

Paula Cristina Gorgueira Onofre Oliveira

Caracterização do perfil de expressão
gênica das células-satélite de camundongos
distróficos com diferentes defeitos moleculares

Characterization of satellite-cells gene
expression profile from dystrophic mice
carrying different molecular defects

São Paulo

2013

Paula Cristina Gorgueira Onofre Oliveira

Caracterização do perfil de expressão
gênica das células-satélite de camundongos
distróficos com diferentes defeitos moleculares

Characterization of satellite-cells gene
expression profile from dystrophic mice
carrying different molecular defects

Tese apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Doutor em Biologia, na Área de
Genética.

Orientador(a): Mariz Vainzof

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Onofre-Oliveira, Paula Cristina G.

Caracterização do perfil de expressão gênica das células-satélite de camundongos distróficos com diferentes defeitos moleculares

Número de páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia - Genética.

1. Células-satélite 2. Perfil de expressão gênica
3. Distrofia muscular I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia - Genética.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Mariz Vainzof

Orientador(a)

Dedicatória



A minha filha, Alice:

Não foi fácil, mas conseguimos... Que todo nosso sacrifício valha a pena.

Epígrafe

Amateurs sit and wait for inspiration, the rest of us just get up and go to work.

Stephen King - On Writing

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos os meus colegas do Laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada: Martinha, Lydía, Letícia, Poliana, Aurea, Dani, André, Camila, Priscila e todos os ICs/estagiários que passaram por aqui desde out/2005. Este trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês.

Agradeço também aos meus amigos de outros laboratórios que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado: em alguns momentos, vocês salvaram a minha vida! Muito obrigada por tudo.

Agradeço a Amanda Lanzotti que foi fundamental na primeira etapa dos experimentos. Amiga, você sabe o quanto me ajudou... Obrigada e saudades!

Um agradecimento mais que especial à minha orientadora, Mariz Vainzof. Obrigada por me ajudar a ir em frente com estes estudos e obrigada por todos os momentos em que precisei da sua compreensão. Com a sua ajuda, pude completar não só mais essa etapa da minha vida acadêmica, mas também uma etapa importante da minha vida pessoal. Obrigada!

Agradeço também à FAPESP pelo apoio financeiro que me permitiu realizar esta titulação.

Agradeço aos meus amigos por me apoiarem nos momentos difíceis e por estarem comigo nos momentos felizes. Agora vamos comemorar!

E por fim, agradeço à minha família: obrigada Marcelo, Alice, mãe, pai, Lu - pelo apoio, incentivo e por me ajudar a viabilizar esse doutorado. Obrigada por tudo!

Índice

I. Resumo	008
II. Abstract	009
III. Introdução	08
1. O músculo normal	08
2. Distrofias musculares: mutações e fenótipos	14
IV. Objetivos	28
V. Materiais e Métodos	29
1. Camundongos	29
2. Cultura de células	30
3. Citometria	32
4. <i>Microarray</i>	33
5. Softwares utilizados	36
6. PCR em tempo real (Q-PCR)	37
VI. Resultados	39
1. Extração de células-satélite	39
2. Caracterização fenotípica e identificação de subpopulações	42
3. Estudo do perfil de expressão gênica	46
VII. Discussão	43
1. Extração de células satélite	23
2. caracterização fenotípica e identificação de subpopulações	23
3. estudo do perfil de expressão gênica	22
VIII. Conclusões	22
IX. Referências bibliográficas	22
X. Anexos	22

Resumo

As células-satélite musculares vêm sendo muito estudadas em diferentes pesquisas, especialmente com o objetivo de aumentar a compreensão do mecanismo de sua ação na regeneração muscular e as respectivas implicações nas diferentes miopatias, visando identificar possíveis alvos terapêuticos. Dois modelos para distrofias, os camundongos *Large^{myd}* e *Lama2^{dy2j}/J* possuem um padrão de degeneração intenso e bastante semelhante, mas com diferenças na expressão de genes envolvidos na cascata de regeneração. Por isso, estes constituem interessantes modelos para o estudo de possíveis diferenças no mecanismo de ativação e atuação das células-satélite no músculo distrófico. Assim, os objetivos específicos deste projeto consistiram em: 1) isolar e caracterizar por citometria de fluxo as populações de células-satélite dos modelos *Large^{myd}* e *Lama2^{dy2j}/J* em comparação com o normal *C57Black6*, quanto a expressão de marcadores de miogênese e de células-tronco pluripotentes; e 2) estudar e comparar o perfil de expressão gênica destas populações de células satélites através de *microarray* de expressão.

Na caracterização fenotípica das células isoladas do músculo normal, aquelas que aderem mais precocemente (PP1) e mais tardiamente (PP2) mostram um padrão fenotípico semelhante entre si e com características mais próximas às miogênicas. Já a população de células de adesão bem mais tardia (PP6) apresentou um padrão de marcação misto, mantendo as características miogênicas, mas apresentando também padrão de células-tronco mesenquimais, sugerindo o fenótipo de células mais imaturas. Nos músculos distróficos, identificamos diferenças na constituição do *pool* de células presentes inicialmente no músculo, onde na linhagem *Lama2^{dy2j}/J* há indícios de uma população em estágio proliferativo, enquanto que na linhagem *Large^{myd}* há presença de células com maior imaturidade.

Os resultados da análise de expressão gênica nas populações caracterizadas se mostraram concordantes com os fenótipos celulares avaliados por citometria. Identificamos a hipo-expressão de genes ligados à regeneração e remodelamento muscular em ambos modelos distróficos. Considerando os genes diferentemente expressos somente em cada um dos modelos, os resultados sugerem ativação de proliferação celular e inibição da diferenciação na linhagem *Lama2^{dy2j}/J* e distúrbios na miogênese na linhagem *Large^{myd}*. Assim, pudemos identificar vias importantes alteradas em cada um dos modelos que explicam parte das diferenças encontradas nos trabalhos anteriores.

Abstract

Muscle satellite cells have been widely studied, especially to understand their mechanism of action in muscle regeneration and correspondent implications in the different dystrophic processes, aiming the identification of potential therapeutic targets. Two mice models for muscular dystrophies, *Large^{myd}* and *Lama2^{dy2j/J}*, have a pattern of an intense and very similar degeneration, but with differences in the expression of genes involved in the regeneration cascade. Therefore, they are interesting models to study possible differences in the mechanism of activation and action of satellite cells in the dystrophic muscle. The main objectives of this project are: 1) to isolate and characterize by flow cytometry, populations of satellite cells from *Large^{myd}* and *Lama2^{dy2j/J}* models, as compared to normal *C57Black6*, evaluating the presence of myogenic and pluripotent stem cells markers; and 2) to study and compare gene expression profiles of these populations of satellite cells using microarray technique.

In the phenotypic characterization of cells harvested from normal muscle, both faster (PP1) and slower (PP2) populations to adhere in culture flasks show similar phenotypic characteristics, which were closer to myogenic phenotype. On the other hand, the population of cells with very delayed adhesion ability (PP6) presented a mixed pattern, maintaining the myogenic characteristics, but associated to positive mesenchymal stem cell's markers, suggesting a phenotype of more immature cells. In dystrophic muscles, we could identify differences in the constitution of the first pool of cells present in the *Lama2^{dy2j/J}* muscle where there is evidence of a population in proliferative stage, while in the *Large^{myd}* strain, we found more immature cells.

Gene expression profile in the characterized populations showed consistent concordance with the cellular phenotypes assessed by flow cytometry. In both dystrophic models, we identified down-regulated genes related to regeneration and remodeling of the muscle. Considering only the genes differently expressed in each dystrophic model, data suggest the activation of cell proliferation and inhibition of differentiation pathways in *Lama2^{dy2j/J}* strain and altered myogenesis in the *Large^{myd}* model. Thus, we identified important altered pathways in each of the dystrophic models that could explain most of the differences in gene expression profile in the muscle, described in our previous work.

Introdução

1. O músculo normal

O tecido muscular é o principal responsável pelos movimentos corporais dos organismos e surgiu quando houve a separação entre o filo Porifera e o clado Eumetazoa, há mais de 600 milhões de anos, no período pré-cambriano (Steinmetz *et al.*, 2012). Dependendo de sua morfologia e função, pode ser dividido em liso, estriado cardíaco e estriado esquelético.

O músculo esquelético é formado por feixes de fibras alongadas, cilíndricas e multinucleadas, com diâmetro que varia entre 10 e 100 μ m, preenchidas por microfilamentos organizados que dão ao tecido a aparência estriada, alternando bandas claras e escuras. Estas fibras são geradas na fusão de precursores chamados mioblastos, formando um sincício de células musculares. Após a década de 1950, com o uso de microscopia eletrônica (Jones e Round, 1996), foi possível descrever as estrias como estruturas organizadas de miofibrilas. Estas estruturas, de diâmetro de 1 a 2 μ m, correm longitudinalmente à fibra muscular e apresentam repetição de unidades iguais, os sarcômeros, a unidade básica contrátil das fibras musculares. A banda clara é denominada banda I (isotrópica em luz polarizada) e a banda escura é denominada de banda A (anisotrópica)(Clark *et al.*, 2002)(figura 1).

Aproximadamente 80% do conteúdo total proteico do tecido muscular esquelético e cardíaco é formado pelas proteínas actina e miosina. Os componentes principais dos sarcômeros dos músculos estriados incluem arranjos paralelos de filamentos finos contendo actina que se estendem da banda I e se sobrepõem aos filamentos grossos contendo miosina da banda A (figura 1).

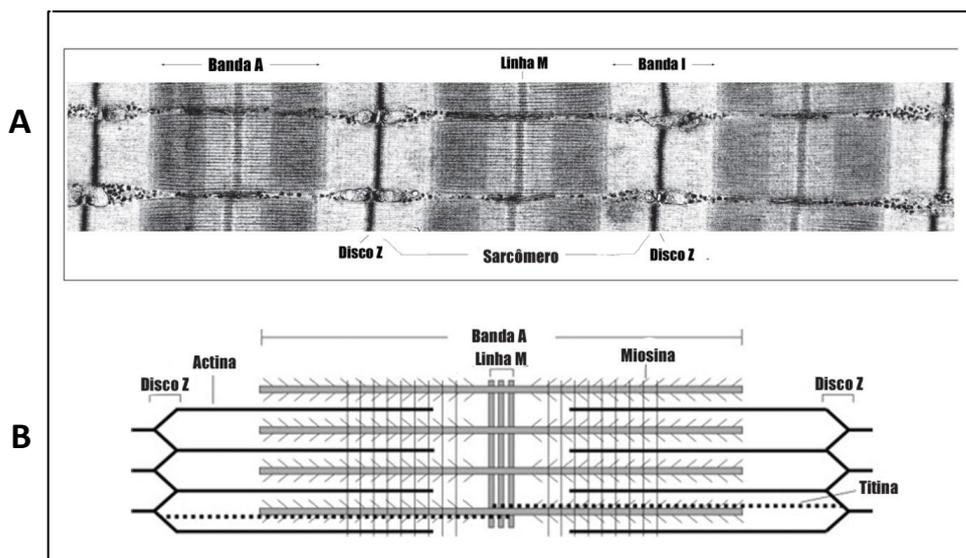


Figura 1: O sarcômero, unidade contrátil do músculo estriado esquelético. Em A, imagem de microscopia eletrônica onde é possível visualizar a organização das estruturas. Em B, representação esquemática de um sarcômero. Modificado de <http://www.ks.uiuc.edu/Research/z1z2/> e <http://www1.imperial.ac.uk/nhli/molecular/et/>

A actina, proteína de expressão ubíqua, está envolvida em diferentes funções celulares, como motilidade, citocinese e contração (Clark *et al.*, 2002). Juntamente com a tropomiosina e três subunidades da troponina (TnC, TnT e TnI), formam os filamentos finos do sarcômero. A tropomiosina se estende por sete subunidades de actina e bloqueia os sítios de ligação à miosina, até que seja movida pela ligação de cálcio à troponina C (Jones e Round, 1996), ou seja, constitui-se na molécula regulatória da interação entre os filamentos grossos e os filamentos finos (Clark *et al.*, 2002)(figura 2).

Os filamentos grossos, por sua vez, são formados principalmente de centenas de moléculas de miosina, as proteínas motoras do sarcômero. A miosina muscular é composta de duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves, sendo que destas, duas são da família de cadeias leves essenciais e as outras duas são cadeias leves regulatórias. Por meio de hidrólise de ATP o domínio catalítico motor da miosina que interage com a actina, chamado de cabeça, passa por uma grande rotação angular, que move os filamentos uns em direção aos outros, gerando o movimento muscular (Clark *et al.*, 2002) (figura 2).

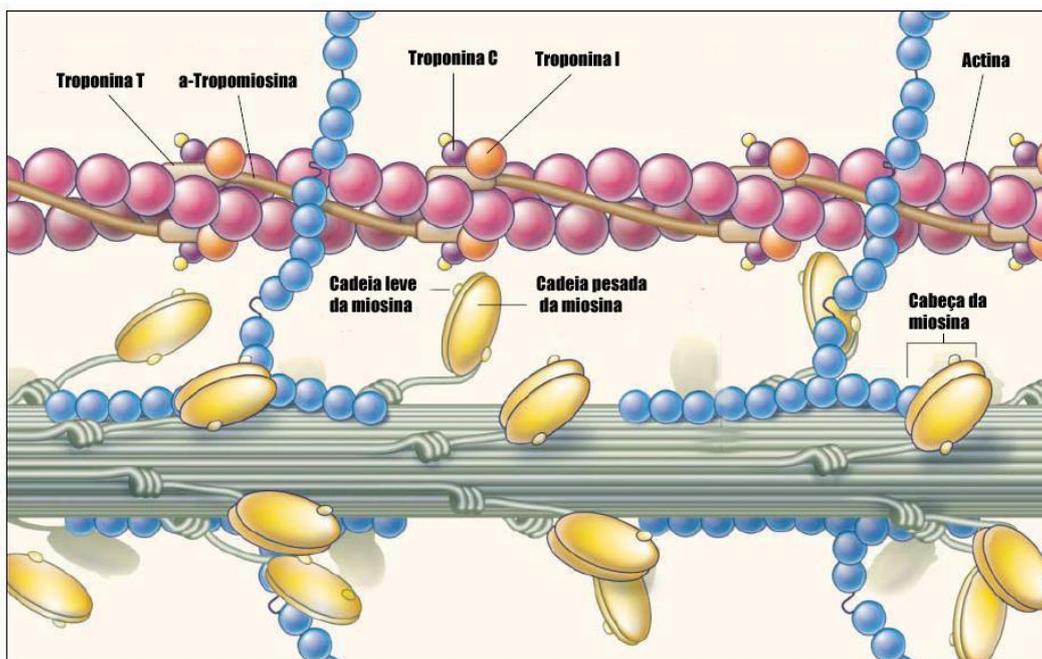


Figura 2: Organização das moléculas responsáveis pelo movimento no sarcômero. Representação esquemática das principais proteínas atuantes no movimento das fibras musculares. Modificado de (Spirito *et al.*, 1997).

O terceiro sistema filamentososo é formado de moléculas únicas de titina (a maior proteína de vertebrados identificada até hoje), que se estendem por meio sarcômero. Outra proteína gigante, a nebulina, se estende pelo comprimento dos filamentos de actina e forma o quarto sistema filamentososo no músculo esquelético. Os discos Z representam as fixações laterais do sarcômero, onde os filamentos finos, filamentos de titina e nebulina se ancoram (Clark *et al.*, 2002).

O conjunto de miofibrilas é, por sua vez, preso à membrana plasmática da célula muscular por meio de outras proteínas que têm afinidade pelos miofilamentos e por proteínas da membrana plasmática. A distrofina, proteína de localização sub-sarcolemal, se liga aos filamentos de actina e a um complexo de proteínas integrais da membrana plasmática (complexo distrofina-glicoproteínas associadas - DGC)(Rando, 2001)(figura 3) e acredita-se que, além de ajudar a manter a estabilidade e organização da membrana e do equipamento contrátil, tenha também a função de manter o tráfego de informações através da membrana da célula muscular (Hoffman e Dressman, 2001).

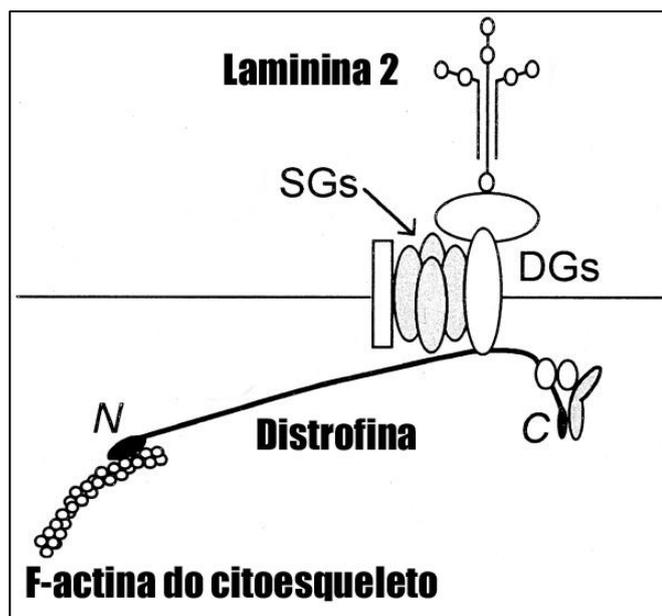


Figura 3: Representação esquemática do complexo DGC. DGs - distroglicanas; SGs - sarcoglicanas. Modificado de (Berchtold, Brinkmeier e Müntener, 2000).

A formação e organização das miofibrilas no interior das fibras musculares ocorrem em decorrência do processo de diferenciação celular, após a fusão dos mioblastos e formação dos miotubos. Este processo acontece tanto no período de desenvolvimento embrionário como durante o processo de regeneração muscular, através das células-satélite presentes no músculo maduro.

a. Desenvolvimento muscular embrionário

No período embrionário, a musculatura é derivada dos somitos, mais precisamente dos miótomos, ou de diferenciações locais de células mesenquimais. As primeiras células miogênicas podem ser encontradas na parte anterior da linha primitiva e nas células mesodérmicas formadas na gastrulação (Krenn *et al.*, 1988). Estas células originam a mesoderme paraxial que se transforma depois em somitos, dermomiótomos e finalmente miótomos. Os mioblastos sofrem diversas divisões que levam à formação do miotubo multinucleado e finalmente à fibra muscular sincicial. Os núcleos do miotubo primeiramente

localizam-se no centro da célula e no decorrer da síntese de miofibrilas o núcleo é gradualmente movido para a periferia, numa posição subsarcolemal (Abmayr e Pavlath, 2012).

Quando células mesenquimais são estimuladas a originar células musculares esqueléticas, observa-se um alongamento da sua forma e do núcleo, formando os mioblastos. Vários mioblastos fundem-se para formarem os miotubos, que começam a sintetizar as proteínas musculares necessárias para sua estrutura e função, constituindo assim a fibra muscular.

A diferenciação e determinação da mesoderme em células musculares envolve uma família de fatores de transcrição do tipo *helix-loop-helix*, dos quais o primeiro a ser descoberto foi *MyoD1*.

b. Regeneração muscular: células-satélite

No indivíduo adulto existe uma subpopulação de células musculares parcialmente indiferenciadas, mononucleares, localizadas nas periferias dos miotubos maduros, entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares: são as células-satélite, também chamadas de células precursoras miogênicas. Estas células conferem à musculatura uma grande capacidade de se adaptar a demandas como crescimento e injúria. Quando não estimuladas, permanecem num estado quiescente, não proliferativo (Chen e Goldhamer, 2003). Entretanto, em resposta a um estímulo, seja ele uma injúria ou uma demanda aumentada de trabalho, estas células tornam-se ativas, proliferam e começam a expressar marcadores miogênicos, diferenciando-se em mioblastos. Estes podem se fundir às fibras pré-existentes gerando hipertrofia (aumento do tamanho das fibras) ou fusionam-se para formar novas fibras multinucleadas causando hiperplasia (aumento do número de fibras naquela região), em um processo que recapitula os eventos fundamentais do desenvolvimento muscular (Hawke e Garry, 2001).

Esta população de células precursoras musculares pode suportar diversos ciclos de degeneração e regeneração (Charge e Rudnicki, 2004). Na degeneração é possível observar a morte das fibras musculares por apoptose ou necrose. Este evento é marcado pelo rompimento do sarcolema das miofibrilas, refletido por uma elevação do nível sérico de proteínas musculares como a creatina quinase, geralmente restrita ao citoplasma da célula muscular. Assim, em decorrência deste processo, é possível observar a ativação de células mononucleadas, especialmente células inflamatórias e células-satélite, que determinam a indução da regeneração muscular.

A capacidade regenerativa das células-satélite, no entanto, é finita. A exaustão do *pool* de células precursoras é um importante fator que contribui com a deterioração muscular gradual observada em pacientes com distrofias musculares, como veremos a seguir. Se o músculo perde a sua capacidade regenerativa ocorre, então, a substituição do tecido muscular por tecido adiposo ou conjuntivo.

