. Tajbakhsh S. Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(4): 413–22.
5. Buckingham M, Relaix F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 44:115–25.
6. Gartner, Leslie P, James L. *Tratado de Histologia Em cores.* Rio de Janeiro: 2.ed. Guanabara Koogan, 2003. 592p.
7. Mauro A. Satellite Cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 9:493-5.
8. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000; 218(2): 115–24.
9. Schultz E. Fine structure of satellite cells in growing skeletal muscle. *Am J Anat.* 1976; 147(1): 49–70.
10. Rocheteau P, Vinet M, Chretien F. Dormancy and quiescence of skeletal muscle stem cells. *Results Probl Cell Differ.* 2015; 56: 215–35.
11. Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development.* 2015;142(9): 1572–81.

12. Negroni E, Mouly V. Myogenic stem cells : regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathol Biol.* 2006;54 (2): 100–8.
13. Rudnicki MA, Schlegelsberg PNJ, Stead RH, Braun T, Arnold H, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 Is Required for the Formation of Skeletal Muscle. 1993; 75: 1351–9.
14. Sorrentino V, Pepperkok R, Davis RL, Ansorge W, Philipson L. Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature.* 1990; 345(6278): 813–5.
15. Rajabi HN, Takahashi C, Ewen ME. Retinoblastoma protein and MyoD function together to effect the repression of Fra-1 and in turn cyclin D1 during terminal cell cycle arrest associated with myogenesis. *J Biol Chem.* 2014; 289(34): 23417–27.
16. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-manera J, Messina G, Cossu G. Review series Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells. 2010;120(1).
17. Buckingham M, Rigby PWJ. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev Cell.* 2014; 28(3):225–38.
18. Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis : molecular mechanisms of satellite cell quiescence , activation and replenishment. 2005; 15(12).
19. Horsley V, Pavlath GK. Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs.* 2004; 176(1-3): 67–78.
20. Negroni E, Gidaro T, Bigot A, Butler-Browne GS, Mouly V, Trollet C. Invited review: Stem cells and muscle diseases: advances in cell therapy strategies. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015; 41(3): 270–87.
21. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007; 204(5): 1057–69.

22. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev.* 2009; 37(1): 18–22.
23. Gunning P, Hardeman E, Wade R, Ponte P, Bains W, Blau HM, et al. Differential patterns of transcript accumulation during human myogenesis. *Mol Cell Biol.* 1987; 7(11): 4100–14.
24. Kontaridis MI, Eminaga S, Fornaro M, Zito CI, Sordella R, Settleman J, et al. SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(12): 5340–52.
25. Partridge TA. Myoblast transplantation. *Neuromuscul Disord.* 2002; 12:6.
26. Emery AEH. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002; 359 (9307) :687–95.
27. Bushby K, Lochmüller H, Lynn S, Straub V. Interventions for muscular dystrophy: molecular medicines entering the clinic. *Lancet.* 2009; 374(9704): 1849–56.
28. Sweeney HL, Barton ER. The dystrophin-associated glycoprotein complex : What parts can you do without ? *Proc Natl Acad-Sci USA.* 2000; 5;97(25): 13464–6.
29. Kumar A, Khandelwal N, Malya R, Reid MB, Boriek AM. Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *FASEB J.* 2004 Jan; 18(1): 102–13
30. Ghahramani Seno MM, Trollet C, Athanasopoulos T, Graham IR, Hu P, Dickson G. Transcriptomic analysis of dystrophin RNAi knockdown reveals a central role for dystrophin in muscle differentiation and contractile apparatus organization. *BMC Genomics.* 2010; 11:345.
31. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophy-negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature.*1989; 337(6203): 176-9.
32. Morgan JE, Hoffman EP, Hoffman EP, Kunkel LM, Neu- TAPNA. Normal Myogenic Cells from Newborn Mice Restore Normal Histology to