A regeneração muscular é, portanto, um processo complexo que requer uma modulação coordenada entre as células-satélite, fatores de crescimento, citocinas, respostas inflamatórias, componentes vasculares e da matriz extracelular (Goetsch *et al.*, 2003). Os fatores de transcrição miogênicos que pertencem à família protéica *helix-loop-helix* têm um papel fundamental na miogênese e na regeneração: as células onde eles não são expressos não se diferenciam em músculo (Seale e Rudnicki, 2000).

c. Fatores envolvidos no desenvolvimento, regeneração e degeneração musculares

Diversos fatores estão implicados no desenvolvimento muscular, e as vias de atuação de cada um deles ainda não são totalmente conhecidas.

Os mais importantes marcadores da determinação da via miogênica são os componentes da família de fatores de transcrição chamados de fatores musculares regulatórios (MRF). As principais proteínas deste grupo são MYF5, MYOD, MYF6 (também chamada de MRF4) e miogenina (Brand-Saberi e Christ, 1999). A super-expressão de *MYOD* e *MYF5* levam a diferenciação de variados tipos celulares em músculo (Choi *et al.*, 1990; Weintraub, 1993) e por isso estas proteínas foram chamadas de fatores de determinação muscular, enquanto que *MYF6* e miogenina estariam atuando num ponto mais abaixo na via miogênica (Brand-Saberi e Christ, 1999).

Quando a inativação do gene *Myod* é induzida em camundongos, observa-se atraso no desenvolvimento da musculatura dos membros. Entretanto, quando há inibição do *Myod* concomitante com inibição do *Myf5*, há ausência total de mioblastos e não há formação de tecido muscular (Muntoni *et al.*, 2002): os camundongos duplo-nocautes *Myf5^{-/-}:Myod^{-/-}* não possuem musculatura esquelética porque são incapazes de diferenciar os precursores em mioblastos (Rudnicki *et al.*, 1993). Porém, como os camundongos nocaute para *Myf5* e *Myod* separadamente possuem musculatura, assumiu-se que estes dois fatores de determinação muscular atuam em vias separadas ou podem compensar a função um do outro (Rudnicki *et al.*, 1992; Weintraub, 1993; Braun e Arnold, 1996; Wang *et al.*, 1996).

Assim, MYF5 está estruturalmente relacionada à MYOD e também atua auxiliando na proliferação das células-satélite na regeneração muscular (Hawke e Garry, 2001). Não há nenhuma patologia associada a mutações nos genes que codificam *Myf5* e *MyoD*, porém a sua expressão pode estar aumentada em distrofias musculares e em miopatias inflamatórias.

Na regeneração muscular, MYOD também funciona como o fator de transcrição miogênico principal que leva ao aumento da expressão de genes ligados a diferenciação celular, exercendo, portanto, um importante papel na fase pós-ativação das células-satélite. Assim, o MYOD atua na regulação da expressão de genes em tempos diferentes durante a miogênese e é

essencial no reparo de lesões musculares, uma vez que participa da ativação das células-satélite (Hawke e Garry, 2001).

Além disso, as células-satélite quiescentes expressam também RNA mensageiro de *MYF5* (Beauchamp *et al.*, 2000; Zammit *et al.*, 2006), embora até o presente momento não existem evidências da expressão da proteína por estas células. Células-satélite de camundongo e linhagens celulares miogênicas expressam a proteína MYF5 na fase proliferativa, e a proteína não foi detectada após diferenciação e fusão em miotubos (Lindon, Montarras e Pinset, 1998; Yablonka-Reuveni *et al.*, 1999). Assim, em algumas fases do desenvolvimento não foi possível relacionar a expressão gênica de *Myf5* com a produção de sua proteína, o que não permite a total elucidação de seu papel, levantando questões de como este fator está implicado na proliferação dos mioblastos e na renovação das células-satélite que devem permanecer em estado quiescente (Yablonka-Reuveni *et al.*, 2008).

A diferenciação dos mioblastos em fibra muscular também depende de MYF6 e, particularmente, miogenina (Buckingham *et al.*, 2003), que é um fator essencial para a diferenciação de células pluripotentes em músculo. Estudos realizados com culturas de diversos tipos celulares mostram que estes se diferenciam em músculo quando expostos à miogenina. Um experimento realizado com camundongos mostrou que mutações no gene da miogenina causam morte imediatamente após o nascimento e os animais apresentam diminuição muito grande de massa muscular e perda da linha Z do sarcômero (Muntoni *et al.*, 2002).

Assim, na regeneração, a expressão de *Myod* é observada durante a proliferação das células-satélite, enquanto que sua diferenciação é marcada pelo início da expressão de miogenina, com um declínio concomitante da expressão de *Myf5*, saída do ciclo celular e subsequente fusão de mioblastos em miotubos multinucleados (Yablonka-Reuveni *et al.*, 2008).

Outros fatores também estão implicados na degeneração e regeneração muscular (figura 4). O Fator de Crescimento Transformador β (TGFB), proteína regulatória que controla diversas funções na célula faz parte de uma superfamília de importantes citocinas regulatórias do crescimento celular (Charge e Rudnicki, 2004), também chamada de superfamília do TGF beta. A miostatina (GDF8) é um dos membros desta superfamília que inibe a proliferação e a diferenciação muscular, pois silencia a ativação dos fatores de transcrição (Hawke e Garry, 2001). Desta forma, ela determina a massa muscular esquelética e atua como regulador negativo do crescimento muscular (Muntoni *et al.*, 2002). Outro membro desta superfamília é a isoforma de TGFB chamada de TGF β -1, citocina inflamatória que provavelmente está envolvida no processo de fibrose do músculo distrófico (Gosselin *et al.*, 2004), visto que, *in vitro*, estimula a síntese de colágeno (Ignatz e Massague, 1986; Grande, Melder e Zinsmeister, 1997) e inibe a degradação deste colágeno (Overall, Wrana e Sodek, 1991; Sharma e Ziyadeh, 1994). Mais do que isso, o *TGFB1*, que está superexpresso no músculo esquelético distrófico (Bernasconi *et al.*,

1995; Hartel *et al.*, 2001), é expresso também por células inflamatórias, como macrófagos (Robertson *et al.*, 1993). Alguns destes fatores estão representados na figura 4.

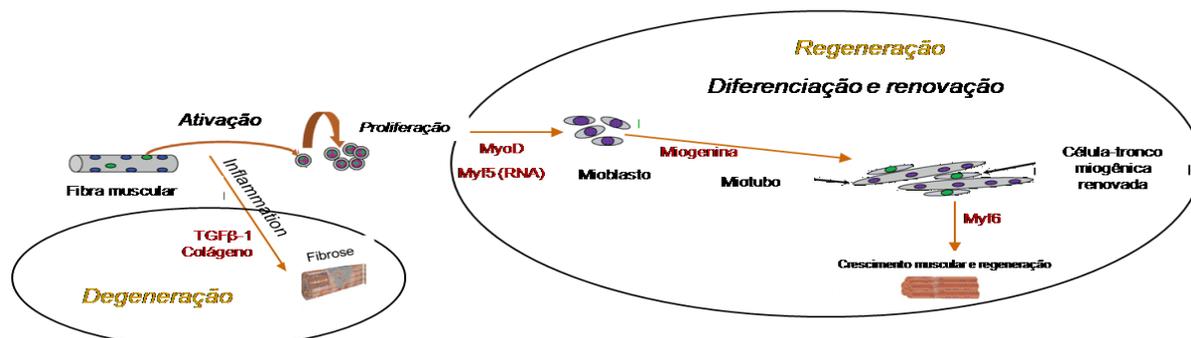


Figura 4: Esquema dos principais fatores envolvidos na degeneração e regeneração musculares. Modificado de (Yablonka-Reuveni *et al.*, 2008).

Muitos outros fatores estão envolvidos com a regulação das células-satélite no músculo esquelético adulto, como Fatores de Crescimento Insulina-like I e II (IGFI e IGFII), que participam da regulação da regeneração, pois aumentam a proliferação, diferenciação e fusão das células-satélite *in vitro*, provocando aumento da massa muscular e da quantidade de células (Hawke e Garry, 2001; Muntoni *et al.*, 2002; Charge e Rudnicki, 2004); óxido nítrico, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento derivado de endotélio e testosterona (Hawke e Garry, 2001). Obviamente, a regulação das células-satélite é orquestrada por numerosos fatores coordenados temporalmente e dependentes de concentração adequada durante a regeneração do músculo.

2. Distrofias Musculares: mutações e fenótipos

As distrofias musculares constituem um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. A fraqueza muscular se manifesta quando existe um desequilíbrio nos ciclos de degeneração e regeneração, onde falhas nos processos regenerativos levam à infiltração do músculo por tecido conjuntivo, adiposo e inflamatório, processo este visível em estudos histopatológicos.

Dentre as diferentes formas, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum, com uma incidência de um em cada 3500 nascimentos de sexo masculino e cerca de 1/3 dos casos ocorre pelo aparecimento de uma nova mutação na criança. Já a sua forma alélica, Distrofia Muscular de Becker (BMD) é cerca de 10 vezes mais rara. Fenotipicamente nota-se diferença tanto na velocidade de progressão quanto na idade de início dos sintomas (Zatz, 2001). Na DMD os sinais clínicos surgem entre os três e cinco anos de idade, com quedas frequentes, dificuldade de subir escadas, correr e levantar-se do chão. O confinamento em cadeira de rodas se dá na maioria dos casos até os doze anos de idade e os afetados raramente sobrevivem após a terceira década de vida (Kapsa, Kornberg e Byrne, 2003). Já na BMD os

sintomas iniciam-se, em geral, na segunda década de vida e a velocidade de progressão é muito variável entre os indivíduos.

O gene responsável pela DMD/BMD localiza-se no braço curto do cromossomo X (Xp21) e é o maior gene humano, com 2.3Mb. O produto do gene é a distrofina (427kD), proteína responsável pela ancoragem do complexo distrofina-glicoproteínas associadas às proteínas do sarcolema da fibra muscular (figura 5).

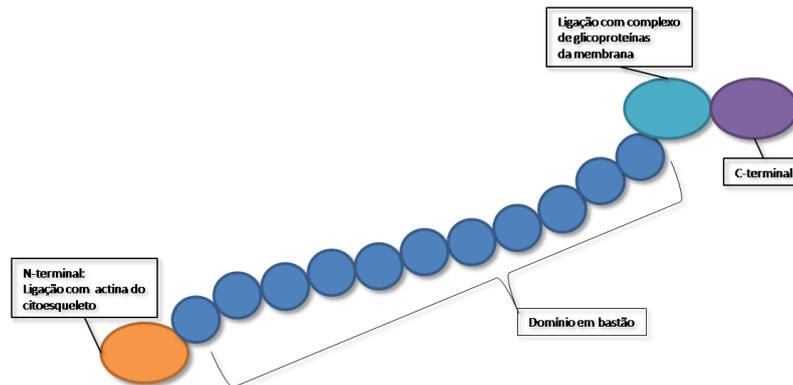


Figura 5: Esquema da proteína distrofina, mostrando seus diferentes domínios de ligação com outras proteínas.

As mutações causadoras de DMD e BMD são deleções em cerca de 60% dos casos, duplicações em 5-6% e mutações de ponto nos casos restantes (Koenig *et al.*, 1989). A grande maioria das mutações nos pacientes com DMD resulta na ausência completa da proteína, enquanto a presença de baixas quantidades de distrofina é encontrada em casos de BMD (Nawrotzki, Blake e Davies, 1996). Existe uma correlação entre o tipo de mutação e o resultado fenotípico. Na BMD a deleção é em fase, o quadro de leitura do RNA mensageiro é mantido e tem-se como resultado uma proteína quantitativamente reduzida ou com deleções internas, porém parcialmente funcional. Já na DMD a deleção cria uma mutação de mudança de quadro de leitura (*frameshift*), e tem-se uma proteína gravemente truncada, rapidamente destruída pela célula. A ausência da distrofina no músculo resulta em uma deficiência secundária nos componentes do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (Ohlendieck e Campbell, 1991) e como consequência as fibras musculares dos pacientes com DMD ficam mais suscetíveis ao estresse mecânico causado pela contração muscular, levando a um processo de degeneração acentuado.

Outra proteína importante cuja deficiência leva a graves doenças neuromusculares é a laminina 2, principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular (Figura 6). A laminina 2 é composta por uma cadeia α e duas outras cadeias, β e γ e é expressa em vários tipos celulares, entre eles células musculares esqueléticas e cardíacas, células de Schwann, trofoblastos e células de origem mesenquimal (Vilquin *et al.*, 1999). Sua ligação ao citoesqueleto subsarcolemal se dá através do grande complexo de glicoproteínas associadas à

distrofina. O bom funcionamento do complexo seria responsável por um correto mecanismo de contração muscular (Ervasti e Campbell, 1993).

A subunidade $\alpha 2$ da laminina 2, também chamada de merosina, foi identificada no início dos anos 90 como a responsável pela patogênese de uma forma de distrofia muscular congênita muito grave, CMD1A, causada por mutações no gene *LAMA2* que a codifica (Tome *et al.*, 1994).

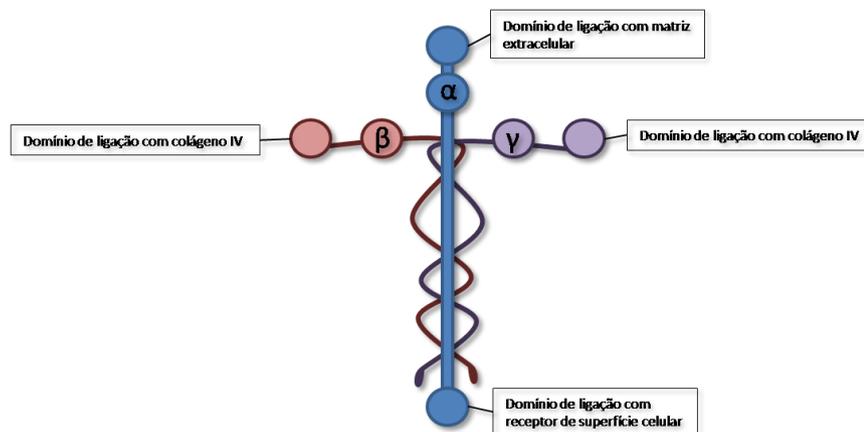


Figura 6: Esquema da proteína laminina, mostrando suas diferentes subunidades e domínios de ligação com outras proteínas.

Cerca de 95% dos pacientes com mutações no gene *LAMA2* apresentam deficiência total da proteína, enquanto que os restantes 5% apresentam deficiências parciais. Clinicamente, o grupo de pacientes laminina-negativos apresenta um fenótipo mais grave e a maioria dos pacientes é incapaz de adquirir marcha independente. A deficiência parcial da proteína tem sido encontrada em pacientes com quadro clínico mais benigno.

O gene *LAMA2* é composto por 260kb organizados em 64 éxons e a parte codificante do RNA mensageiro tem cerca de 9.5kb. O estudo de mutações no gene *LAMA2* mostrou grande heterogeneidade, com presença de deleções e mutações de sentido trocado levando a códons de parada. A mutação mais frequente, encontrada em cerca de 20% dos pacientes, é uma deleção de 2pb (2096-2097). Mutações de sentido trocado e pequenas deleções que não alteram o quadro de leitura levam à formação de uma proteína truncada e deficiência parcial da merosina no músculo.

Outras formas de distrofias congênitas podem ser causadas por genes envolvidos no processo de glicosilação das proteínas musculares. Uma delas, a CMD1D, é causada por mutações no gene da glicosil-transferase *LARGE*. Mutações neste gene, muito grande (mais de 660kb entre 16 éxons e respectivos íntrons) e difícil de ser estudado, foram primeiramente encontradas em uma paciente que portava a mutação de forma heterozigota composta (Longman *et al.*, 2003). A pequena quantidade de pacientes identificados com mutações neste gene sugere que há semelhança do quadro clínico dos afetados em *LARGE* com outras distrofias congênitas,

o que foi constatado quando dois irmãos diagnosticados como Walker-Warburg, outra forma de distrofia muscular congênita com comprometimento cerebral, foram identificados como portadores de deleções em homozigose no gene *LARGE* (Van Reeuwijk *et al.*, 2007).

Outras formas de distrofia são as do tipo cinturas, que afetam principalmente a região das cinturas pélvica e/ou escapular. Estas formas podem ser de herança autossômica dominante ou recessiva e possuem ampla variabilidade clínica, de suave a grave, e heterogeneidade de locus, com muitos genes diferentes causando quadro clínico bastante semelhante. Uma das distrofias de cinturas que estamos interessados é a LGMD-2B, causada por mutações no gene que codifica a proteína disferlina. Esta proteína está envolvida na contração muscular e possui domínios que possuem um papel em eventos de fusão de membrana mediados por cálcio, o que sugere seu envolvimento em reparo e regeneração de membranas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9215>).

As distrofias musculares são, portanto, um conjunto bastante complexo de doenças, com inúmeros genes causadores de diversos quadros clínicos diferentes a serem considerados (figura 7).

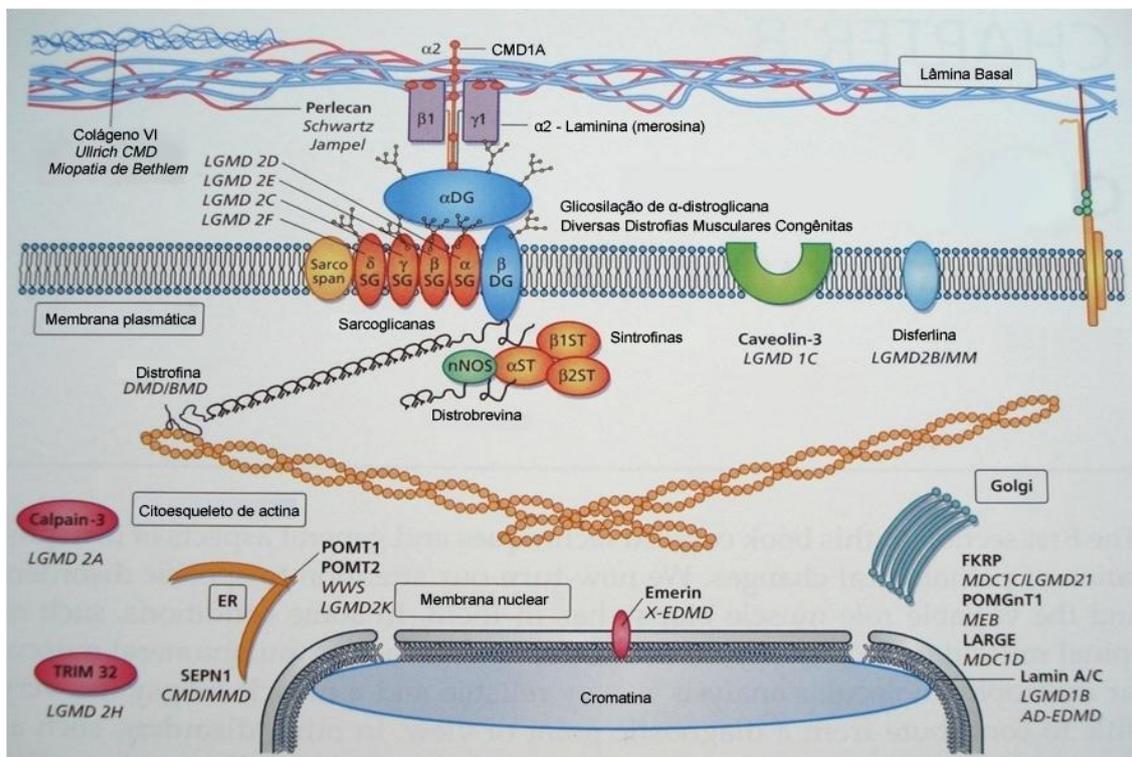


Figura 7: Esquema das diversas proteínas musculares e distrofias associadas, mostrando a enorme variedade de possíveis genes e fenótipos relacionados. Retirado de (Dubowitz, Sewry e Lane, 2007).

a. Degeneração Muscular

A degeneração muscular é o processo de perda das características estruturais da musculatura esquelética, como resultado de injúria ou como consequência de mutações nas proteínas componentes da fibra muscular. O desequilíbrio causado por estes fatores leva à instabilidade do sarcolema e danos causados pelo movimento de contração (Alderton e Steinhardt, 2000). Após o dano ao sarcolema, um aumento no influxo de cálcio foi observado (Alderton e Steinhardt, 2000), o que, por sua vez, pode tornar as fibras musculares mais suscetíveis a necrose, uma das principais características patológicas das distrofias musculares (Cohn e Campbell, 2000). Com a necrose ocorre o rompimento da fibra muscular e extravasamento do seu citoplasma, que leva ao grande aumento de algumas proteínas sarcoplasmáticas, como a creatina quinase, no soro de pacientes portadores de distrofia muscular (Cohn e Campbell, 2000).