- Degenerating Muscles of the mdx Mouse. 1990;111(6):2437–49.
33. Huard J, Bouchard JP, Roy R, Malouin F, Dansereau G, Labrecque C, et al. Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 1992; 15(5): 550–60
 34. Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L, Blau HM. Normal dystrophin transcripts detected in Duchene muscular dystrophin patients after myoblast transplantation. *Nature*. 1992; 356(6368): 435-8.
 35. Partridge TA, Grounds M, Sloper JC. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature*. 1978; 273(5660): 306–8.
 36. Lipton BH, Schultz E. Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science*. 1979; 205(4412): 1292–4.
 37. Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci* . 1982; 57(2-3): 319–31.
 38. Morgan JE, Watt DJ, Sloper JC, Partridge TA. Partial correction of an inherited biochemical defect of skeletal muscle by grafts of normal muscle precursor cells. *J Neurol Sci* . 1988 ;86(2-3): 137–47.
 39. Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP. High Efficiency of Muscle Regeneration after Human Myoblast Clone Transplantation in SCID Mice. *Cell Transplant*. 1994; 93: 586–99.
 40. Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A, et al. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant* . 2011; 2(2):99–112.
 41. . Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP. High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest*. 1994; 93(2): 586–99.

42. Briggs D, Morgan JE. Recent progress in satellite cell / myoblast engraftment – relevance for therapy. *FESB J.* 2013; 280: 4281–93.
43. Mouly V, Aamiri A, Bigot A, Cooper RN, Donna S Di, Furling D, et al. The mitotic clock in skeletal muscle regeneration , disease and cell mediated gene therapy. 2005; 184 (1) 3–15.
44. Riederer I, Negroni E, Bencze M, Wolff A, Aamiri A, Di Santo JP, et al. Slowing down differentiation of engrafted human myoblasts into immunodeficient mice correlates with increased proliferation and migration. *Mol Ther.* 2012; 20(1): 146–54.
45. Satoh A, Huard J, Labrecque C, Tremblay JP. Use of fluorescent latex microspheres (FLMs) to follow the fate of transplanted myoblasts. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41(10): 1579–82.
46. Fahime E El, Torrente Y, Caron NJ, Bresolin MD, Tremblay JP. In Vivo Migration of Transplanted Myoblasts Requires Matrix Metalloproteinase Activity. *Exp Cell R.* 2000; (1)287: 279–87.
47. Riederer I, Negroni E, Bencze M, Wolff A, Aamiri A, Santo JP Di, et al. Slowing Down Differentiation of Engrafted Human Myoblasts Into Immunodeficient Mice Correlates With Increased Proliferation and Migration. *Mol Ther.*; 2012; 20(1) 146–54.
48. Sciorati C, Rigamonti E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Diffe.* 2016.
49. Skuk D, Caron NJ, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neuro.* 2003; 62(9): 951–67.
50. Beilharz M, Grounds M. rapid death of injected in myoblast. 1996; 853–60.
51. Guérette B, Skuk D, Célestin F, Huard C, Tardif F, Asselin I, et al. Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation. *J Immunol.* 1997; 159(5): 2522–31.

52. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of Myoblast Transplantation Reveal a Discrete Minority of Precursors with Stem Cell – like Properties as the Myogenic Source. 1999;144(6): 1113–21.
53. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-carver A, Fukushima S, et al. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. 2004; 17(4): 1–17.
54. Vilquin J-T, Catelain C, Vauchez K. Cell therapy for muscular dystrophies: advances and challenges. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011; 16(6): 640–9.
55. Lesault P-F, Theret M, Magnan M, Cuvellier S, Niu Y, Gherardi RK, et al. Macrophages improve survival, proliferation and migration of engrafted myogenic precursor cells into MDX skeletal muscle. *PLoS On*. 2012; 7(10).
56. Bencze M, Negroni E, Vallese D, Yacoub-Youssef H, Chaouch S, Wolff A, et al. Proinflammatory macrophages enhance the regenerative capacity of human myoblasts by modifying their kinetics of proliferation and differentiation. *Mol Ther*. 2012; 20(11): 2168–79.
57. Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA, Grounds MD. Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. *Cell Transplant* . 2000; 9(4): 489–502.
58. Hodgetts SI, Spencer MJ, Grounds MD. A role for natural killer cells in the rapid death of cultured donor myoblasts after transplantation. *Transplantation*. 2003; 75(6): 863–71.
59. Sammels LM, Bosio E, Fragall CT, Grounds MD, van Rooijen N, Beilharz MW. Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy. *Transplantation* . 2004; 77(12):1790–7.
60. Guérette B, Asselin I, Skuk D, Entman M, Tremblay JP. Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant* . 2008; 6(2):101–7.

61. Riederer I, Negroni E, Bigot A, Bencze M, Di Santo J, Aamiri A, et al. Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into immunodeficient mice. *Transplant Proc.* 2008; 40(2): 624–30.
62. Gérard C, Dufour C, Goudenege S, Skuk D, Tremblay JP. AG490 Improves the Survival of Human Myoblasts In Vitro and In Vivo. 2012; 2: 2665–76.
63. Bouchentouf M, Benabdallah BF, Bigey P, Yau TM, Scherman D, Tremblay JP. Vascular endothelial growth factor reduced hypoxia-induced death of human myoblasts and improved their engraftment in mouse muscles. *Gene Ther.* 2008; 404–14.
64. Kornasio R, Riederer I, Butler-browne G, Mouly V, Uni Z, Halevy O. Biochimica et Biophysica Acta β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation , differentiation and survival via the MAPK / ERK and PI3K / Akt pathways. *BBA - Mol Cell Res.* 2009; 1793(5): 755–63.
65. Temblay J. Resetting the Problem of Cell Death Following Muscle-Derived Cell Transplantation: Detection , Dynamics and Mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003; 62(9): 951–67.
66. Cooper RN, Irintchev A, Santo JPDI, Zweyer M, Morgan JE, Partridge TA, et al. A New Immunodeficient Mouse Model for Human Myoblast Transplantation. 2001; 831: 823–31.
67. Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, Di Santo JP, Mouly V. Comparative analysis of genetically engineered immunodeficient mouse strains as recipients for human myoblast transplantation. *Cell Transplant.* 2005; 14(7): 457–67.
68. Halfter W, Oertle P, Monnier CA, Camenzind L, Reyes-Lua M, Hu H, et al. New concepts in basement membrane biology. *FEBS J.* 2015; 282(23): 4466–79.
69. Tzu J, Marinkovich MP. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(2): 199–214.
70. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adh Migr.* 2013; 7(1): 48–55.

71. Humphries MJ. Insights into integrin – ligand binding and activation from the first crystal structure. *Arthritis Res.* 2002; 69–78.
72. Belkin AM, Stepp MANN. Integrins as Receptors for Laminins. *Microscop Res Tech.* 2000; 30 280–301.
73. Rooney JE, Knapp JR, Hodges BL, Wuebbles RD, Burkin DJ. Laminin-111 Protein Therapy Reduces Muscle Pathology and Improves Viability of a Mouse Model of Merosin-Deficient Congenital Muscular Dystrophy. *AJPA.* Elsevier Inc.; 2012; 180(4): 1593–602.
74. Zalewski AA. Survival, reinnervation, and histochemical maturation of skeletal muscle xenografts in the nude mouse. *Exp Neurol.* 1978; 58(2): 261–71.
75. Bao W. Integrin v-mediated inactivation of p53 controls a MEK1-dependent melanoma cell survival pathway in three-dimensional collagen. *J cell bio.* 2004; 167(4): 745–56.
76. Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 2007 Dec; 213 (3); 565-73.
77. Zhu X, Assoian RK. Integrin-dependent Activation of MAP Kinase : A Link to Shape-dependent Cell Proliferation. *Mol Biol Cell* 1995; 6(3): 273–82.
78. Burkin DJ, Kaufman SJ. The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* 1999; 296(1): 183–90.
79. Holmberg J, Durbeej M. Laminin-211 in skeletal muscle function. *Cell Adh Migr.* 2013; 7(1): 111–21.
80. Carmignac V, Durbeej M. Cell – matrix interactions in muscle disease. *J Phatol.* 2012; 200–18.
81. Lowrey AA, Kaufman SJ. Membrane-cytoskeleton associations during myogenesis deviate from traditional definitions. *Exp Cell Res.* 1989; 183(1): 1–23.