Quanto ao processo de degeneração muscular, Zanotti e colaboradores (Zanotti *et al.*, 2007) procuraram investigar se os componentes da matriz extracelular contribuem para a fibrose observada nas distrofias musculares, principalmente DMD. Foram quantificados transcritos e proteínas em culturas de miotubos de pacientes com DMD e controles. Os autores analisaram *TGFβ-1*, decorina, metaloproteinases MMP-2 e MMP-9, TIMP 1, 2 e 3, colágeno 1 e 6 e miostatina.

Os autores concluíram que a expressão dos transcritos e proteínas de vários componentes da matriz extracelular estão alterados nas células musculares DMD *in vitro*, indicando que estas células contribuem para o processo patológico, já que a inflamação e degeneração características de DMD *in vivo* estão presumivelmente ausentes em cultura. Também observaram que a miostatina (potente inibidor de ativação de células-satélite e renovação muscular) está aumentada, e que a decorina (ligante e inibidor de *TGFβ-1* e miostatina) estão reduzidas, o que pode ter implicações nas terapias que buscam reduzir a fibrose muscular.

b. Modelos animais

O uso de modelos animais como camundongos, cães e gatos é crucial para o melhor entendimento das doenças genéticas humanas e para a investigação de terapias experimentais (Vainzof *et al.*, 2008). Para se estudar a distrofia muscular do tipo Duchenne, por exemplo, é possível utilizar o modelo *Dmd^{mdx}*, linhagem deficiente em distrofina devido a uma mutação de ponto no éxon 23 do gene, que forma um códon de parada prematura (Bulfield *et al.*, 1984). Como nos pacientes, o músculo de camundongos *Dmd^{mdx}* é afetado por degeneração e necrose.

Entretanto, o camundongo exibe um quadro clínico mais brando (Pastoret e Seville, 1995), sem fraqueza muscular evidente nem redução na expectativa de vida.

Esse camundongo também apresenta um grande número de fibras revertentes, da ordem de 2 a 3%. Estas fibras passam a expressar novamente a distrofina, de forma espontânea. Desta forma, é necessário que outras formas de avaliação do sucesso da terapia testada sejam desenvolvidas, já que a simples verificação da expressão de distrofina no tecido muscular não é suficiente para garantir que esta distrofina venha da terapia e não das fibras revertentes.

Para o defeito na proteína disferlina existe o modelo murino SJL/J-*Pde6b^{rd1}*, que apresenta uma redução na quantidade de disferlina detectada por *western blot* a aproximadamente 15% do valor encontrado nos animais normais. O camundongo SJL/J-*Pde6b^{rd1}* possui uma deleção de 171pb, o que possivelmente leva à instabilidade da proteína formada, o que explicaria a menor quantidade de proteína detectada. Este modelo apresenta discretas alterações histopatológicas e pouco comprometimento muscular quando jovem, que pode se intensificar com o avanço da idade (Bittner *et al.*, 1999).

Um modelo atualmente disponível para defeitos de glicosilação é o camundongo *Large^{myd}*, portador de uma mutação que causa perda de função da glicosil-transferase LARGE. Estas enzimas têm importante papel na via de glicosilação das proteínas da membrana muscular, responsáveis pela conexão entre o interior celular e a matriz extracelular. No caso de defeitos de glicosilação todas estas proteínas de membrana ficam instáveis e o músculo apresenta um quadro distrófico. A mutação presente no camundongo *Large^{myd}* é uma deleção de três éxons no gene da *glycosyltransferase-like large1 (acetylglucosaminyltransferase-like 1A)*. O camundongo homocigoto afetado possui músculos bastante degenerados na análise histológica e fenótipo de fraqueza muscular significativa. O comprometimento se estende ao coração, sistema nervoso e sistema reprodutivo (Browning *et al.*, 2005).

Outros modelos murinos interessantes são os das distrofias musculares congênitas, relacionados com defeitos em proteínas da lâmina basal. Muitas mutações distintas no gene codificante da cadeia $\alpha 2$ da laminina 2 (*Lama2*) foram caracterizadas, algumas das quais levam a ausência total da proteína, enquanto outras levam a deficiência parcial (Vilquin *et al.*, 1999; Vilquin *et al.*, 2000). Em ambos os casos, há presença de uma distrofia muscular com comprometimento muscular variando de grave a extremamente severo. Existem inúmeras linhagens de camundongos com mutações espontâneas no gene *Lama2*, incluindo os tipos *dy/dy* e *Lama2^{dy2J}/J*, identificados em 1955 e 1970, respectivamente. O camundongo *dy/dy* expressa um polipeptídeo de laminina- $\alpha 2$ de tamanho aparentemente normal, porém em quantidade muito pequena e o animal sofre de uma forma bastante grave de distrofia muscular, com fraqueza acentuada e reduzido tempo de vida (Guo *et al.*, 2003). A mutação neste camundongo ainda não foi localizada. No caso do camundongo *Lama2^{dy2J}/J* foi possível detectar que a mutação no gene *Lama2* ocorre de tal forma que o *splicing* acontece de forma anormal, produzindo uma

laminina- $\alpha 2$ onde falta o domínio VI N-terminal (Xu *et al.*, 1994; Sunada *et al.*, 1995). A proteína truncada aparece em quantidade substancial no músculo esquelético do animal e seu quadro clínico é menos grave do que no camundongo *dy/dy* (Guo *et al.*, 2003), embora sua expectativa de vida e marcha não se comparem as de um camundongo normal. Pelo fato de apresentar um fenótipo diferencial e grave estes camundongos são bastante importantes no estudo do sucesso de terapias diversificadas, já que um aumento na expectativa de vida, por exemplo, pode constituir um resultado significativo. Alguns dos modelos estão exemplificados na figura abaixo.

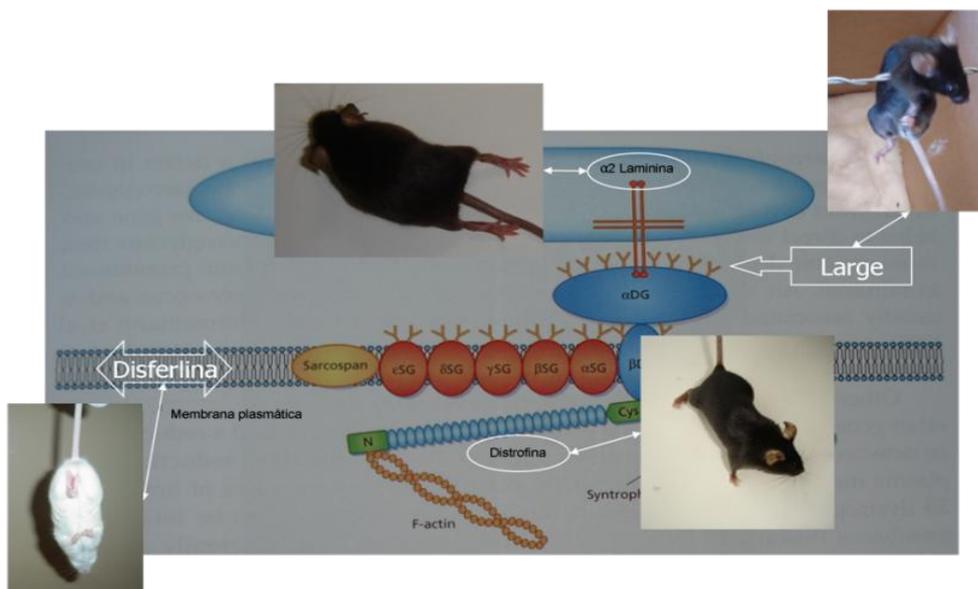


Figura 8: Esquema das diversas proteínas musculares e modelos animais disponíveis, mostrando a variedade de possíveis genes e fenótipos relacionados. Modificado de (Dubowitz, Sewry e Lane, 2007).

c. Células-satélite e distrofias musculares

i. Marcadores e subpopulações

As células-satélite vêm sendo muito estudadas em diferentes pesquisas, especialmente com o objetivo de aumentar a compreensão do mecanismo de ação destas células na regeneração muscular e as implicações que alterações nesta população celular podem ter nas diferentes miopatias.

O controle da proliferação e diferenciação das células-satélite sempre foi alvo de investigação, especialmente porque a elucidação do mecanismo de ação destas vias pode levar a possíveis alvos terapêuticos que estimulem a regeneração muscular. Apesar dos esforços, estes mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente elucidados. Neste sentido, diversos trabalhos buscam marcadores específicos de células-satélite quiescentes e/ou ativas para isolar esta população e mantê-la em cultura a fim de realizar estudos diversos (Kallestad e Mcloon, 2010; Tajika *et al.*, 2010; Yajima *et al.*, 2010).

No trabalho de Yajima e colaboradores (2010), os autores utilizam a análise de expressão gênica de genoma total (*genome-wide gene expression analysis*) para a identificação de marcadores específicos de células-satélite quiescentes e/ou ativas. Nesta pesquisa, conseguiram identificar o envolvimento do receptor de calcitonina na ativação das células-satélite e da família gênica Six na regulação da proliferação e diferenciação destas células. Os genes desta família são importantes na formação de diversos órgãos no desenvolvimento embrionário e expressos no somito e mioblastos em processo de migração. Nas células-satélite, a proteína SIX5 inibe a proliferação e quando seus níveis são reduzidos por RNA de interferência as células voltam a proliferar. SIX1 e SIX4, por sua vez, possuem um papel importante no estímulo à diferenciação celular pela ativação da miogenina. Os autores propõem que o maior entendimento da família Six pode levar a alvos importantes no controle da população de células-satélite.

Um grupo de Minnesota aborda a heterogeneidade das populações de células isoladas do músculo, especialmente no que se refere a marcadores de membrana que tornem possível o isolamento direto das células de interesse (Kallestad e Mcloon, 2010). Uma das abordagens de separação de subpopulações amplamente utilizada usa o corante Hoechst 33342, que separa as células em dois grupos: uma população principal, que retém o corante, e uma população lateral (ou *side population*), que elimina o corante (Goodell et al., 1996) e é descrita como multipotente (Asakura e Rudnicki, 2002). O objetivo do estudo foi de determinar a identidade de subpopulações celulares dentro dos grupos de população principal e população lateral derivadas de músculo esquelético imediatamente após serem separadas com o auxílio do Hoechst. As células retiradas de diferentes músculos (tibial anterior e músculos extraoculares) e espécies (coelho, camundongo) foram fixadas, marcadas com diversos marcadores de células multipotentes ou musculares e analisadas com auxílio de citometria de fluxo. Os autores utilizaram Sca-I e CD34 como marcadores de multipotência, Pax-7 ou M-caderina aliados a CD34 para determinar o comprometimento com a linhagem muscular e CD45 e Sca-I para determinar o potencial hematopoiético das células. Os autores concluíram que existem grandes diferenças entre as amostras que testaram na quantidade de células-satélite obtidas tanto nos diferentes tecidos quanto nas diferentes espécies. Concluíram também que o uso do Hoechst não enriquece nenhuma subpopulação específica derivada do músculo, ou seja, este método de separação não pode ser usado para prever o comportamento das células isoladas. Os autores ainda estão fazendo estudos para definir um painel de marcadores exibido por diferentes subpopulações, que poderá ser usado para selecionar com maior precisão as células de interesse.

Outro trabalho conclui que a *side population* (SP) isolada do tecido muscular possui sim uma função biológica importante (Penton et al., 2013). Como já vimos, esta população de células também é residente no tecido muscular, porém em muito menor quantidade do que as células-satélite. Estudos revelaram que as células SP podem participar da regeneração muscular

dando origem a células-satélite, repovoando o seu nicho, inclusive com potencial para regeneração muscular a longo prazo. Estas células são isoladas por FACS baseado em sua capacidade de eliminar o corante Hoechst 33342. Porém estas células também formam uma população heterogênea no que diz respeito aos marcadores que expressam. A subpopulação mais abundante (~80%) é a que relaciona as células SP com vasos e que portanto expressa o marcador endotelial CD31. Outra subpopulação (2%-10%) é derivada de linhagens sanguíneas e expressa CD45. Finalmente, a atividade miogênica das células SP provém de uma terceira subpopulação (~5%), que não expressa CD31 ou CD45, mas pode expressar o marcador de célula-satélite Pax7. Os autores do trabalho mostram que estas células SP negativas para CD45 e CD31 são positivas não só para Pax7 mas também para Sca1 e PDGFR α e que embora possuam uma grande capacidade de se diferenciar em células-satélite e miotubos em seu estado selvagem, quando sofrem lesão por cardiotoxina ou quando são provenientes de animais distróficos, falham no processo miogênico. Ao invés disso, estas células se expandem rapidamente e dão origem a progenitores de fibroblastos ou adipócitos, prosseguindo nestas vias de diferenciação. Desta forma, os autores concluem que o dano muscular modifica as vias com as quais as células se comprometem, o que sugere um papel para as células SP na fibrose e substituição de tecido muscular por tecido adiposo e conjuntivo observada nas distrofias musculares.

Ainda abordando a composição das subpopulações celulares residentes no músculo, outro trabalho comparou células-satélite isoladas de cães GRMD com células-satélite isoladas de cães normais, quanto à variados parâmetros como identidade (expressão de Pax7), proliferação, diferenciação e estudo de motilidade celular (Berg et al., 2011). O isolamento foi realizado pela utilização de citometria de fluxo associada à cell-sorting usando anticorpo contra a molécula de superfície syndecan-4. Não foi possível identificar diferenças entre as populações isoladas. Este trabalho reforça a necessidade de mais marcadores para a correta identificação e isolamento das diferentes subpopulações celulares.

Scott e colaboradores (Scott *et al.*, 2013) conseguiram um avanço no isolamento de células-satélite humanas através de marcadores de superfície utilizados em citometria de fluxo. O grupo conseguiu isolar uma grande quantidade de células provenientes de tecido humano retirado após a morte do indivíduo. Estas células, selecionadas por serem positivas para CD56, foram então induzidas à diferenciação e analisadas quanto aos fatores miogênicos que expressavam, através da quantificação da expressão destes genes por PCR em tempo real. O interessante deste trabalho é a possibilidade de se retirar estas células em larga escala, especialmente para se estudar a miogênese, tanto em indivíduos normais quanto em indivíduos afetados, por exemplo, por distrofias musculares. As técnicas atuais, que se utilizam de biópsias para a realização destes estudos limitam os procedimentos realizados pelo tamanho reduzido do tecido retirado, o que também leva a um número limitado de células derivadas da biópsia.

ii. Divisão celular assimétrica

Um grupo canadense conseguiu comprovar a idéia de divisão celular assimétrica atribuída a estas células, utilizando animais geneticamente modificados onde a expressão de fatores miogênicos poderia ser rastreada por presença de β -Gal (Kuang et al., 2007). O grupo identificou um subgrupo de células-satélite que preferencialmente realiza a divisão celular de forma a repor o *pool* celular, enquanto que outra subpopulação está mais comprometida com a diferenciação e reparo das fibras, sendo progenitores comprometidos. Assim, os pesquisadores concluíram que a população de células-satélite na realidade é heterogênea e a divisão assimétrica é responsável por manter a auto-renovação e comprometimento das células que se dividem.

iii. Potencial regenerativo

Outro trabalho interessante avaliou o potencial regenerativo das células-satélite em pacientes com distrofia muscular de Duchenne (DMD) nos diversos estágios da doença (Kottlors e Kirschner, 2010). A quantidade de núcleos destas células foi medida e a expressão de marcadores de diferenciação nos pacientes foi testada. Os resultados indicaram que a quantidade de células-satélite nos pacientes com DMD é elevada em relação aos controles, mesmo nos estágios mais avançados da doença, sugerindo que a exaustão destas células não é a causa primária da falha na regeneração, sendo a diferenciação deficiente a provável causa do aparecimento e piora dos sintomas. Este trabalho reforça a idéia de que é possível que a falha na regeneração esteja envolvida com outras vias que não apenas a proliferação e diferenciação, tornando o estudo do perfil de expressão destas células ainda mais interessante.

Outro trabalho relaciona DMD e envelhecimento muscular, tentando encontrar os pontos em comum entre estas duas condições (Baron, Magot, *et al.*, 2011). O grupo divide a pesquisa em duas etapas: uma laboratorial, onde são realizados *microarrays* de amostras de DMD e indivíduos idosos. Em seguida, são realizados estudos de validação através da meta-análise de bancos de dados públicos. O estudo encontrou genes envolvidos em função mitocondrial e síntese proteica com expressão reduzida tanto na DMD quanto no envelhecimento. Assim, a disfunção mitocondrial pode ter um papel fundamental na degeneração das fibras, pela ativação de cascatas nas duas condições. Essa redução na expressão pode indicar uma “crise metabólica”, como reflexo pelo declínio crônico na função e homeostase muscular. Por outro lado, os genes super-expressos nas duas condições pertencem à família de proteínas relacionadas à adesão celular e matriz extracelular, além daqueles codificando para componentes de resposta imune.

iv. Estudos do perfil de expressão

Alguns trabalhos recentes trazem novidades no que se refere à análise de dados de *microarray* de expressão. A comparação da expressão gênica de tecidos normais com tecidos distróficos tem sido utilizada no estudo da patogênese de cada doença e na busca de alvos para drogas e biomarcadores da progressão da doença e do prognóstico dos tratamentos. Kotelnikova e colaboradores (Kotelnikova *et al.*, 2012) desenvolveram uma nova abordagem para a análise dos dados de expressão gênica que busca identificar quais os reguladores que podem estar envolvidos na expressão diferencial. Usando uma rede de regulação de expressão gênica derivada de literatura como fonte de anotação funcional de proteínas os autores conseguem identificar os fatores de transcrição e/ou proteínas responsáveis pelas diferenças na expressão. Mesmo que estes fatores de transcrição não estejam com a expressão alterada é possível identificá-los, isto é, localizar o membro *upstream* da cascata de sinalização envolvida. Os autores aplicaram esta nova abordagem no estudo da distrofia muscular de Duchenne (DMD) utilizando bancos de dados públicos e conseguiram identificar um painel de potenciais reguladores e biomarcadores de progressão e severidade, alguns já bem estabelecidos (vias de *NFKB*, *TGF β* , *IFNG*) e outros novos (*ZEB1*, *RUNX1*). O algoritmo utilizado para a identificação destes genes é proprietário, ou seja, parte integrante do software Pathway Studio, da empresa Ariadne Genomics.

Outro trabalho também desenvolve ferramentas importantes para a meta-análise de dados de *microarray* específicos de músculo (Baron, Dubois, *et al.*, 2011). Baron e colaboradores criaram um banco de dados que agrega todos os estudos públicos relacionados a músculo presentes no GEO (Gene Expression Omnibus), que foram organizados em grupos de genes co-expressos. O usuário pode navegar nos dados ou então comparar sua própria lista de genes com as listas do sistema criado, chamado de MADMuscle. A ferramenta está disponível na internet gratuitamente (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/madtools/home/>). Este banco de dados também agrega dados relacionados com várias condições fisiológicas, variando de normal a patológica (inclusive nas distrofias musculares como DMD).

Outra ferramenta desenvolvida alinha os perfis de expressão das amostras de teste com aquelas contidas nos bancos de dados públicos (Kilpinen, Ojala e Kallioniemi, 2011). Esta ferramenta mostra-se bastante robusta, sendo capaz de identificar corretamente o tecido de origem de uma determinada população celular. Seu ponto fraco, no entanto, é o fato de necessitar de um computador poderoso para fazer as análises. Quando aplicado a um grupo DMD em comparação a controles normais, o programa foi capaz de identificar mudanças de expressão no transcriptoma, que são críticas e causativas da doença, além de identificar alguns genes novos.

Uma importante conclusão que devemos ter ao analisar todos os artigos recém publicados envolvendo estudos de *microarray* em distrofias é a necessidade da meta-análise. Atualmente é de extrema importância o cruzamento dos dados obtidos no laboratório com os resultados de análises em bancos de dados públicos. A meta-análise pode inclusive validar resultados obtidos com pequeno número de amostras, embora não exclua a validação da expressão diferencial de alguns genes por *real-time PCR*.

Outro fato importante a se notar é o constante desenvolvimento de ferramentas para a análise dos dados. A maior dificuldade é sair da lista de genes para o real significado biológico das alterações observadas nos estudos de *microarray*. Além disso, é fundamental conectar os genes alterados em vias de sinalização e bioquímicas, para o melhor entendimento das cascatas e sua relação com as doenças estudadas.

v. Avaliação da expressão gênica nos animais distróficos

Em meu trabalho de mestrado, analisamos a expressão gênica de genes envolvidos na via miogênica (*Myod*, *Myf5*, miogenina) e relacionados à degeneração (pró-colágeno e *Tgfb1*) nos modelos *Dmd^{mdx}*, *Large^{myd}*, *Lama2^{dy2j}/J* e *SJL/J*, além do controle normal *C57Black* (Onofre-Oliveira *et al.*, 2009).

A análise da gene *Tgfb1* mostrou que, com exceção da linhagem *Large^{myd}*, sua expressão nos animais distróficos foi significativamente maior que nos controles, como já foi descrito para o modelo *Dmd^{mdx}* (Li, Mcfarland e Velleman, 2008; Yablonka-Reuveni *et al.*, 2008). Já a expressão do gene *Pcol* se mostrou significativamente elevada somente nos modelos *Dmd^{mdx}* e *SJL/J*, que são animais mais brandamente afetados. O modelo *Large^{myd}* apresentou valores positivos, porém não estatisticamente significantes. Já o grupo dos camundongos *Lama2^{dy2j}/J* apresentou uma redução nos níveis de expressão de *PCOL*, apesar do padrão de degeneração intenso observado na análise histológica.

Complementando estas observações, a quantificação do colágeno pela coloração de *picro-sirius* mostrou maior quantidade de tecido conjuntivo nos animais mais afetados *Large^{myd}* e *Lama2^{dy2j}/J* e menor infiltração nos animais com distrofias mais benignas *SJL/J* e *Dmd^{mdx}*. Estes resultados reforçam a hipótese de que aos 2 meses de idade o processo degenerativo nos animais com distrofias mais graves já está em fase mais avançada, com maior perda muscular e substituição das fibras degeneradas por tecido conjuntivo.

Esta relação inversa de expressão de genes da cascata de degeneração com o grau de afecção do músculo também foi observada quando comparamos 2 músculos diferentes do camundongo *Dmd^{mdx}*. O músculo gastrocnêmio mostrou alta expressão dos genes *Tgfb1* e *Pcol* enquanto o diafragma apresentou uma redução na expressão destes dois genes. Como no *Dmd^{mdx}* o padrão de degeneração do músculo diafragma é muito maior do que o do

gastrocnêmio (Ghedini *et al.*, 2008), este resultado corrobora a hipótese de que os genes da cascata de degeneração são mais expressos nos estágios iniciais do processo ou nos músculos mais preservados.

Em conjunto, estes resultados sugerem que enquanto o gene *Tgfb1* é ativado pelo processo distrófico em qualquer grau de degeneração, a ativação da expressão do gene *Pcol* ocorre nos estágios iniciais deste processo. Assim, na via de degeneração, os animais distróficos exibem um aumento de expressão de TGF- β 1, citocina que sinaliza para a substituição tecidual e ativação da cascata inflamatória (Gosselin *et al.*, 2004), que induz à expressão de *Pcol* (Li *et al.*, 2004).

A análise dos genes da cascata de regeneração mostrou grande variabilidade nos níveis de expressão dos diferentes modelos murinos. Considerando-se que estes genes são expressos pelas células-satélite do músculo, responsáveis pela regeneração deste tecido, o perfil de expressão observado pode refletir como estas células estão atuando nos respectivos músculos degenerados (Wagers e Conboy, 2005; Yablonka-Reuveni *et al.*, 2008). Alta expressão dos genes *MyoD* e *Myf5* refletem o comprometimento e proliferação das células-satélite, quando ativadas para iniciar o processo de regeneração. A miogenina é um importante indutor de diferenciação muscular, levando à fusão de mioblastos para a formação de miotubos diferenciados.

De um modo geral, a expressão de miogenina detectada nos modelos murinos *Dmd^{mdx}*, *Lama2^{dy2j/J}* e *Large^{myd}* foi compatível com a presença de grupos de pequenas fibras com características regenerativas, observadas na análise histológica nestes modelos.

Os valores baixos de expressão de *MyoD* e *Myf5* observados nos animais *SJL/J* sugerem que as células-satélite presentes nestes músculos estão quiescentes. A falta de expressão da miogenina confirma este resultado, pois não houve estímulo para a diferenciação destas células. Este resultado é compatível com o padrão histopatológico observado neste modelo, onde o músculo é muito preservado, sem evidências significativas de degeneração e consequente ativação da regeneração.

Já nos animais *Dmd^{mdx}* e *Lama2^{dy2j/J}* observamos aumento na expressão dos genes *MyoD* e *Myf5*, refletindo a ativação das células-satélite para a sua proliferação. Também foi observado aumento na expressão da miogenina, compatível com o estímulo para a diferenciação destas células. Nestes dois modelos, portanto, o processo degenerativo levou, de forma esperada, ao estímulo da cascata regenerativa.

Uma regeneração muito ativa já é bem descrita no modelo *Dmd^{mdx}*. O músculo destes animais exibe após a 3ª ou 4ª semana de vida uma elevação muito grande no número de fibras centronucleadas, que são consideradas fibras recém regeneradas (Dimario, Uzman e Strohman, 1991). Os nossos resultados no modelo *Lama2^{dy2j/J}* mostram que este padrão de degeneração seguida por um processo de regeneração também ocorre neste camundongo.

No camundongo *Large^{myd}*, que apresenta um padrão histopatológico muito semelhante ao camundongo *Lama2^{dy2j}/J*, observamos uma baixa expressão dos genes *MyoD* e *Myf5*, sugerindo baixa atividade proliferativa das células-satélite nestes animais (Yablonka-Reuveni *et al.*, 2008). Se os estímulos promovidos pelas fibras em degeneração atuam de forma similar na ativação da regeneração nos diferentes modelos distróficos, os resultados observados no modelo *Large^{myd}* podem sugerir uma falha na ativação e/ou capacidade de proliferação destas células neste modelo murino com defeito de glicosilação. De fato, estudos realizados em camundongo nocaute condicional para a expressão da proteína α -distroglicana (α -DG) mostraram que quando este gene é silenciado leva ao surgimento de um processo degenerativo muscular decorrente da deficiência desta proteína. Entretanto, curiosamente, estes músculos foram regenerados de forma muito rápida e eficaz, o que levou a uma análise mais detalhada das células-satélite destes animais. Verificou-se que a proteína α -DG se manteve funcional e, com isso, estas células mantiveram boa capacidade proliferativa e regenerativa, reparando o músculo lesionado. Estes resultados levaram os autores à sugestão de que um mecanismo de glicosilação da α -DG funcional constitui importante requisito para o bom funcionamento e renovação das células-satélite (Cohn *et al.*, 2002).

O balanço entre a capacidade degenerativa e regenerativa do músculo constitui ponto importante do processo distrófico onde as células-satélite desempenham um papel fundamental. Nossos resultados sugerem que há diferenças na expressão dos genes da via de degeneração dependendo do grau de afecção do músculo, pois o gene *Tgfb1* foi expresso no músculo distrófico independentemente do grau de comprometimento do tecido, enquanto o gene *Pcol* parece ser ativado nos estágios iniciais deste processo. A cascata de degeneração de cada via patofisiológica atuou de forma diversa na ativação da regeneração, com diferenças na indução da proliferação das células-satélite, mas sem alterações no estímulo à diferenciação. Defeitos em proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (DGC) poderiam, portanto, levar também a alterações específicas na capacidade de proliferação destas células, o que poderia resultar no processo de regeneração deficiente nos modelos envolvidos. Assim, a disfunção na população de células-satélite pode representar um mecanismo importante na patogênese da distrofia muscular (Onofre-Oliveira *et al.*, 2009).

Objetivos

Considerando as diferenças observadas nos modelos murinos estudados, quanto à indução da proliferação das células-satélite, mas sem alterações no estímulo à diferenciação, sugerimos que a cascata de degeneração de cada via patofisiológica pode atuar de forma diversa na ativação da regeneração (Onofre-Oliveira *et al.*, 2012). É importante, portanto, que se conheça melhor o perfil e a atuação das células-satélite no músculo dos diferentes modelos murinos distróficos.

Visto que os camundongos *Large^{myd}* e *Lama2^{dy2j/J}* possuem padrão de degeneração bastante semelhante, mas com diferenças no padrão de regeneração, estes modelos tornam-se interessantes para estudarmos as possíveis diferenças nos mecanismos de ativação e atuação das células-satélite no músculo distrófico.

Assim, os objetivos específicos deste projeto consistem em comparar os modelos *Large^{myd}* e *Lama2^{dy2j/J}* através de:

- Isolamento e caracterização por citometria de fluxo de suas populações de células-satélite quanto a expressão de marcadores de miogênese e de células-tronco pluripotentes.
- Estudo do perfil de expressão gênica destas células através de *microarray* de expressão.

Materiais e Métodos

1. Camundongos

Todos os animais foram mantidos em gaiolas com água e comida à vontade, em salas com temperatura e iluminação controlada até o momento do sacrifício, realizado por exposição à CO₂. Os experimentos aqui descritos foram aprovados pela comissão de ética do Instituto de Biociências, conforme documento anexo.

Os animais destinados aos cruzamentos foram mantidos em gaiolas apropriadas, na proporção de duas fêmeas para cada macho.

Para a obtenção do tecido animal, os diversos camundongos foram eutanasiados através de exposição ao CO₂, e os músculos gastrocnêmio e quadríceps foram dissecados.

a. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens de camundongos *B6.WK-Lama2^{dy2j}/J* (Meier e Southard, 1970), *Large^{myd}* (Grewal e Hewitt, 2002) e *C57Black6* (camundongo normal).

Os camundongos *Lama2^{dy2j}/J* (000524) e *Large^{myd}/J* (000226) foram importados do laboratório Jackson (www.jaxmice.org). Os animais *C57Black6* já eram criados em nosso centro. Todos os camundongos são atualmente mantidos em nosso próprio biotério e nos biotérios do IPEN e da Faculdade de Veterinária da USP (departamento de Patologia).

b. Genotipagem dos camundongos

Os camundongos tiveram seu DNA da cauda extraído através da incubação *overnight* com solução de extração (100mM Tris HCl, pH 8,5; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl) e proteinase K (10mg/mL), após serem identificados por marcações nas orelhas. O DNA extraído é então purificado pela adição de isopropanol.

No caso da linhagem *Lama2^{dy2j}/J*, o DNA extraído foi submetido a um PCR que amplifica um fragmento de 170pb, contendo a região com a mutação. Nesta linhagem a mutação cria um sítio de restrição para a enzima NDE1, portanto após a amplificação por PCR os fragmentos foram digeridos e aplicados em gel de acrilamida para sua visualização. Podem surgir fragmentos não digeridos, que se referem ao alelo normal ou dois fragmentos menores, já que o alelo mutado é cortado em dois pela enzima.

Os camundongos *Large^{myd}* são genotipados através de um PCR utilizando-se de dois pares de *primers*, um que amplifica um fragmento do alelo normal e outro que amplifica um

fragmento do alelo mutado. Da mesma forma, após a reação, aplica-se o produto amplificado em gel de agarose, que pode revelar um fragmento menor, referente ao alelo normal ou um fragmento maior, referente ao alelo portando a deleção. Esta divergência (alelo com deleção ser maior) deve-se ao desenho dos *primers* e seus produtos amplificados.

Tabela 1: Sequência de primers utilizados nas genotipagens das linhagens distróficas murinas utilizadas.

Nome	Sequência	Tamanho do produto
<i>Lama2^{dy2j}/J F</i>	5'- TTG CTT CGA ATG CAC TCA T - 3'	170pb
<i>Lama2^{dy2j}/J R</i>	5'- CTT TGA ACT TAA TGC AAT TTA GCC - 3'	
<i>Large^{myd} WT F</i>	5'- GGC CGT GTT CCA TAA GTT CAA - 3'	162pb
<i>Large^{myd} WT R</i>	5'- GGC ATA CGC CTC TGT GAA AAC - 3'	
<i>Large^{myd} MUT F</i>	5'- ATC TCA GCT CCA AAG GGT GAA G - 3'	421pb
<i>Large^{myd} MUT R</i>	5'- GCC AAT GTA AAA TGA GGG GAA A - 3'	

2. Cultura de células

Todo o material retirado dos animais foi coletado em DPBS (Gibco-Invitrogen) estéril suplementado com 4% de penicilina-estreptomicina (Gibco-Invitrogen). Os músculos foram então levados para ambiente estéril em fluxo laminar onde foram lavados duas vezes em DPBS com 4% de penicilina-estreptomicina e os tecidos conjuntivo, adiposo e vasos mais aparentes foram retirados com material cirúrgico estéril. Após este primeiro processamento, os músculos podem passar por diferentes protocolos de isolamento das células-satélite.

Todas as células foram cultivadas em frascos de cultura ou placas de petri estéreis contendo meio de cultura *Dulbecco modified Eagle medium* – DMEM, ou *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM / F-12) com 4 mM de L-Glutamina, ajustado para conter 1.5g/L de bicarbonato de sódio, 4.5g/L de glicose e 1.0mM de piruvato de sódio. A este meio adicionamos também os antibióticos penicilina e estreptomicina a 1% e aminoácidos não essenciais (NEAA - Invitrogen) 1X. Todo o material utilizado foi esterilizado por autoclavagem, por filtração em filtros de poro 0,22µm ou por irradiação e as células foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂.

As células foram observadas a cada dois dias em sua fase proliferativa. Nesta fase, quando observado que o frasco possuía aproximadamente 60-70% de confluência as células eram descoladas do frasco com tripsina por 5 minutos (TripLEExpress - Invitrogen), divididas em novos frascos e mantidas com meio de cultura fresco. Quando não havia confluência o meio de cultura apenas era trocado.

Uma parte destas células foi congelada em soro fetal bovino com 10% de DMSO e mantida em nitrogênio líquido.

Testamos dois diferentes protocolos para avaliar a eficiência da separação das células.

a. Método do explante

Neste método (Rando e Blau, 1994), utilizado rotineiramente em nosso laboratório, as células-satélite foram isoladas a partir de sua habilidade de migrar do tecido muscular para a superfície da garrafa de cultura. Os músculos limpos foram picotados com bisturi até atingir pedaços de não mais que 1mm^3 . Cada pequeno pedaço de músculo foi colocado em garrafas de cultura celular preparadas anteriormente com uma fina película de soro fetal bovino para que o músculo permanecesse aderido à garrafa. Após dois dias as garrafas contendo os fragmentos musculares foram preenchidas com 5mL de meio de cultura DMEM (LGC) suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina, 1% L-Glutamina (Sigma – 200mM), 1% de Non-Essential Amino Acids (NEAA-Gibco-Invitrogen) e 20% de soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen). Após três dias do início da migração das células do fragmento para a superfície da garrafa de cultura as células foram tripsinizadas (TriPLE Express, Invitrogen) e plaqueadas em outra garrafa contendo meio de cultura suplementado. As células foram mantidas em concentração abaixo da confluência para evitar a diferenciação induzida por contato.

b. Método da digestão

Outro teste realizado foi o do isolamento através de digestão e posterior *pre-plating* para purificação das células através de seus diferentes tempos de adesão (Li, Pan e Huard, 2010). Na técnica de digestão, as garrafas de cultura foram preparadas 24 horas antes dos procedimentos com Matrigel (BD) diluído 1:500 em 5mL de DMEM sem soro ou antibiótico. Os músculos limpos foram picotados grosseiramente com bisturi estéril até os pedaços não excederem 1mm^3 . Em seguida o material foi colocado em uma solução estéril contendo 15mL de meio DMEM, 0,03g de colagenase tipo II (Sigma) e 4% de penicilina-estreptomicina. Os fragmentos foram incubados a 37°C , 80RPM, durante 30 minutos. O produto da digestão foi então centrifugado (300g, 4°C , 10 min) e colocado em uma segunda solução, contendo 15mL de meio DMEM, 0,04g de colagenase tipo II, 2mL de tripsina, 2mL de DNase (Sigma – 1mg/mL) 1% de penicilina-estreptomicina. O material foi incubado nesta solução por 20 minutos a 37°C , 80RPM. Foram então adicionados 15mL de meio DMEM suplementado (1% de penicilina-estreptomicina, 1% L-Glutamina, 1% NEAA, 20% de soro fetal bovino) e o material foi centrifugado à 300g, 4°C , 10 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e todo o material sedimentado foi ressuspenso em meio DMEM suplementado. Após uma nova centrifugação (300g, 4°C , 5 min) o material foi ressuspenso novamente em DMEM suplementado e as

células foram dissociadas das fibras mecanicamente, passando o material diversas vezes de maneira gentil em uma pipeta pasteur descartável.

Nesta etapa é possível purificar o produto da digestão passando todo o material por um filtro de 100 ou 60 μ M (Steriflip – Millipore) ou esperando por alguns minutos o material maior, não digerido, decantar no fundo do tubo de centrifugação. Nesta etapa é realizado o *pre-plating*.

As células foram mantidas em concentração abaixo da confluência para evitar a diferenciação induzida por contato.

i. Técnica de *pre-plating*

Para a purificação da linhagem celular obtida através de *pre-plating* o sobrenadante obtido na técnica de digestão foi passado para uma garrafa de cultura com Matrigel denominada PP1 (*pre-plating* 1), que ficou na estufa durante 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi colocado em uma nova garrafa (PP2) e a garrafa anterior foi preenchida com DMEM suplementado. Após esta primeira passagem, o sobrenadante foi removido para uma nova garrafa contendo Matrigel a cada 24 horas, até o *pre-plating* desejado.

c. Método da fibra única

Para o isolamento das células-satélite ainda quiescentes, testamos o protocolo de isolamento de fibra única (Rosenblatt *et al.*, 1995). Nesta técnica os músculos limpos foram cortados no sentido das fibras musculares e colocados em solução estéril contendo 15mL de meio DMEM, 0,03g de colagenase tipo II (Sigma) e 4% de penicilina-estreptomicina à 37°C, 80RPM, durante uma hora e meia a duas horas. Fragmentos pequenos de fibras foram então colocados em placas de petri previamente cobertas com soro fetal bovino, para evitar a adesão do material, e sob microscopia óptica as fibras isoladas foram separadas com material cirúrgico estéril. Após a separação de algumas fibras intactas, estas foram colocadas em estufa em meio de cultura suplementado.

d. Cultura de células C2C12

As células C2C12, disponíveis comercialmente e adquiridas do *Cell Bank* da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em concentração abaixo da confluência para evitar a diferenciação induzida por contato.

3. Citometria

Todos os estudos de citometria foram realizados no mínimo em duplicatas técnicas e os resultados apresentados são a média dos valores de intensidade de fluorescência. Nos ensaios utilizando marcadores miogênicos foram realizados 5 ensaios para cada amostra. Realizamos as citometrias em amostras provenientes de 2 diferentes indivíduos de cada uma das populações de células isoladas.

Para a fenotipagem das células com relação aos marcadores de membrana que expressam, realizamos ensaios de citometria de fluxo. Para estes ensaios, é necessário que as células estejam em suspensão de células únicas, isoladas umas das outras. Assim, parte das células que foram expandidas para os estudos de expressão gênica foi separada, contada, centrifugada, ressuspensa em um pequeno volume de DPBS e 100µL da suspensão contendo as células foram transferidos para tubos de 1,5mL. O ideal é que as células estejam em uma concentração final próxima a 2×10^7 céls/mL. A esta suspensão foram adicionados os anticorpos marcados com fluorocromos de interesse. As células permanecem incubando com os anticorpos por 1h a 4°C. São então lavadas com PBS para finalmente serem aplicadas e lidas em citômetro de fluxo.

a. Marcadores utilizados:

i. CD13-PE (BD), CD29-PE (Biolegend), CD31-PE (abcam), CD44-PE (abcam), CD45-PerCP-Cy5.5 (BD), CD90-PE (abcam), CD105-PE (Biolegend). Marcadores de células-tronco mesenquimais.

ii. CD29-Alexa700 (Biolegend), CD90-APC-Cy7 (Biolegend), CD105-PE-Cy7 (Biolegend), CD133-PE (Biolegend), CD44-PE-Cy5 (BD), CD56-APC (abcam), CD73-Alexa647 (Biolegend), Sca1-APC (abcam), CXCR4-Alexa647 (Biolegend). Marcadores relacionados com células-satélite e/ou células com origem muscular.

4. Estudos de expressão gênica

a. Extração e purificação de RNA

A técnica de extração de RNA utilizada para posterior análise através de *microarray* de expressão é fundamental para o sucesso do experimento. A pureza e qualidade do RNA obtido

deve ser máxima para que a quantificação da expressão ocorra de maneira correta e reprodutível.

Partindo de garrafas de cultivo celular de 75mm² utilizamos o kit de extração Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel). Com este kit é possível fazer tanto a extração quanto a purificação do RNA total extraído das células.

Uma solução de 350 µL de tampão de lise contendo 3,5µL de β-mercaptoetanol foi adicionada às células previamente tripsinizadas. O tampão possui íons que inativam possíveis RNAses e cria condições favoráveis a ligação do RNA à membrana de sílica. Em seguida o lisado foi filtrado de partículas maiores em filtro mecânico. Foram adicionados ao líquido filtrado 350 µL de etanol 70% e então o lisado foi passado por uma coluna de sílica através de centrifugação (11.000g, 30 seg). O DNA contaminante foi removido pela ação de uma DNase fornecida juntamente com o kit. As lavagens sucessivas removem sais, metabólitos e macromoléculas. O RNA purificado foi eluído com água livre de RNAses.