82. Vachon PH, Xu H, Liu L, Loechel F, Hayashi Y, Arahata K, et al. Integrins ($\alpha 7\beta 1$) in muscle function and survival. Disrupted expression in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Clin Invest* . 1997; 100(7): 1870–81.
83. Rooney JE, Welser J V, Dechert MA, Flintoff-Dye NL, Kaufman SJ, Burkin DJ. Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and $\alpha 7$ integrin. *J Cell Sci* . 2006; 119: 2185–95.
84. Guo C, Willem M, Werner A, Raivich G, Emerson M, Neyses L, et al. Absence of $\alpha 7$ integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(6): 989–98.
85. Doe JA, Wuebbles RD, Allred ET, Rooney JE, Elorza M, Burkin DJ. Transgenic overexpression of the $\alpha 7$ integrin reduces muscle pathology and improves viability in the *dy(W)* mouse model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A. *J Cell Sci*. 2011;124: 2287–97.
86. Rando TA, Pavlath GK, Blau HM. The fate of myoblasts following transplantation into mature muscle. *Exp Cell Res [Internet]*. 1995; 220(2): 383–9.
87. Patton BL, Connoll AM, Martin PT, Cunningham JM, Mehta S, Pestronk A, et al. Distribution of ten laminin chains in dystrophic and regenerating muscles. *Neuromuscul Disord*. 1999; 9(6): 423–33.
88. Sorokin LM, Maley MA, Moch H, von der Mark H, von der Mark K, Cadalbert L, et al. Laminin $\alpha 4$ and integrin $\alpha 6$ are upregulated in regenerating *dy/dy* skeletal muscle: comparative expression of laminin and integrin isoforms in muscles regenerating after crush injury. *Exp Cell Res*. 2000 ; 256(2): 500–14.
89. Huijbregts J, White JD, Grounds MD. The absence of MyoD in regenerating skeletal muscle affects the expression pattern of basement membrane, interstitial matrix and integrin molecules that is consistent with delayed myotube formation. *Acta Histochem*. 2001;103(4): 379–96.
90. Aoudjit F, Vuori K. Matrix Attachment Regulates Fas-induced Apoptosis in Endothelial Cells : A Role for c-Flip and Implications for Anoikis. *J Cell Biol*. 1994; 633–43.

91. Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. 2001; 20 (36).
92. Courter DL, Lomas L, Scatena M, Giachelli CM. Src Kinase Activity Is Required for Integrin $\alpha 5$ -Mediated Activation of Nuclear Factor- κ B. 2005; 280(13): 12145–51.
93. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA. caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol*. 2000; 459–70.
94. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2001; 555–62.
95. Uhm JH, Dooley NP, Kyritsis AP, Rao JS, Gladson CL. Vitronectin , a Glioma-derived Extracellular Matrix Protein , Protects Tumor Cells from Apoptotic Death 1. 1999; 5:1587–94.
96. Matter ML, Ruoslahti E. A Signaling Pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription . *J. Biol* 2001; 276(30): 27757–63.
97. Frisch SM, Jolla L, Jolla L. Control of Adhesion-dependent Cell Survival by Focal Adhesion Kinase. 1996; 134(3): 793–9.
98. Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, de Mello W, Riederer I, Di Santo JP, Savino W, et al. Human myoblast engraftment is improved in laminin-enriched microenvironment. *Transplantation* 2008; 85(4): 566–75.
99. Goudenege S, Lamarre Y, Dumont N, Rousseau J, Frenette J, Skuk D, et al. Laminin-111 : A Potential Therapeutic Agent for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. 2009;18(12): 2155–63.
100. Rooney JE, Gurpur PB, Burkin DJ. Laminin-111 protein therapy prevents muscle disease in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl*. 2009; 106(19).
101. Skuk D, Caron N, Goulet M, Roy B, Espinosa F, Tremblay JP. Dynamics of the early immune cellular reactions after myogenic cell transplantation. *Cell Transplant* . 2002; 11(7):671–81.