Utilizando este protocolo foi possível obter 300ng/µL de RNA total, quantidade mais do que suficiente para os experimentos de *microarray* posteriores (são necessários pelo menos 100ng de RNA).

b. *Microarray*

O primeiro passo para o processamento do RNA é sua quantificação, realizada através da leitura no espectrofotômetro Nanodrop. Além disso, o RNA extraído é avaliado quanto à qualidade, medida na razão obtida após a quantificação, onde A260/A280 deve estar entre 1,7 e 2,1. Avaliamos também a integridade do RNA, observando as bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Devemos conseguir visualizar as bandas 28S e 18S claramente, sem arrasto, e a banda do 28S deve ser duas vezes mais intensa que a do 18S.

O RNA quantificado é então diluído para 250ng de RNA em um volume de 3µL de água livre de RNAses.

Para a preparação das amostras utilizamos o kit WT Expression Kit (Ambion). Este kit possui dois controles de qualidade. O primeiro, fornecido no kit, é uma amostra de RNA que deve produzir >20µg de cRNA e >6µg de cDNA de 2º ciclo. Outro controle utilizado é o poly-A, um conjunto de marcadores que são lidos nas lâminas. A preparação destes controles é feita antes da primeira reação de cDNA.

O RNA previamente diluído é adicionado aos controles poly-A e a primeira fita de cDNA é preparada, segundo a reação abaixo:

Tabela 2: Reação de cDNA de primeira fita.

Componente	V (µl)	Termociclador (tampa aquecida)	
RNA	5	1 hora	25°C
1st strand buffer mix	4	1 hora	42°C
1st strand enzyme mix	1	No mínimo 2 minutos	4°C
Total Volume	10		

Os tubos provenientes desta reação devem ser colocados 2 minutos no gelo, para que resfriem. Em seguida, é sintetizada a 2ª fita de cDNA:

Tabela 3: Reação de cDNA de segunda fita.

Componente	V (µl)	Termociclador (tampa aquecida desativada ou aberta)	
1st. strand cDNA	10	1 hora	16°C
nuclease-free water	32,5	10 minutos	65°C
2nd strand buffer mix	12,5	No mínimo 2 minutos	4°C
2nd strand enzyme mix	5		
Total Volume	60		

Em seguida passam para a etapa de transcrição, que irá sintetizar cRNA:

Tabela 4: Reação de cRNA.

Componente	V (µl)	Termociclador (tampa aquecida)	
2nd strand cDNA	60	16 horas	40°C
IVT buffer mix	24	No mínimo 2 minutos	4°C
IVT enzyme mix	6		
Total Volume	90		

Em seguida as amostras passam por um protocolo de purificação, realizado através da ligação das amostras à microesferas metálicas, que são depois lavadas e recolhidas com o uso de uma placa magnética. As amostras são eluídas com o uso de 40µL de solução de eluição (fornecida no kit) e mantidas no gelo. O cRNA deve ser então quantificado novamente no Nanodrop. Para a reação seguinte é necessário 10µg de cRNA em 22µL de água, ou seja, as concentrações devem estar acima de 455ng/µL.

Se as amostras estiverem na concentração correta são diluídas e adicionamos 2µL de Random Primers a cada uma delas. São então colocadas em termociclador com tampa aquecida por 5 minutos a 70°C, 5 minutos a 25°C e no mínimo 2 minutos a 4°C. Em seguida, passamos à preparação do cDNA de 2º ciclo, conforme tabela abaixo:

Tabela 5: reação de cDNA de segundo ciclo.

Componente	V (µl)	Termociclador (tampa aquecida)	
cRNA + random primers	24	10 minutos	25°C
2nd-cycle buffer mix	8	90 minutos	42°C
2nd-cycle enzyme mix	8	10 minutos	70°C
Total Volume	40	No mínimo 2 minutos	4°C

As amostras são então colocadas novamente em termociclador com tampa aquecida por 10 minutos a 25°C, 90 minutos a 42°C, 10 minutos a 70°C e no mínimo 2 minutos a 4°C. Em seguida passamos a etapa de hidrólise, adicionando 2µL de RNase H a cada uma das amostras, que é então colocada em termociclador com tampa aquecida por 45 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C e no mínimo 2 minutos a 4°C. Este cDNA de segundo ciclo (ss-cDNA) é então purificado seguindo o mesmo protocolo com as microesferas metálicas. Após a purificação as amostras são novamente quantificadas e diluídas a 220ng/µL em um volume de 31,2µL.

As amostras diluídas são então fragmentadas, segundo a tabela abaixo:

Tabela 6: Reação de fragmentação de ss-cDNA.

Componente	V (µl)	Termociclador (tampa aquecida)	
ss-cDNA diluído	31,2	1 hora	37°C
RNase free water	10	2 minutos	93°C
10x cDNA Frag buffer	4,8	No mínimo 2 minutos	4°C
UDG 10U/uL	1		
APE 1, 1000U/uL	1		
Total Volume	48		

45µL desta reação são transferidos para um novo tubo para o prosseguimento do processamento. O restante é aplicado em gel de agarose 2% para verificação da fragmentação, que deve produzir um arrasto entre 40 e 70 nucleotídeos.

Após a verificação da qualidade da fragmentação as amostras passam para a etapa de marcação do cDNA:

Tabela 7: reação de marcação do cDNA.

Componente	V (µl)	Termociclador (tampa aquecida)	
Frag ss-cDNA	45	1 hora	37°C
5X TdT Buffer	12	10 minutos	70°C
TdT	2	No mínimo 2 minutos	4°C
DNA label Reagent, 5mM	1		
Total Volume	60		

Nesta etapa o cDNA está pronto para ser hibridado nas lâminas de *microarray*, que são então identificadas e equilibradas à temperatura ambiente. As amostras são acrescidas de controles de hibridação:

Tabela 8: reação de hibridação

Componente	V (μ L)	Termociclador (tampa aquecida)	
Frag and label DNA target	27	5 minutos	99°C
control oligo B2 (3nM)	1,7	5 minutos	45°C
20x Euk Hybr Controls	5		
2X hybridization mix	50		
DMSO	7		
Nuclease free water	9,3		
Total volume	100		

Após esta rápida reação, 80 μ L das amostras são aplicados nas lâminas, colocadas então em forno de hibridação a 45°C, 60RPM, durante 17 \pm 1 horas. No dia seguinte, as lâminas são lavadas e marcadas na estação fluídica (Affymetrix) e em seguida são escaneadas.

Os dados gerados são então pré-analisados para verificação de erros de pipetagem, hibridação e operação, partindo-se da avaliação dos controles fornecidos no próprio kit (poly-A, controles de hibridação, sinal das sondas, entre outros).

5. Softwares utilizados

Para a pré-análise dos dados utilizamos o software Expression Console (Affymetrix). Neste software é possível verificar os controles de qualidade dos *microarrays* e realizar a normalização dos dados com o uso do algoritmo RMA (*Robust Multi-array Average*).

Após esta pré-análise os dados normalizados são então tratados no MeV (*MultiExperiment Viewer*)(Saeed *et al.*, 2003; Saeed *et al.*, 2006) com o uso do algoritmo SAM (*Significance Analysis of Microarrays*). Este teste identifica os genes diferencialmente expressos através de uma análise estatística derivada do teste *t*, desenvolvida especificamente para uso com os dados de *microarray*. Esta análise usa estatística não-paramétrica, visto que os dados podem não seguir uma distribuição normal. Neste método, permutações repetidas dos dados são usadas para determinar se a expressão de qualquer gene é significativa, relacionando-a à expressão dos outros genes. O uso das permutações evita que sejam assumidas distribuições paramétricas dos genes individualmente, o que representa uma vantagem com relação a outros algoritmos (como ANOVA e Bonferroni), que assumem variância igual e/ou independência dos genes (Tusher, Tibshirani e Chu, 2001).

Com a lista dos genes diferencialmente expressos selecionados é possível também realizar o estudo das prováveis vias relacionadas a eles com o uso do software IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com).

As análises do PCR em tempo real foram feitas no software 7500 Software v2.0.6, fornecido pela Life Technologies. As análises estatísticas destes experimentos foram realizadas utilizando o Minitab 16.

6. PCR em tempo real (*Real-time PCR - Q-PCR*) – Quantificação Relativa

Utilizando das mesmas amostras de RNA que foram extraídas para aplicação nos *microarrays*, sintetizamos cDNA pelo protocolo da enzima MMLV (Invitrogen), seguindo-se então para o protocolo de Q-PCR conforme descrito em Gosselin, 2004 (Gosselin *et al.*, 2004). As amostras de cDNA foram aplicadas em triplicata em placa de 96 poços. A cada amostra foi adicionado o par de primers do gene de interesse e o MasterMix contendo Sybr Green (Applied Biosystems), num volume total de 25 μ L. Cada placa foi corrida no termociclador para Real-Time 7500 Fast da Applied Biosystems / Life segundo o seguinte programa:

Tabela 9: Programa seguido pelo equipamento de PCR em tempo real.

Perfil de Ciclagem Térmica			
Etapa	Repetições	Temperatura	Tempo
1	1	50.0 °C	2 minutos
2	1	95.0 °C	10 minutos
3	40	95.0 °C	15 segundos
		60.0 °C	1 minuto

Para a quantificação relativa, é necessário que seja feita uma curva-padrão para cada gene estudado, onde será calculada a eficiência daquela reação. Esta curva-padrão determina o limiar (*threshold*), valor arbitrário de sinal de fluorescência para que seja possível a determinação do Ct (ciclo onde é medida a fluorescência em cada reação). O limiar deve estar acima da linha basal de fluorescência e suficientemente baixo para estar na região de crescimento exponencial da região de amplificação de uma curva de amplificação por PCR. O limiar é a linha cuja intersecção com a curva de amplificação define o Ct para cada reação. Para nossas análises decidimos deixar o programa localizar o melhor limiar em nossa curva padrão, e este valor foi utilizado nas análises posteriores. O programa busca o valor ideal onde a eficiência de amplificação dos primers é próxima a 100%.

O Ct para uma curva de amplificação específica depende de dois fatores: número de cópias inicial da amostra (*template*) e eficiência da amplificação pelo sistema de PCR. Em seguida, o programa calcula o Δ Ct, que é a diferença entre a média das triplicatas do Ct de um gene alvo e a média das triplicatas do Ct do gene endógeno:

$$\Delta C_T = C_T(\text{amostra}) - C_T(\text{controle endógeno})$$

Em seguida, o programa calcula o $\Delta\Delta C_T$, que é a diferença entre a média dos ΔC_T de uma amostra alvo com a média dos ΔC_T de uma amostra chamada de calibrador, que será a unidade de expressão:

$$\Delta\Delta C_T(\text{test sample}) = \text{Média } \Delta C_T(\text{test sample}) - \text{Média } \Delta C_T(\text{calibrator sample}).$$

E este valor é utilizado para calcular o valor da expressão:

$$\text{Valor de expressão} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

O valor final dá o nível de expressão para cada gene relativo ao nível de expressão na amostra calibradora. O software do equipamento mostra os resultados das quantificações relativas numa escala logarítmica onde cada incremento corresponde a uma diferença de 10 vezes na expressão gênica. Os valores obtidos foram comparados quanto à sua significância estatística com o auxílio do programa Minitab. O teste realizado foi o não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para a validação dos experimentos de *microarray*, realizamos a quantificação relativa da expressão gênica do gene *Largemyd* nas três linhagens estudadas, em todos os indivíduos onde foi realizado o experimento de *microarray*. Abaixo estão as sequências dos pares de *primer* utilizados para a amplificação dos fragmentos dos genes estudados.

Tabela 10: Sequência de primers utilizados para validação por Q-PCR dos experimentos de *microarray* de expressão.

Nome	Sequência	Tamanho do produto
<i>Gapdh F</i>	5' - AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG - 3'	123pb
<i>Gapdh R</i>	5' - TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA - 3'	
<i>Large F</i>	5' - CAC CTG TAC TTC CTG CAC TAC GA - 3'	108pb
<i>Large R</i>	5' - CAG ATG GCC TC CAG CAT CTG - 3'	

As amostras foram agrupadas conforme sua linhagem e verificamos se os dados obtidos via Q-PCR estavam concordantes com os dados obtidos nas análises dos *microarrays*.

Resultados

1. Extração de células-satélite

Testamos os diferentes protocolos de extração das células-satélite que obtivemos, inicialmente buscando investigar qual destes protocolos viabilizaria a produção de maior quantidade de células, no menor tempo possível, sem afetar sua qualidade. Abaixo, algumas imagens do material resultante dos dois métodos testados, em diferentes dias após a implantação - após 10 dias, no método do explante e após 2 dias, no método da digestão.

a. Método do explante

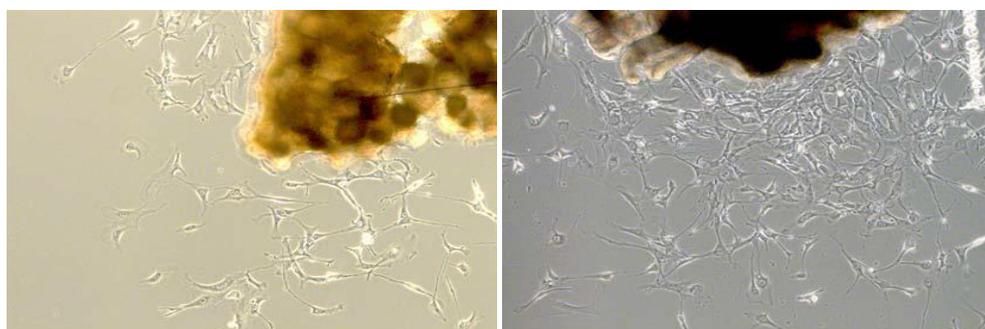


Figura 9: Células-satélite migrando de fragmentos musculares para a garrafa de cultura após **10 dias**. Aumento: 50x.

b. Método da digestão

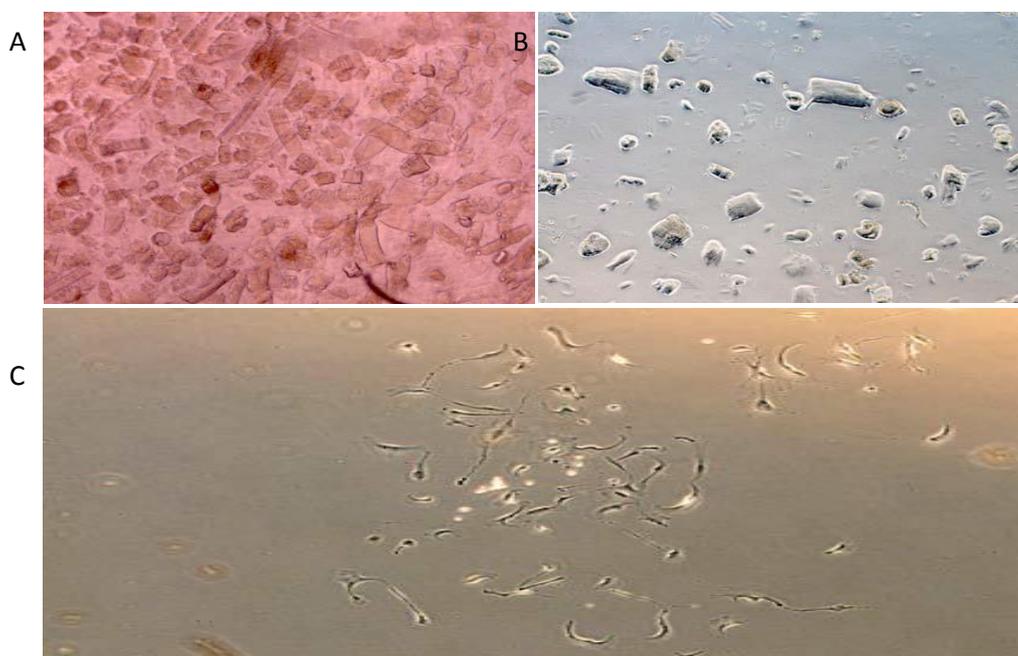


Figura 10: Células-satélite isoladas através do método da digestão. A- Produto da primeira digestão com colagenase II. B- Material ainda em suspensão após a solução decantar por alguns minutos, composto de restos de fibras musculares e células-satélite individualizadas. C- Colônia de células-satélite após **2 dias** da implantação do material. Aumento: 50x.

Conseguimos desta forma isolar células com características morfológicas de mioblastos com ambas as metodologias, embora seja possível notar que com o método da digestão conseguimos um maior número de células num período de tempo menor. Em contrapartida, com o método do explante existe uma chance menor de surgirem células contaminantes, não pertencentes à linhagem dos mioblastos, já que a técnica se aproveita da característica migratória das células-satélite. Optamos por realizar nossos estudos com as células obtidas através do método da digestão.

Tendo em vista a possibilidade de uma contaminação com outros tipos celulares residentes no músculo, decidimos realizar uma purificação das culturas através de *pre-plating*.

i. Pre-plating

Na população de células obtidas pós-digestão do fragmento muscular, segundo Li e colaboradores, as diferentes linhagens celulares aderem à placa na seguinte ordem de tempo: nas primeiras 24h os principais tipos celulares a aderir são principalmente miofibroblastos (aderem rapidamente, nas primeiras 2h), fibroblastos e mioblastos (PP1). Mais lentamente aderem as células-satélite (PP2 - Figura 11) e por fim as células-tronco derivadas de tecido muscular, após PP6; ou seja, após 6 passagens de 24 horas (Li, Pan e Huard, 2010).

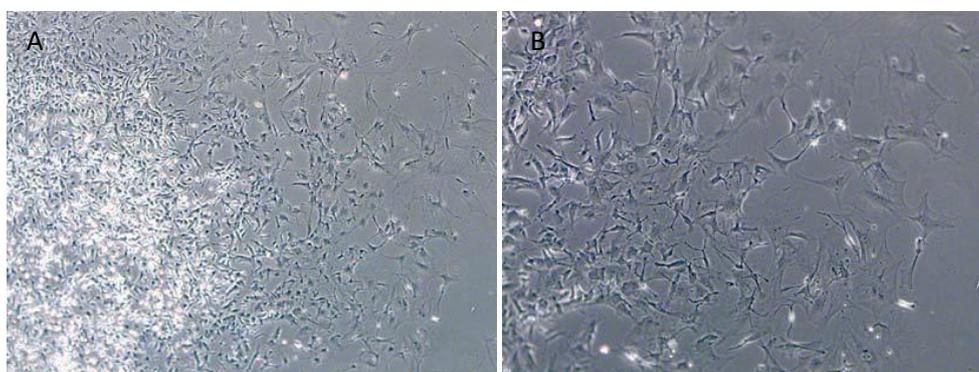


Figura 11: Células-satélite isoladas através do método da digestão seguido por *pre-plating*. Aumento: A-50x e B-100x.

É possível identificar pequenas diferenças morfológicas nas células isoladas através da técnica de *pre-plating*, porém também caracterizamos as diferentes populações isoladas através de citometria de fluxo com marcadores de superfície celular. Utilizamos o PP2 para nossos ensaios e comparamos com as células isoladas em PP1 e em PP6, como mostraremos abaixo.

c. Método da fibra única

Inicialmente imaginamos também poder trabalhar com as células-satélite quiescentes. Com as técnicas de extração acima, só é possível a obtenção de células-satélite ativadas. Para o

isolamento das células-satélite ainda quiescentes, testamos o protocolo de isolamento de fibra única (Rosenblatt *et al.*, 1995).

Após a separação de algumas fibras intactas, estas foram colocadas em estufa em meio de cultura suplementado e buscamos através de microscopia óptica algumas fibras com células-satélite aderidas.

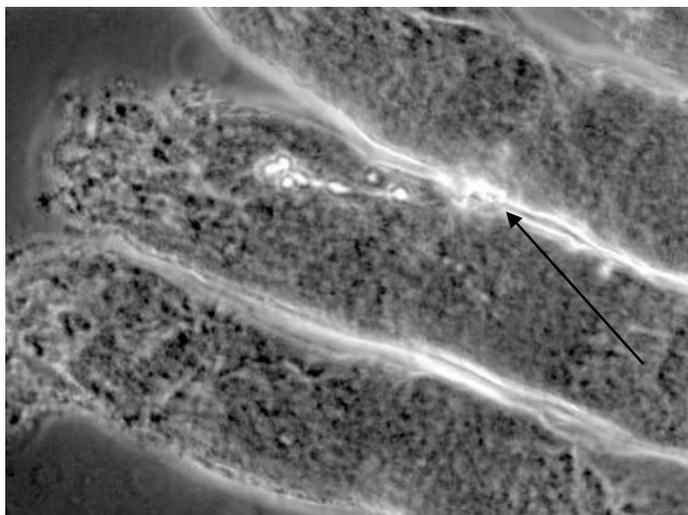


Figura 12: Fragmento de feixe de fibras mostrando na seta provável célula-satélite, de acordo com sua localização, intimamente ligada à fibra muscular. Aumento: 100x.

Com a utilização desta técnica foi possível visualizar células-satélite quiescentes aderidas às fibras musculares isoladas (Figura 6A e 6B), caracterizadas como tal por sua localização. Entretanto, não foi possível que estas fibras e as células quiescentes a elas aderidas se mantivessem viáveis por um período de tempo maior que algumas horas em cultura sem tornarem-se ativas. Além disso, a quantidade de células obtida foi pequena e insuficiente para os estudos de expressão mantendo-as quiescentes.

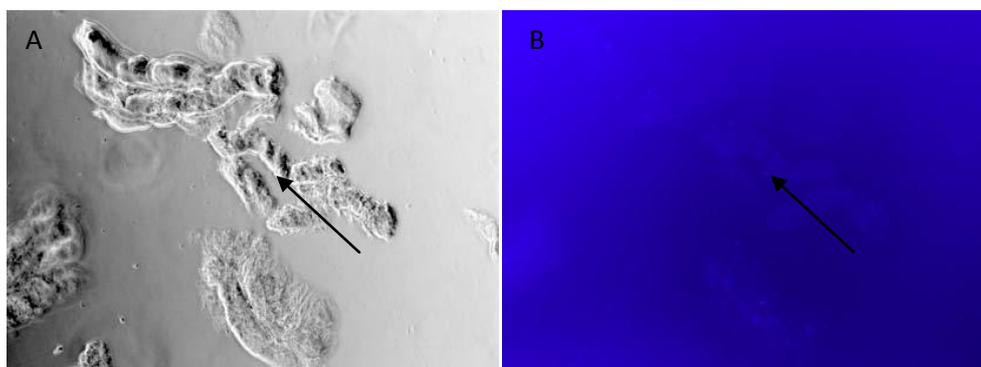


Figura 13: Fibras musculares isoladas com células-satélite aderidas. A- microscopia óptica com contraste de fase B- núcleos corados com DAPI. Na seta, uma célula-satélite quiescente. Aumento: 50x.

2. Caracterização fenotípica e identificação de subpopulações

Pudemos avaliar as células isoladas através dos métodos acima descritos quanto aos marcadores de superfície celular relacionados com pluripotência (BM-MSC – células tronco mesenquimais de medula óssea) e comprometimento com a via de diferenciação muscular (células C2C12). Pudemos também comparar PP1 e PP2 quanto a estes diferentes marcadores. As alíquotas das células separadas para esta caracterização são marcadas com anticorpos conjugados a flúoróforos e analisadas em citômetro de fluxo. Após a contagem de pelo menos 5000 eventos os resultados são apresentados pelo equipamento na forma de gráficos e a porcentagem de células marcadas é fornecida pelo aparelho.

a. Verificação de características mesenquimais

Com este painel de marcadores é possível verificar a presença de características fenotípicas semelhantes às apresentadas por células mesenquimais:

Tabela 11: Citometria de fluxo de amostras em PP1 e PP2. Nas colunas, as diferentes amostras e nas linhas os diferentes marcadores. CTRL - Controle não marcado. Abaixo, os valores em porcentagem de células positivas para cada um dos marcadores. A célula BM-MSC é controle do perfil exibido por uma célula sabidamente mesenquimal.

	BM-MSC	BL-PP1	BL-PP2	2J-PP1	2J-PP2	LG-PP1	LG-PP2
CTRL							
CD31							
CD44							
CD45							
	BM-MSC	BL-PP1	BL-PP2	2J-PP1	2J-PP2	LG-PP1	LG-PP2
CD31	0,05	1,76	0,08	0,00	5,32	0,02	6,92
CD44	94,64	40,42	69,36	52,02	39,28	99,14	98,03
CD45	6,92	16,12	11,54	3,22	5,08	1,44	0,76

Foram feitas as caracterizações de 6 linhagens celulares, tanto isoladas em PP1 quanto em PP2. Consideramos como variação quando os valores encontrados diferiam em mais de 25%; abaixo desta margem, consideramos dois dados como iguais.

A comparação de PP1 com PP2 mostrou, no músculo normal, um aumento de células CD44+ em PP2 (42%). Já nas duas linhagens distróficas, o padrão de marcação foi similar em PP1 e PP2.

O padrão de marcação dos 3 CDs avaliados nas linhagens BM-MSD, foi compatível com o esperado para células tronco mesenquimais. Este mesmo padrão foi encontrado na linhagem LG, mas não na linhagem normal *C57Black6* e *Lama2^{dy2J}/J* que mostraram marcação mais reduzida para CD44.

b. Verificação de características relacionadas à miogênese

Além disso, outros marcadores foram selecionados e testamos a homogeneidade das populações isoladas nas diferentes linhagens, além de comparar com o perfil de uma célula sabidamente muscular - C2C12. O resultado obtido pode ser visto na tabela 12.

Tabela 12: Citometria de fluxo de amostras de C2C12, BM-MSD, PP1 e PP2, de animais *C57black6*, *Lama2^{dy2J}/J* e *Large^{myd}*. Nas linhas os diferentes marcadores. Os valores dão a porcentagem de células positivas para cada um dos marcadores. Os valores são a média de 5 experimentos

	<i>C57Black</i>		<i>Lama2^{dy2J}/J</i>		<i>Large^{myd}</i>		
	C2C12	BL-PP1	BL-PP2	2J-PP1	2J-PP2	LG-PP1	LG-PP2
CD29	85,69	49,72	51,83	65,78	39,98	59,98	51,99
CD133	47,33	36,76	37,72	33,76	27,78	43,8	31,11
CD73	51	39,5	41	63,1	35,3	54,2	45,2
CD56	21,45	8,6	29,45	12	17,6	17,8	23,8
SCA1	41,95	30,6	36,7	61,8	36,45	43,1	42,95
CXCR4	50,1	40,8	39,95	56	29	51,9	45,35
CD44	41,25	44,5	41,6	62	34,8	49,5	49
CD31	0,12	1,76	0,08	0	5,32	0,02	6,92
CD13	7,64	14,18	9,48	9,56	14,88	3,42	11,92
CD45	1	16,12	11,54	3,22	5,08	1,44	0,76

A comparação de PP1 com PP2 mostrou o mesmo padrão no músculo normal, à exceção do marcador CD56, que apresentou um aumento de 3X em PP2. Na linhagem *Large^{myd}*, não houve diferenças entre PP1 e PP2. Já na linhagem 2J *Lama2^{dy2J}/J*, a população de células em PP1 mostrou um aumento nos valores de marcação de 6 marcadores miogênicos: CD29 (40%), CD73 (40%), SCA1 (40%), CXCR4 (48%) e CD44 (44%). Isto pode ser melhor evidenciado pela figura 14, com a representação gráfica dos dados da tabela 12.

Comparando com o padrão observado nas células C2C12, em PP2, todas as linhagens mostraram um padrão similar, com exceção do marcador CD29. Já em PP1, as linhagens *C57Black6* e *Large^{myd}* comportam-se da mesma forma. A população de células PP1-*Lama2^{dy2J}/J*, por sua vez, não se assemelha ao padrão apresentado por C2C12, constituindo de uma população diferente das outras estudadas.

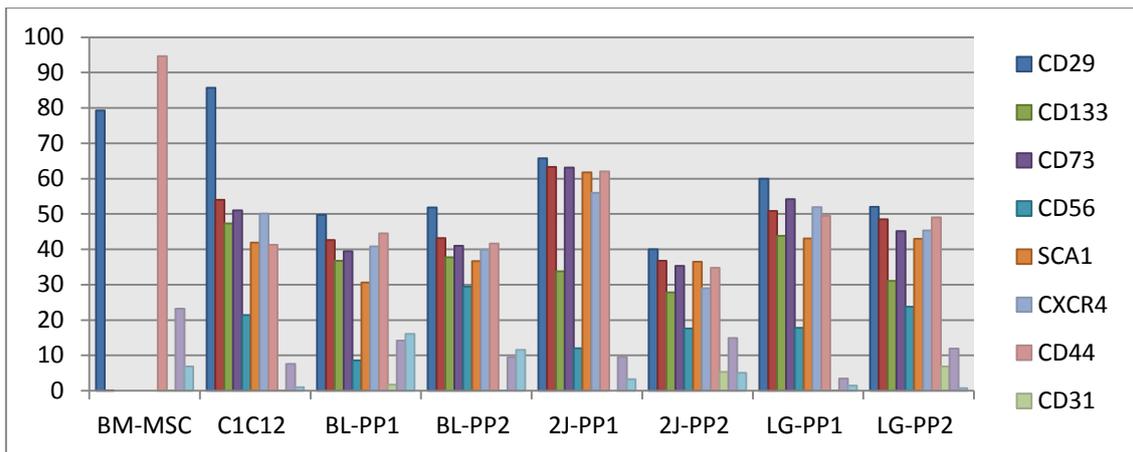


Figura 14: Padrão de expressão de marcadores de superfície nas populações das linhagens celulares estudadas.

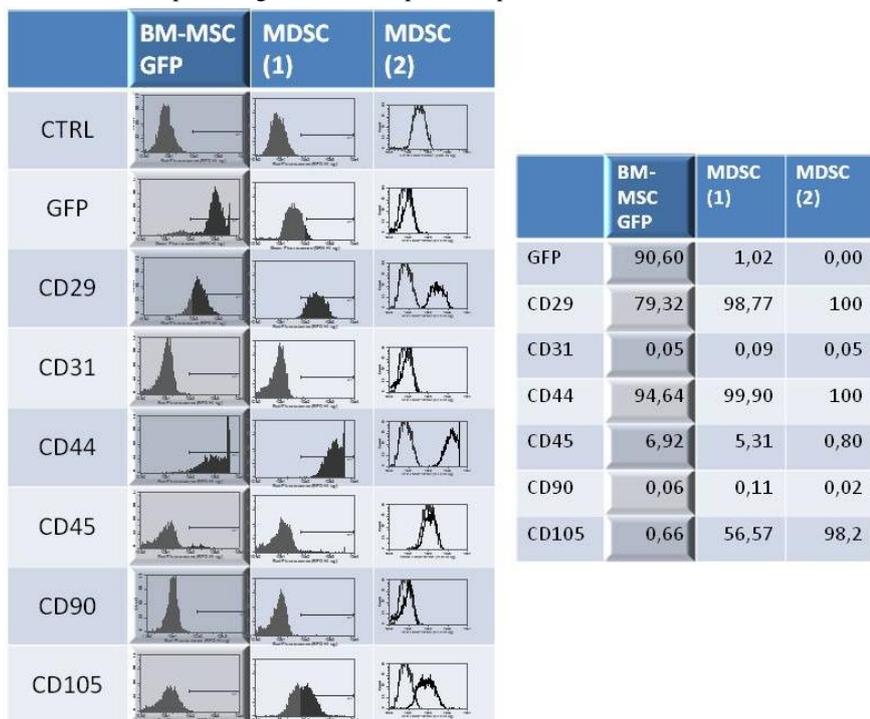
Conforme os dados de literatura (Beauchamp *et al.*, 2000; Helgason e Miller, 2005; Wagers e Conboy, 2005; Li, Pan e Huard, 2010) que confirmam a contaminação por outros tipos celulares em PP1, optamos por trabalhar apenas com as amostras obtidas em PP2 ou posteriores.

c. PP6 - Muscle Derived Stem Cells - MDSC

Conforme já descrevemos anteriormente, se prosseguirmos na técnica de *pre-plating* por mais tempo, re-semeando o sobrenadante de garrafa após cada 24h, após o PP6 teremos isolado células cuja capacidade de adesão à garrafa é menor e portanto permanecem um grande tempo em suspensão. Estas células isoladas são células tronco residentes no músculo, as chamadas *muscle-derived stem cells*. Estas células são mais indiferenciadas que as células-satélite, são descritas como pluripotentes e auto-renováveis.

Comparamos o perfil fenotípico apresentado pela população de células-tronco derivadas de músculo obtida através dos *pre-platings* com células mesenquimais de medula óssea de camundongo, como forma de testar se a técnica de *pre-plating* estava de fato separando diferentes populações de células, como podemos ver abaixo.

Tabela 13: Citometria de fluxo de amostras de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BM-MSC) e células-tronco derivadas de músculo (MDSC), de animais normais *eGFP* e *C57black*. Foram realizados estudos em duas amostras de MDSC (1 e 2). Nas linhas os diferentes marcadores. Nas colunas, cada uma das amostras. Os valores dão a porcentagem de células positivas para cada um dos marcadores.



Estes resultados demonstram que a população de células isolada em PP6 possui um fenótipo muito semelhante ao das células-tronco mesenquimais de medula, com exceção do marcador CD105. Este marcador está muito mais expresso nas células MDSC do que nas derivadas da medula óssea.

Quando comparadas com os PPs de onde tiveram origem, podemos perceber também um enriquecimento da população para alguns marcadores, conforme resultados abaixo:

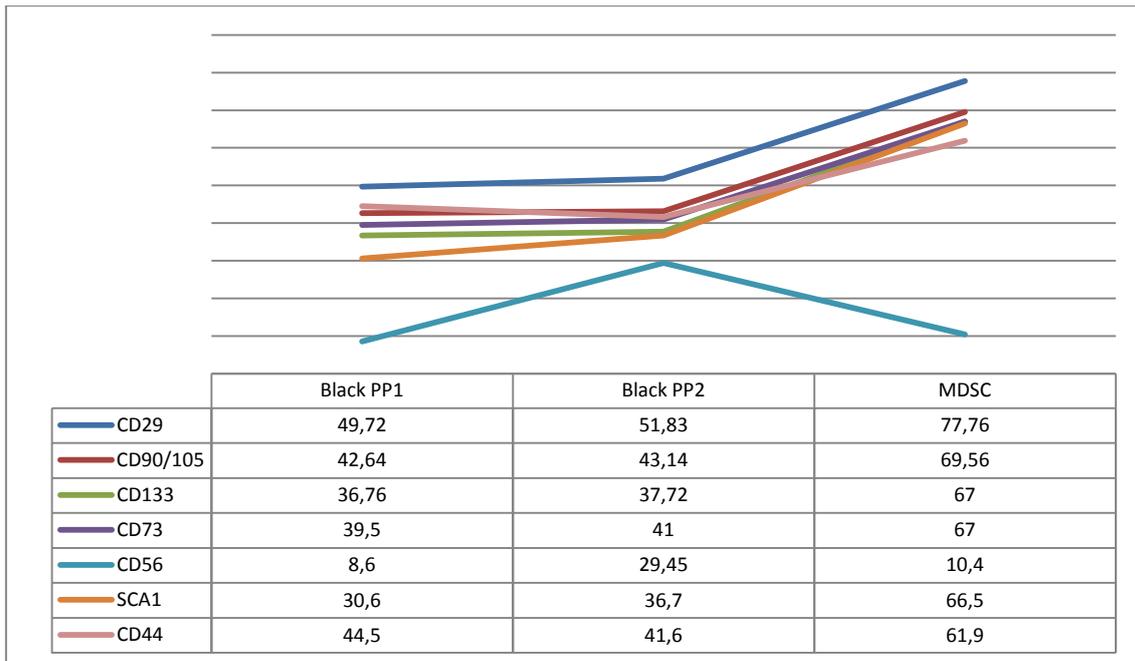


Figura 15: Expressão de marcadores de superfície nas populações de células normais estudadas. Na tabela, valores em porcentagem.

A análise deste painel de marcadores sugere um aumento da população de células positivas para os marcadores estudados, à exceção do CD56, nos animais *C57Black6*, ao longo dos *pre-platings*.

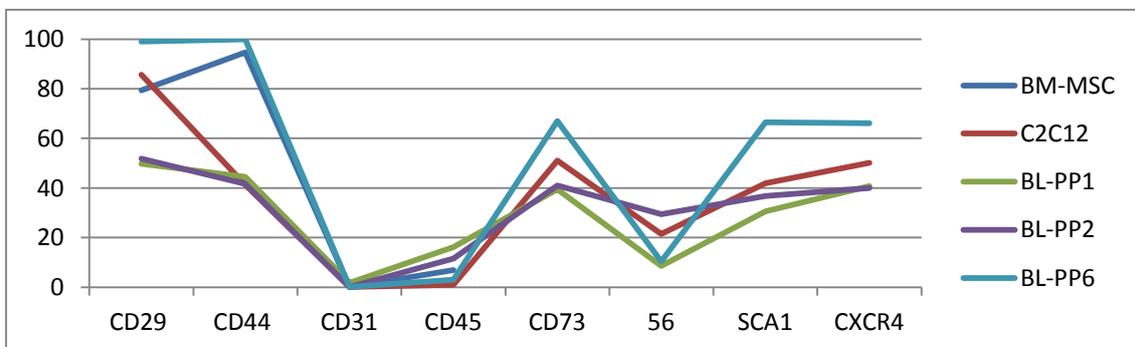


Figura 16: Expressão de marcadores de superfície na população de células MDSC normais estudadas em comparação aos mioblastos C2C12, células-tronco mesenquimais de medula (BM-MSC), PP1 e PP2 de animais *C57Black*.

A análise comparativa dos marcadores em relação às linhagens BM-MSC e C2C12 está ilustrada na figura 16. Neste painel podemos visualizar uma maior semelhança das curvas das população PP6 e BM-MSC em relação aos marcadores mesenquimais e com a linhagem C2C12, em relação aos marcadores musculares. Estes resultados sugerem que as células PP6 são mais imaturas e precursoras (marcadores de MSC) porém mantém sua determinação muscular (marcadores miogênicos).

3. Estudo do perfil de expressão gênica

a. Capacidade proliferativa das células isoladas

Utilizando dos métodos já descritos previamente, realizamos a coleta e processamento das células-satélite ativas dos animais das três linhagens. Abaixo, tabelas com o destino de todo o material coletado, por linhagem.

Tabela 14: Amostras - *C57Black6*

	Animais	Sexo	PP1	RNA PP2	Array
1	BL 1	F	OK	OK	OK
2	BL 2	F	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU
3	BL 3	F	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU
4	BL 4	F	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU
5	BL 5	M	OK	OK	OK
6	BL 6	M	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU
8	BL 8	M	OK	OK	OK
9	BL 9	M	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU
10	BL 10	M	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU
11	BL 11	M	OK	OK	OK
12	BL 12	M	OK	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU
14	BL 14	F	OK	OK	OK
15	BL 15	F	OK	OK	OK
16	BL 16	F	OK	OK	OK
17	BL 17	F	OK	OK	OK
18	BL 18	F	OK	OK	OK
19	BL 19	F	OK	OK	OK
20	BL 20	F	OK	OK	OK'

Foram coletadas amostras de 20 animais da linhagem *C57Black6*, sendo que 11 foram processadas e tiveram RNA extraído. Destas 11 que tiveram o RNA extraído foi possível realizar o estudo por *microarray* em todas.

Tabela 15: Amostras - *Large^{myd}*

	Animais	Sexo	PP1	RNA PP2	Array
1	LG 21	M	OK	OK	OK
2	LG 24	M	OK	OK	OK
3	LG 25	M	OK	OK	OK
5	LG 27	M	OK	OK	OK
6	LG 28	F	OK	OK	OK
7	LG 55A	F	OK	OK	OK
8	LG 56A	F	OK	OK	OK
9	LG 73	F	OK	OK	OK
10	LG 108	F	OK	OK	OK
11	LG 109	F	OK	OK	OK

Foram coletadas amostras de 11 animais da linhagem *Large^{myd}*. Esta linhagem é mantida em heterozigose e isso causa uma maior dificuldade de conseguirmos os animais afetados, visto que apenas 25% dos animais de cada ninhada são os animais de interesse. 10 das 11 amostras foram processadas e destas, foi possível realizar o estudo por *microarray* em todas.

Tabela 16: Amostras - *Lama2^{dy2J/J}*

	Animais	Sexo	PP1	RNA PP2	Array
1	2J 39D	F	NÃO PROLIFEROU	NÃO PROLIFEROU	
2	2J 40D	F	OK	OK	0
3	2J 41D	F	NÃO PROLIFEROU	0	
4	2J 67D	F	OK	OK	0
5	2J 73D	F	OK	OK	0
6	2J 75D	F	OK	OK	OK
7	2J 76D	M	OK	OK	OK
8	2J 78D	M	OK	OK	OK
9	2J 87D	M	OK	OK	OK
10	2J 88D	M	OK	OK	OK
11	2J 89D	F	OK	OK	OK
12	2J 90D	F	OK	OK	OK

Foram coletadas amostras de 12 animais *Lama2^{dy2J/J}*. Esta linhagem também é mantida em heterozigose, tendo as mesmas dificuldades de obtenção do que a linhagem *Large^{myd}*. 10 das 12 amostras foram processadas e tiveram seu RNA extraído e destas foi possível realizar o *microarray* em 7. Três amostras foram que ser descartadas, devido à baixa concentração do RNA ou problemas no processamento deste RNA no protocolo do *microarray*.