102. Riederer I, Bonomo AC, Mouly V, Savino W. Laminin therapy for the promotion of muscle regeneration. *FEBS Lett.* 2015; 589 (22).
103. Edom F, Mouly V, Barbet JP, Fiszman MY, Butler-Browne GS. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. *Dev Biol.* 1994;164(1): 219–29.
104. Decary S, Mouly V, Butler-Browne GS. Telomere length as a tool to monitor satellite cell amplification for cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther.* 1996; 7(11):1347–50.
105. Bertrand R, Solary E, O' Connor P, Kohn KW, Pommier Y. Induction of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res.* 1994; 211(2): 314-21.
106. Yu HY, Kim SO, Jin C-Y, Kim G-Y, Kim W-J, Yoo YH. β -lapachone-Induced Apoptosis of Human Gastric Carcinoma AGS Cells Is Caspase-Dependent and Regulated by the PI3K/Akt Pathway. *Biomol Ther.* 2014; 22(3): 184–92.
107. Singh M, Sharma H, Singh N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion.* 2007; 7(6): 367–73.
108. Siu PM, Wang Y, Alway SE. Apoptotic signaling induced by H₂O₂-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sci.* 2009; 84(13-14): 468–81.
109. Gérard C, Dufour C, Goudenege S, Skuk D, Tremblay JP. AG490 improves the survival of human myoblasts in vitro and in vivo. *Cell Transplant.* 2012; 21(12): 2665–76.
110. Ringelmann B, Röder C, Hallmann R, Maley M, Davies M, Grounds M, et al. Expression of laminin alpha1, alpha2, alpha4, and alpha5 chains, fibronectin, and tenascin-C in skeletal muscle of dystrophic 129ReJ dy/dy mice. *Exp Cell Res.* 1999; 246(1):165–82.
111. Lund DK, Cornelison DDW. Enter the matrix: shape, signal and superhighway. *FEBS J.* 2013; 280(17): 4089–99.

112. Kikkawa Y, Sasaki T, Nguyen MT, Nomizu M, Mitaka T, Miner JH. The LG1-3 tandem of laminin alpha5 harbors the binding sites of Lutheran/basal cell adhesion molecule and alpha3beta1/alpha6beta1 integrins. *J Biol Chem.* 2007; 282(20): 14853–60.
113. Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(17):11025–30.
114. Dee K, Freer M, Mei Y, Weyman CM. Apoptosis coincident with the differentiation of skeletal myoblasts is delayed by caspase 3 inhibition and abrogated by MEK-independent constitutive Ras signaling. *Cell Death Differ.* 2002; 9(2): 209–18.
115. McMillan EM, Quadriatero J. Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation. *Biochem J.* 2014; 462(2): 267–77.
116. Qin W, Shi Y, Zhao B, Yao C, Jin L, Ma J, et al. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One.* 2010; 5(2).
117. Nguyen T V, Jayaraman A, Quaglino A, Pike CJ. Androgens selectively protect against apoptosis in hippocampal neurones. *J Neuroendocrinol.* 2010; 22(9): 1013–22.
118. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 2010; 8 : 31.
119. Hewitson TD, Darby IA. In situ localization of apoptosis using TUNEL. *Methods Mol Biol.* 2010; 611: 161–70.
120. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* 2012; 887: 41–7.
121. Castri P, Lee Y-J, Ponzio T, Maric D, Spatz M, Bembry J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and its cleavage products differentially modulate cellular protection through NF-kappaB-dependent signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(3): 640–51.

122. Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2016.
123. Skuk D, Tremblay JP. Cell therapy in muscular dystrophies: many promises in mice and dogs, few facts in patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15(9): 1307–19.
124. Bouchentouf M, Benabdallah BF, Rousseau J, Schwartz LM, Tremblay JP. Induction of Anoikis following myoblast transplantation into SCID mouse muscles requires the Bit1 and FADD pathways. *Am J Transplant*. 2007; 7(6): 1491–505.
125. Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp Cell Res*. 2010; 316(18): 3050–8.
126. Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The activation dependent adhesion of macrophages to laminin involves cytoskeletal anchoring and phosphorylation of the alpha 6 beta 1 integrin. *J Cell Biol*. 1990;110(6): 2167–74.
127. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Golbert DCF, Riederer I, Cotta-de-Almeida V. Laminin-Mediated Interactions in Thymocyte Migration and Development. *Front Immunol*. 2015; 6:579.
128. Patton BL. Laminins of the neuromuscular system. *Microsc Res Tech*. 2000; 51(3): 247–61.
129. Kutlesa S, Siler U, Speiser A, Wessels JT, Virtanen I, Rousselle P, et al. Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms. *Immunology*. 2002; 105(4): 407–18.
130. Ocampo JSP, de Brito JM, Corrêa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DMS, Savino W. Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol*. 2008; 254(1): 1–9.
131. Lyra JS, Madi K, Maeda CT, Savino W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J Pathol*. 1993;171(3): 231–6.
132. Savino W, Silva-Barbosa SD. Laminin/VLA-6 interactions and T cell

function. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas / Soc Bras Biofísica* . 1996; 29(9): 1209–20.

133. Silva-Barbosa SD, Riederer I, Savino W. Laminin-mediated interactions in heart graft rejection. *Transplantation*. 2001;72(1): 172–3.
134. Riederer I, Silva-Barbosa SD, Rodrigues ML, Savino W. Local antilaminin antibody treatment alters the rejection pattern of murine cardiac allografts: correlation between cellular infiltration and extracellular matrix. *Transplantation*. 2002; 74(11): 1515–22.
135. Into M, Mice I. Heat Shock Treatment Increases Engraftment of Transplanted Human Myoblasts Into Immunodeficient Mice. 2008; 630: 624–30.
136. Falcieri E, Martelli AM, Bareggi R, Cataldi A, Cocco L. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 193(1): 19–25.
137. Vasaturo F, Malacrino C, Sallusti E, Coppotelli G, Birarelli P, Giuffrida A, et al. Role of extracellular matrix in regulation of staurosporine-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2005;13(4): 745–50.
138. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional Diversity of Laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012; 28(1): 523–53.
139. Langenbach KJ, Rando TA. Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle Nerve*. 2002; 26(5): 644–53.
140. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminina glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*. 1979; 254(19): 9933–7.
141. Stupack DG, Cheresh DA. Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis. *Oncogene*. 2003; 22(56): 9022–9.
142. Li S, Liquari P, McKee KK, Harrison D, Patel R, Lee S, et al. Laminin-

sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *J Cell Biol.* 2005; 169(1): 179–89.

143. Zhan M, Zhao H, Han ZC. Signalling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol.* 2004;19(3): 973–83.
144. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(1): 9–22.
145. Hochreiter-Hufford AE, Lee CS, Kinchen JM, Sokolowski JD, Arandjelovic S, Call JA, et al. Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. *Nature.* 2013; 497(7448): 263–7.