Nas três linhagens pudemos verificar que as células isoladas possuem capacidade proliferativa semelhante. Em todos os casos pudemos congelar e expandir as células até a quantidade necessária para o processamento e extração do RNA utilizado nos experimentos posteriores. Atribuímos as dificuldades iniciais na proliferação das amostras de *C57Black6* ao aperfeiçoamento da técnica de extração destas células.

Em uma das amostras (2J 40D) a extração do RNA foi ineficiente e a concentração obtida foi baixa demais para prosseguirmos com o processamento do RNA para aplicação no *microarray*. Em duas outras amostras (2J 67D e 73D) o problema foi no próprio processamento deste RNA.

b. Extração e purificação de RNA

O primeiro passo para o processamento do RNA é sua quantificação, realizada através da leitura no espectrofotômetro Nanodrop. Abaixo, os valores desta quantificação inicial de todas as amostras processadas.

Tabela 17: Quantificação do RNA extraído das células-satélite ativas (PP2)

Amostra	ng/ μ L	Amostra	ng/ μ L	Amostra	ng/ μ L
BL-1	277,35	2J-40	43,00	LG-21	320,36
BL-5	122,83	2J-67	152,60	LG-24	225,05
BL-8	129,06	2J-75	163,73	LG-25	262,50
BL-11	222,20	2J-76	162,40	LG-27	124,54
BL-14	399,90	2J-78	171,60	LG-28	298,83
BL-15	310,80	2J-87	254,8	LG-55	138,21
BL-16	239,30	2J-88	174,90	LG-56	245,00
BL-17	263,10	2J-89	108,10	LG-73	258,80
BL-18	370,40	2J-90	369,10	LG-108	121,20
BL-19	202,80			LG-109	118,40
BL-20	118,00				

Nas amostras acima, verificamos que com exceção da amostra 2J-40 a extração de RNA se deu de forma adequada. Também verificamos que a qualidade do RNA estava satisfatória, uma vez que a razão A_{260}/A_{280} obtida após a quantificação estava entre 1,7 e 2,1. Avaliamos também a integridade do RNA através da observação de seu comportamento após aplicação e corrida em gel de agarose, como podemos observar no exemplo abaixo.

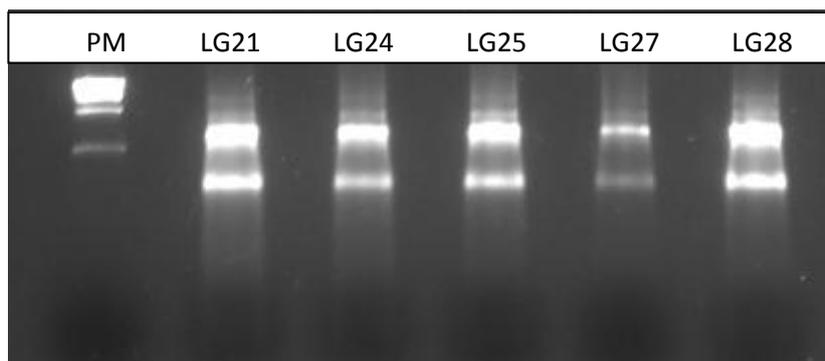


Figura 17: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo mostrando a qualidade do RNA extraído das células-satélite. É possível visualizar as bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S e 18S. PM – peso molecular.

Como já comentamos anteriormente, não foi possível prosseguir com o processamento da amostra 2J-40 devido à sua baixa concentração de RNA inicial, provavelmente devido a alguma falha na extração. As amostras com concentração adequada passaram pela diluição do RNA e, em seguida, foram preparadas no kit WT Expression Kit (Ambion), como já descrito anteriormente. As amostras de RNA total passam pelas etapas de síntese de cDNA 1ª fita,

síntese de cDNA 2ª fita, síntese de cRNA e purificação de cRNA. Para prosseguirmos com o processamento é necessário 10µg de cRNA em 22µL de água, ou seja, as concentrações deveriam estar acima de 455ng/µL.

Tabela 18: Quantificação de cRNA

Amostra	ng/µL	Amostra	ng/µL	Amostra	ng/µL
BL-1	704,48	2J-67	591,50	LG-21	608,56
BL-5	985,45	2J-75	619,40	LG-24	578,85
BL-8	804,76	2J-76	1070,80	LG-25	611,56
BL-11	608,02	2J-78	668,05	LG-27	709,80
BL-14	682,30	2J-87	638,50	LG-28	726,82
BL-15	851,80	2J-88	928,20	LG-55	955,17
BL-16	1157,20	2J-89	967,10	LG-56	1095,80
BL-17	1107,00	2J-90	895,10	LG-73	469,80
BL-18	777,30			LG-108	471,00
BL-19	1055,00			LG-109	1755,00
BL-20	929,90				

Neste ponto, todas as amostras estavam com concentração adequada para prosseguir com o protocolo de processamento de RNA.

Depois das etapas de síntese de cDNA de 2º ciclo, hidrólise e purificação do cDNA de 2º ciclo as amostras devem ser novamente quantificadas e diluídas a 220ng/µL.

Tabela 19: Quantificação de cDNA de segundo ciclo purificado

Amostra	ng/µL	Amostra	ng/µL	Amostra	ng/µL
BL-1	349,25	2J-67	147,36	LG-21	320,36
BL-5	342,70	2J-75	277,21	LG-24	291,90
BL-8	331,25	2J-76	280,50	LG-25	357,60
BL-11	369,56	2J-78	294,58	LG-27	282,57
BL-14	261,60	2J-87	219,30	LG-28	315,18
BL-15	213,60	2J-88	261,60	LG-55	354,00
BL-16	245,70	2J-89	189,90	LG-56	275,20
BL-17	193,30	2J-90	274,10	LG-73	224,20
BL-18	251,90			LG-108	211,10
BL-19	213,30			LG-109	292,80
BL-20	184,10				

O ss-cDNA deve ser diluído de forma a ficar numa concentração de 220ng/µL em um volume de 31,2µL. Assim, as amostras 2J-67 e 2J-89 não puderam ser utilizadas para prosseguir no protocolo de processamento do RNA. O RNA controle fornecido no kit e processado juntamente com as outras amostras deveria produzir mais que 6µg de cDNA de segunda fita e no caso produziu aproximadamente 7 µg. Este controle só é utilizado para avaliar o sucesso do processo até este ponto e não prossegue nas etapas posteriores.

Após a diluição do ss-cDNA passamos à etapa de fragmentação. 45µL do produto desta reação são transferidos para um novo tubo para o prosseguimento do processamento. O restante é aplicado em gel de agarose 2% para verificação da fragmentação, que deve produzir um arrasto entre 40 e 70 nucleotídeos, conforme demonstrado no exemplo abaixo:

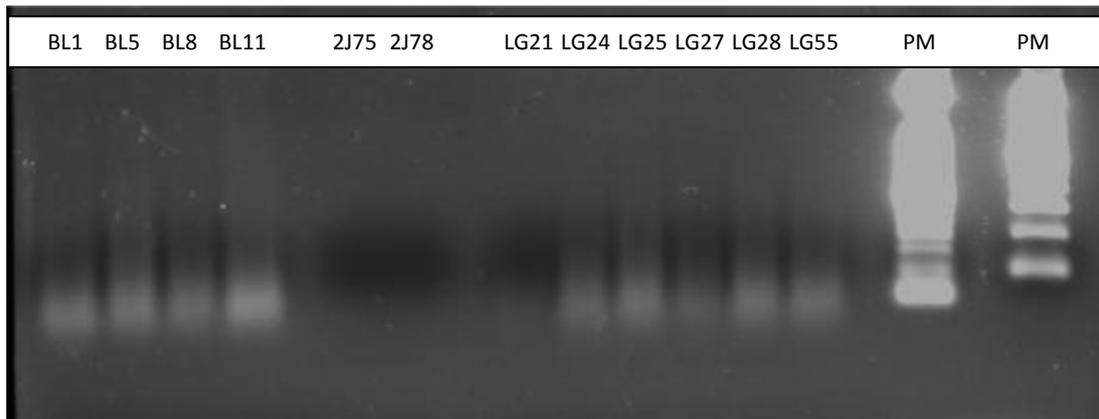


Figura 18: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando a fragmentação das amostras. Arrasto entre 40 e 70nt. PM – peso molecular.

Todas as amostras descritas passaram por todas estas etapas se fossem aprovadas nos controles de qualidade descritos e apenas três amostras das culturas conseguidas dos animais *Lama2^{dy2J}/J* foram excluídas.

c. Pré-análise dos resultados dos microarrays de expressão

i. Controles de qualidade

Os dados provenientes da leitura das lâminas são pré-analisados com a utilização do programa *Expression Console* fornecido pela própria Affymetrix.

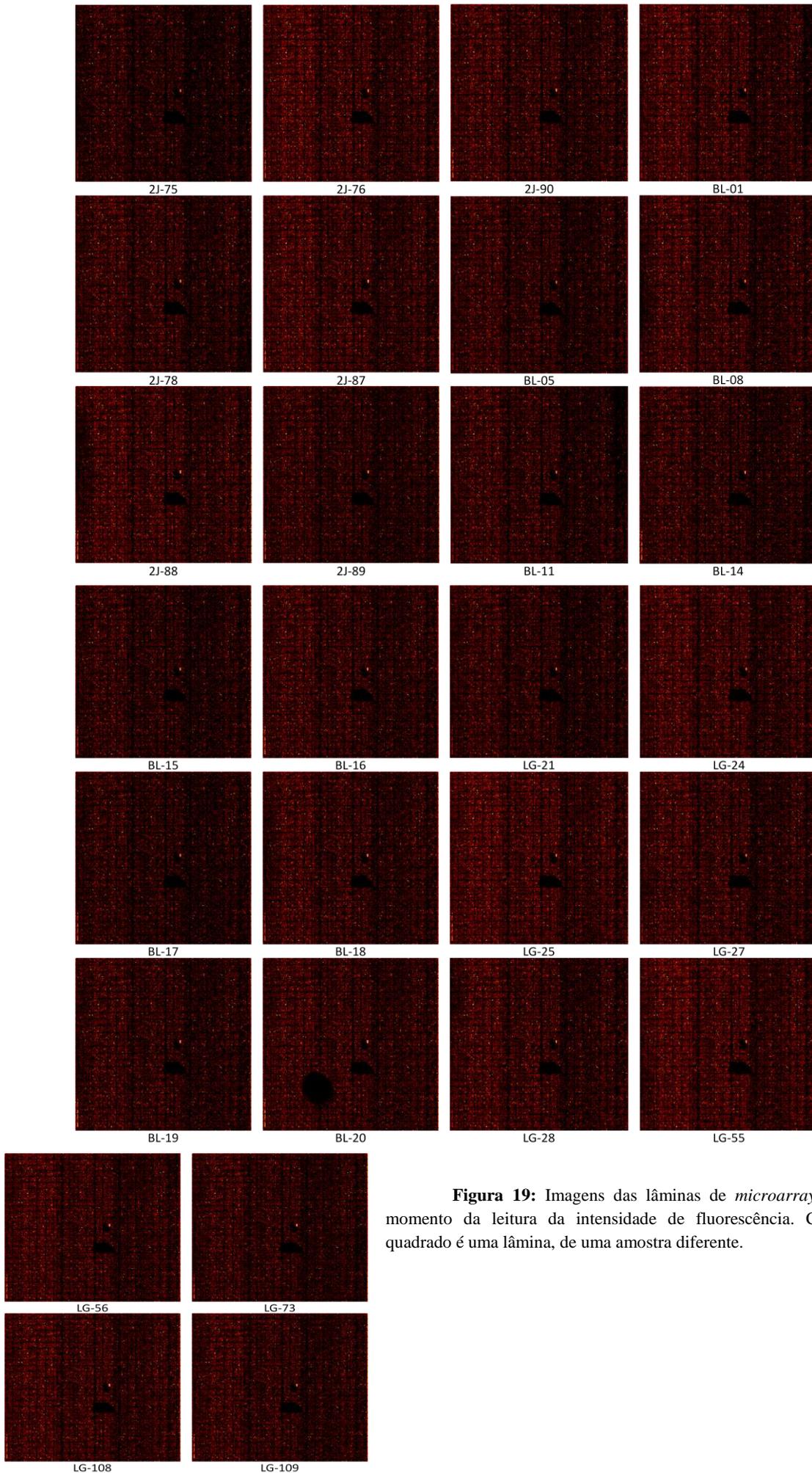


Figura 19: Imagens das lâminas de *microarray* no momento da leitura da intensidade de fluorescência. Cada quadrado é uma lâmina, de uma amostra diferente.

Através da análise das imagens dos *arrays*, optamos por excluir a amostra BL-20, pois este apresentou uma região onde aparentemente não há marcação nenhuma, provavelmente causada por uma bolha de ar no momento da hibridação.

Abaixo, os dados de controle de qualidade para todos os chips analisados.

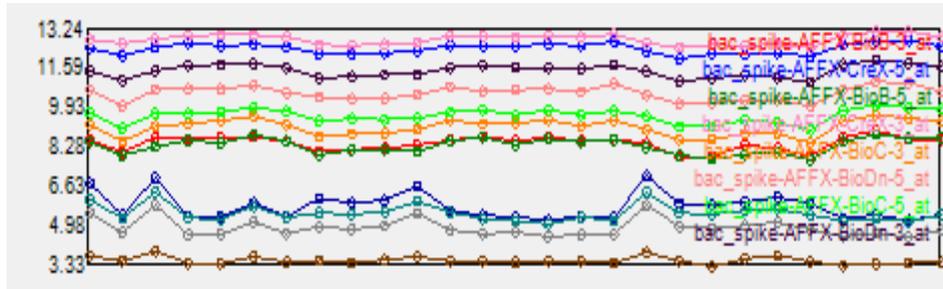


Figura 20: Controles de hibridação 3', 5' e Poly-A de todas as amostras realizadas, com intensidades crescentes que comprovam a qualidade dos ensaios.

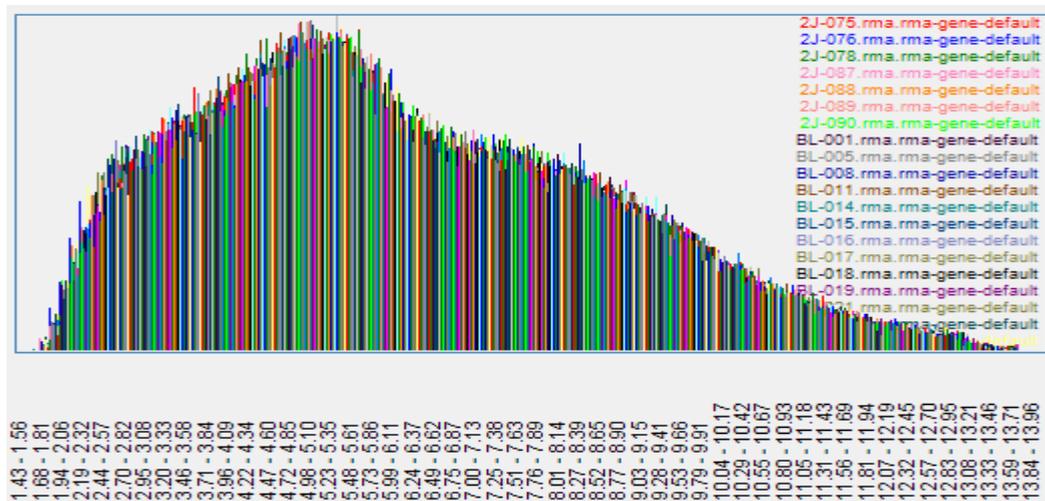


Figura 21: Histograma de intensidade de sinal para todas as amostras avaliadas, com padrão próximo à normal, atestando a qualidade dos chips testados.

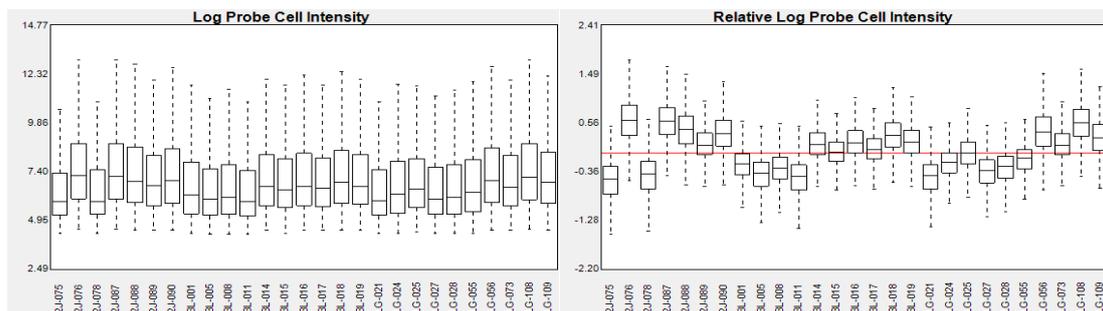


Figura 22: Gráficos com intensidade de agrupamentos de sondas antes da normalização. Diferenças na distribuição são esperadas e serão corrigidas com a normalização. Do lado direito os dados de cada array e do lado esquerdo a distribuição das intensidades de cada array com o valor de mediana do grupo.

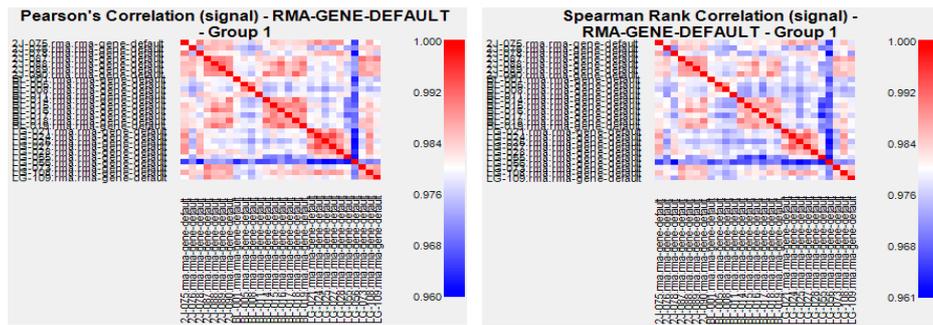


Figura 23: Correlação das intensidades de sinal entre os arrays. O teste de Spearman é utilizado quando o número de amostras é menor, já que se trata de um teste baseado em ranking. O teste de Pearson é utilizado quando existe mais dados, o que permite que a normalidade seja confirmada. O valor de r^2 é convertido na escala de cores, onde o maior valor equivale ao vermelho e o menor valor equivale ao azul.

ii. Normalização

O próximo passo foi, então, a análise dos dados gerados. Para isso, os arquivos com as imagens das lâminas, com os valores de intensidade de cada sonda (de extensão .CEL) devem ser normalizados. A normalização corrige os erros introduzidos por diferenças técnicas e de intensidade da fluorescência dos fluoróforos. Esta normalização pode ser feita de diferentes maneiras. Optamos por utilizar a normalização por RMA (Robust Multi-array Average). Podemos realizar esta normalização no programa Expression Console, da Affymetrix.

Assim, realizamos a normalização comparando os grupos dois a dois. Para cada análise, é realizado um novo RMA, visto que os parâmetros para normalização dependem das amostras. Abaixo, cada um dos resultados dos RMA realizados para cada análise.

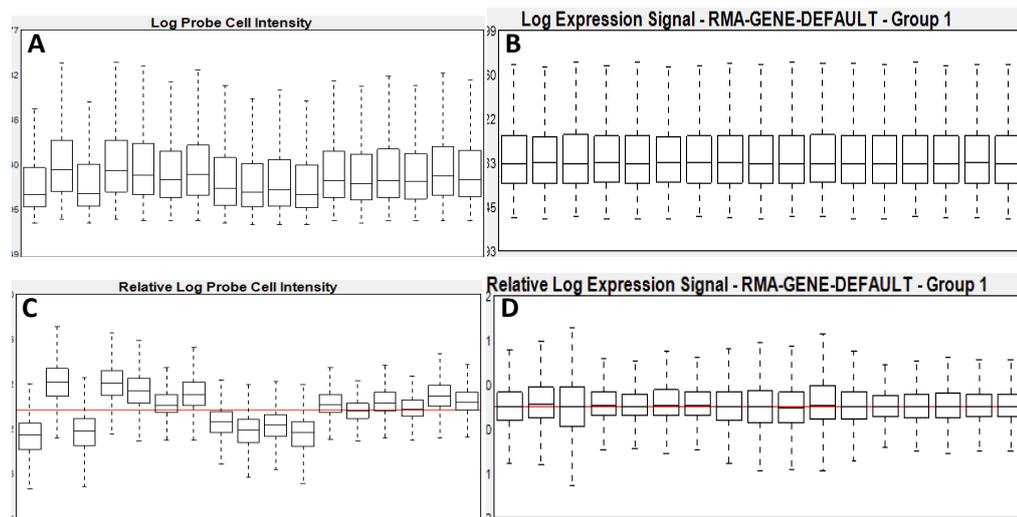


Figura 24: Gráficos com intensidade de grupamentos de sondas antes e após a normalização, dos grupos *C57Black6* e *Lama2^{dy2J}/J*. Diferenças na distribuição são esperadas e serão corrigidas com a normalização. A e C - dados não normalizados. B e D - dados após a normalização. Do lado direito os dados de cada *array* e do lado esquerdo a distribuição das intensidades de cada *array* com o valor de mediana do grupo.

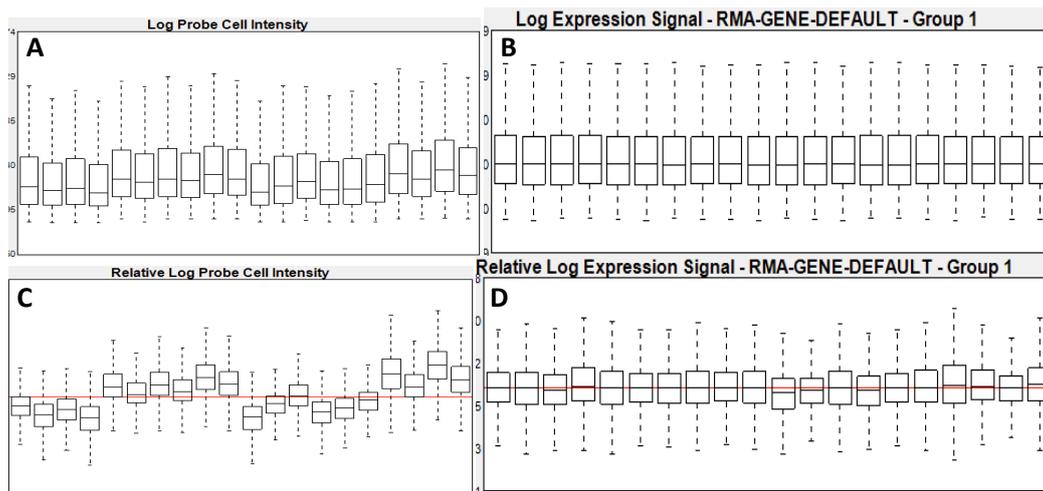


Figura 25: Gráficos com intensidade de grupamentos de sondas antes e após a normalização, dos grupos *C57Black6* e *Large^{myd}*. Diferenças na distribuição são esperadas e serão corrigidas com a normalização. A e C - dados não normalizados. B e D - dados após a normalização. Do lado direito os dados de cada *array* e do lado esquerdo a distribuição das intensidades de cada *array* com o valor de mediana do grupo.

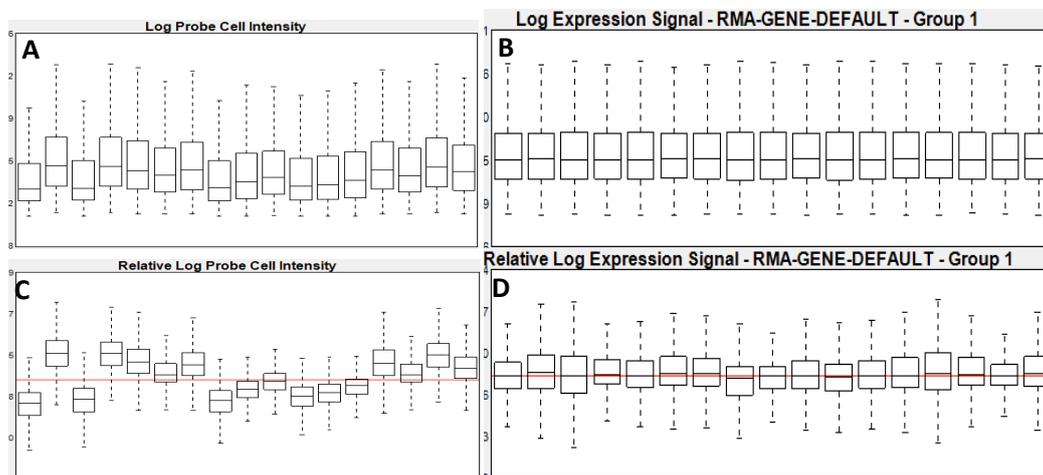


Figura 26: Gráficos com intensidade de grupamentos de sondas antes e após a normalização, dos grupos *Lama2^{dy21/J}* e *Large^{myd}*. Diferenças na distribuição são esperadas e serão corrigidas com a normalização. A e C - dados não normalizados. B e D - dados após a normalização. Do lado direito os dados de cada *array* e do lado esquerdo a distribuição das intensidades de cada *array* com o valor de mediana do grupo.

Após a normalização, podemos verificar que a variância dos valores de intensidade de fluorescência foi reduzida drasticamente, o que sugere uma correta normalização e a possibilidade de uso destes dados posteriormente.

d. Análise dos resultados dos *microarrays* de expressão

i. Genes diferencialmente expressos

Cada um dos resultados do Expression Console foi então transferido para análise no software MeV, onde foi aplicado inicialmente um filtro inespecífico de variância, ou seja, retiramos da análise aqueles genes que não variaram entre as amostras. Este filtro foi configurado para fazer um ranking dos genes baseado no desvio padrão e então manter apenas

50% dos genes com maior variação. Desta forma, dos 35556 genes iniciais, foram considerados apenas os 17778 genes (50%) com maior variância.

Em seguida, utilizamos o método estatístico SAM (Significance Analysis of Microarrays) para a seleção dos genes diferencialmente expressos. Optamos por não inserir a identificação de cada gene neste momento, visto que nas etapas posteriores esta nomenclatura é adicionada automaticamente.

Utilizamos como parâmetros para a análise SAM 1000 permutações e falso positivo = 0 para cada par, como podemos ver a seguir.

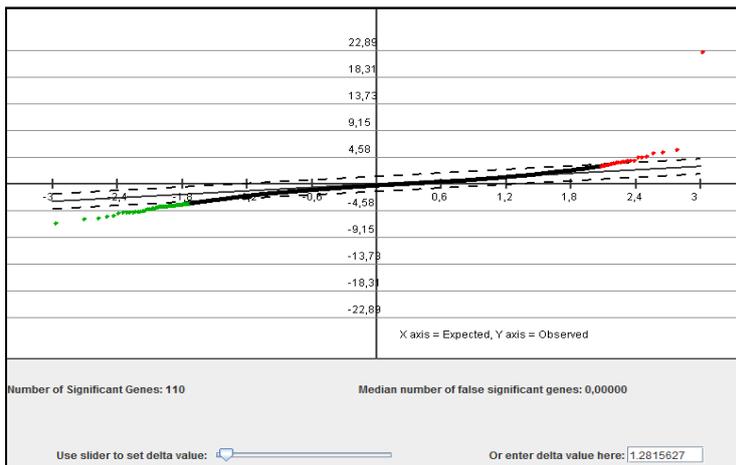


Figura 27: Gráfico gerado após a análise estatística SAM, realizada pelo programa MeV. O valor delta é estabelecido como sendo o menor possível onde o número mediano de falsos positivos é zero. Análise realizada entre os grupos de *C57Black6* e *Lama2^{dy2J/J}*. Foram selecionados 110 genes diferencialmente expressos.

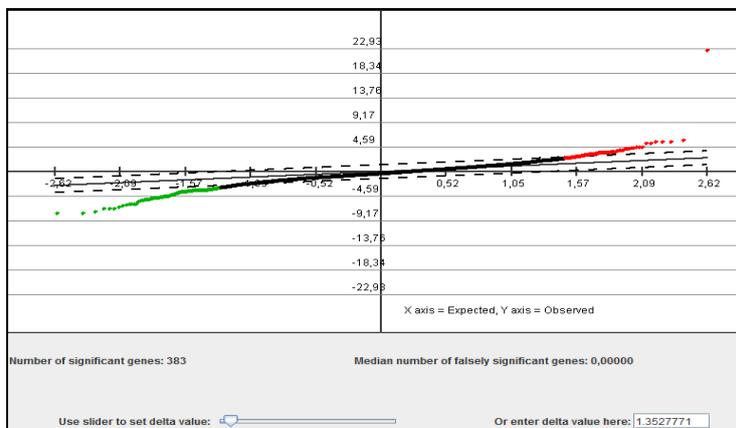


Figura 28: Gráfico gerado após a análise estatística SAM, realizada pelo programa MeV. O valor delta é estabelecido como sendo o menor possível onde o número mediano de falsos positivos é zero. Análise realizada entre os grupos de *C57Black* e *Large^{myd}*. Foram selecionados 383 genes diferencialmente expressos.

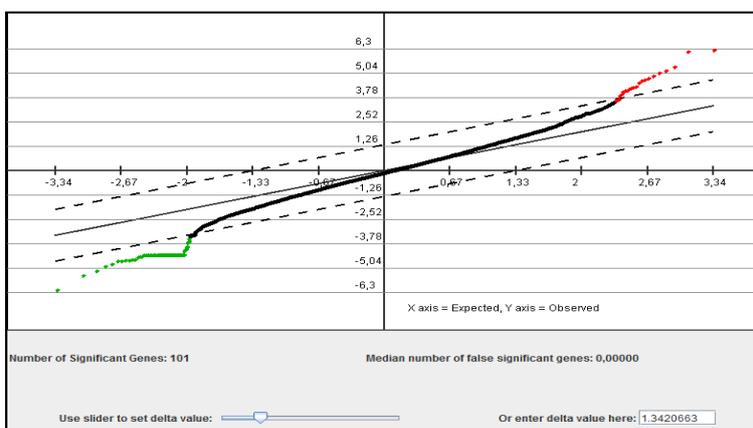


Figura 29: Gráfico gerado após a análise estatística SAM, realizada pelo programa MeV. O valor delta é estabelecido como sendo o menor possível onde o número mediano de falsos positivos é zero. Análise realizada entre os grupos de *Lama2^{dy2J/J}* e *Large^{myd}*. Foram selecionados 101 genes diferencialmente expressos.

As listas de genes resultantes destas análises foram então preparadas para serem adicionadas ao IPA (Ingenuity Systems Inc.). Neste programa é possível construir redes funcionais e avaliar o enriquecimento de cada via de sinalização com nossos genes. Os arquivos resultantes do MeV, em formato .TXT, devem ser exportados ao Excel e as observações devem ser transformadas em valores que permitam a interface com o software IPA. No caso das análises pareadas, é necessário fazer o cálculo do \log_2 para o cálculo do *fold change*. Abaixo, as tabelas com a identificação dos genes diferencialmente expressos selecionados pela análise.

Tabela 20: Dados brutos da comparação entre *C57Black* e *Lama2^{dy2J}/J*.

Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
-3,682	PENK	proenkephalin	Extracellular Space	other
-2,911	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	Plasma Membrane	phosphatase
-2,852	SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	Extracellular Space	other
-2,416	LCN2	lipocalin 2	Extracellular Space	transporter
-2,254	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	Extracellular Space	other
-2,122	DCN	decorin	Extracellular Space	other
-2,034	PALMD	palmdelphin	Cytoplasm	other
-2,005	EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	Extracellular Space	other
-1,987	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	Extracellular Space	enzyme
-1,953	CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)	Plasma Membrane	other
-1,882	ANGPTL7	angiopoietin-like 7	Extracellular Space	other
-1,835	RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	Nucleus	other
-1,697	MAB21L2	mab-21-like 2 (<i>C. elegans</i>)	Nucleus	other
-1,655	SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	unknown	other
-1,58	MKX	mohawk homeobox	Nucleus	other
-1,571	CAPN6	calpain 6	Cytoplasm	peptidase
-1,544	ESM1	endothelial cell-specific molecule 1	Extracellular Space	growth factor
-1,498	GALNT14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GalNAc-T14)	Cytoplasm	enzyme
-1,497	NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	Cytoplasm	enzyme
-1,435	PRG4	proteoglycan 4	Extracellular Space	other
-1,402	TBX4	T-box 4	Nucleus	transcription regulator
-1,372	CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	Cytoplasm	enzyme
-1,336	MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	Nucleus	transcription regulator
-1,333	ANXA8L2 (includes others)	annexin A8-like 2	Plasma Membrane	other
-1,325	PCDH20	protocadherin 20	unknown	other
-1,272	MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	Extracellular Space	peptidase
-1,269	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	Extracellular Space	other
-1,263	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	Plasma Membrane	other
-1,249	MGLL	monoglyceride lipase	Plasma Membrane	enzyme
-1,243	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	Cytoplasm	enzyme
-1,223	PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	Extracellular Space	other
-1,195	ADCY2	adenylate cyclase 2 (brain)	Plasma Membrane	enzyme
-1,134	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	Plasma Membrane	transporter
-1,107	LRRC8B	leucine rich repeat containing 8 family, member B	unknown	other
-1,104	TMEM154	transmembrane protein 154	unknown	other
-1,069	EZR	ezrin	Plasma Membrane	other
-1,057	WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	Cytoplasm	other
-1,048	CCDC85A	coiled-coil domain containing 85A	unknown	other
-1,043	NRN1	neuritin 1	Cytoplasm	other
-1,041	MBAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	unknown	enzyme
-1,03	GLRB	glycine receptor, beta	Plasma Membrane	ion channel
-1,03	GRIK5	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5	Plasma Membrane	ion channel
-1,016	HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	Plasma Membrane	enzyme
-1,016	RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Plasma Membrane	other
-0,984	MAPK13	mitogen-activated protein kinase 13	Cytoplasm	kinase
-0,975	C10orf57	chromosome 10 open reading frame 57	Cytoplasm	other
-0,974	ODZ3	odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	Plasma Membrane	other
-0,972	HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	Extracellular Space	growth factor
-0,97	LPCAT2	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	Cytoplasm	enzyme
-0,961	C10orf57	chromosome 10 open reading frame 57	Cytoplasm	other
-0,961	C10orf57	chromosome 10 open reading frame 57	Cytoplasm	other
-0,961	CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme
-0,943	MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	Plasma Membrane	kinase
-0,934	DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>)	Plasma Membrane	other
-0,934	ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	Plasma Membrane	other
-0,924	MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	Nucleus	transcription regulator
-0,921	AUTS2	autism susceptibility candidate 2	Extracellular Space	other
-0,917	RAC3	ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small GTP binding protein Rac3)	Cytoplasm	enzyme

-0,904	IL16	interleukin 16	Extracellular Space	cytokine
-0,883	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	Plasma Membrane	transporter
-0,877	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	Plasma Membrane	transporter
-0,869	SH3RF2	SH3 domain containing ring finger 2	Extracellular Space	other
-0,864	CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	Plasma Membrane	ion channel
-0,853	FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	Plasma Membrane	other
-0,832	PRKAR1B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	Cytoplasm	kinase
-0,821	PITX1	paired-like homeodomain 1	Nucleus	transcription regulator
-0,82	CD109	CD109 molecule	Plasma Membrane	other
-0,786	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	Extracellular Space	other
-0,776	SLC24A6	solute carrier family 24 (sodium/lithium/calcium exchanger), member 6	Plasma Membrane	transporter
-0,756	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	Cytoplasm	kinase
-0,748	FAM59A	family with sequence similarity 59, member A	unknown	other
-0,725	PRRX1	paired related homeobox 1	Nucleus	transcription regulator
-0,715	MYO1D	myosin ID	Plasma Membrane	other
-0,715	TGFB3	transforming growth factor, beta 3	Extracellular Space	growth factor
-0,707	CGREF1	cell growth regulator with EF-hand domain 1	Extracellular Space	other
-0,699	SMPDL3B	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B	Extracellular Space	enzyme
-0,652	RCAN1	regulator of calcineurin 1	Nucleus	transcription regulator
-0,645	TNS3	tensin 3	unknown	phosphatase
-0,643	LIN7A	lin-7 homolog A (C. elegans)	Cytoplasm	other
-0,625	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Cytoplasm	transcription regulator
-0,611	ELL2	elongation factor, RNA polymerase II, 2	Nucleus	transcription regulator
-0,608	PHOSPHO1	phosphatase, orphan 1	Extracellular Space	enzyme
-0,591	TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	Cytoplasm	other
0,696	TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	Nucleus	other
0,731	ENTPD4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	Cytoplasm	enzyme
0,789	CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	Extracellular Space	cytokine
0,832	PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	Cytoplasm	kinase
0,866	TRANK1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	Nucleus	transcription regulator
0,87	SLC25A45	solute carrier family 25, member 45	Cytoplasm	transporter
0,899	FBN1	fibrillin 1	Extracellular Space	other
0,902	BCL6B	B-cell CLL/lymphoma 6, member B	Nucleus	transcription regulator
0,937	VAMP5	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	Plasma Membrane	transporter
1,131	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	Extracellular Space	cytokine
1,198	Csprs (includes others)	component of Sp100-rs	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
1,251	EFNB1	ephrin-B1	Plasma Membrane	other
1,333	ADRA2A	adrenoceptor alpha 2A	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
1,491	ASIC3	acid-sensing (proton-gated) ion channel 3	Plasma Membrane	ion channel
1,536	HHIPL1	HHIP-like 1	unknown	other
1,626	Sp100	nuclear antigen Sp100	Nucleus	transcription regulator
1,649	SYNPO2	synaptopodin 2	Cytoplasm	other
1,716	MARC1	mitochondrial amidoxime reducing component 1	Cytoplasm	enzyme
1,784	PLAC8	placenta-specific 8	Nucleus	other
1,844	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	Extracellular Space	other
1,932	CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	Plasma Membrane	other
1,936	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	Cytoplasm	enzyme
2,055	Gm10002	predicted gene 10002	unknown	other
2,085	PLA1A	phospholipase A1 member A	Extracellular Space	enzyme
2,494	DIO3	deiodinase, iodothyronine, type III	Plasma Membrane	enzyme
2,898	Gzmc	granzyme C	Cytoplasm	other
4,522	AKR1E2	aldo-keto reductase family 1, member E2	Cytoplasm	enzyme

Nota-se que a grande maioria de genes está com expressão reduzida e apenas alguns poucos estão super-expressos. Dos 110 genes, 27 estão super-expressos (24,55%), enquanto os 83 restantes (75,45%) estão com a expressão reduzida em células-satélite de camundongos *Lama2^{dy2J}/J*.

Tabela 21: Dados brutos da comparação entre *C57Black6* e *Large^{myd}*.

Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
-3,802	ANGPTL7	angiopoietin-like 7	Extracellular Space	other
-3,525	CRABP1	cellular retinoic acid binding protein 1	Cytoplasm	transporter
-3,455	SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinasase, antitrypsin), member 3	Extracellular Space	other
-3,297	CA9	carbonic anhydrase IX	Nucleus	enzyme
-3,229	LCN2	lipocalin 2	Extracellular Space	transporter
-3,041	PENK	proenkephalin	Extracellular Space	other
-2,79	Cbr2	carbonyl reductase 2	Cytoplasm	enzyme
-2,75	SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	Extracellular Space	other
-2,6	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	Cytoplasm	enzyme
-2,575	ESM1	endothelial cell-specific molecule 1	Extracellular Space	growth factor
-2,451	MKX	mohawk homeobox	Nucleus	other
-2,367	IL33	interleukin 33	Extracellular Space	cytokine
-2,344	THBS4	thrombospondin 4	Extracellular Space	other
-2,322	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
-2,276	SCXA/SCXB	scleraxis homolog A (mouse)	Nucleus	other
-2,259	DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)	Extracellular Space	other
-2,211	GREM2	gremlin 2	Extracellular Space	other
-2,174	MAB21L2	mab-21-like 2 (C. elegans)	Nucleus	other
-2,107	MGLL	monoglyceride lipase	Plasma Membrane	enzyme
-2,099	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	Extracellular Space	other
-1,917	CAPN6	calpain 6	Cytoplasm	peptidase
-1,875	MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	unknown	enzyme
-1,834	MMP16	matrix metallopeptidase 16 (membrane-inserted)	Extracellular Space	peptidase
-1,819	ADCY2	adenylate cyclase 2 (brain)	Plasma Membrane	enzyme
-1,812	MEOX1	mesenchyme homeobox 1	Nucleus	transcription regulator
-1,797	GALNT14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GalNAc-T14)	Cytoplasm	enzyme
-1,789	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Extracellular Space	other
-1,773	PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	Extracellular Space	other
-1,765	COMP	cartilage oligomeric matrix protein	Extracellular Space	other
-1,695	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	Plasma Membrane	other
-1,678	LHX9	LIM homeobox 9	Nucleus	transcription regulator
-1,67	ANXA8L2 (includes others)	annexin A8-like 2	Plasma Membrane	other
-1,667	Zfp125	zinc finger protein 125	Nucleus	transcription regulator
-1,634	Gm15698	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 pseudogene	unknown	other
-1,63	C130021I20Rik	Riken cDNA C130021I20 gene	unknown	other
-1,623	TBX4	T-box 4	Nucleus	transcription regulator
-1,613	LARGE ^{MYD}	like-glycosyltransferase	Cytoplasm	enzyme
-1,583	PRG4	proteoglycan 4	Extracellular Space	other
-1,564	MGP	matrix Gla protein	Extracellular Space	other
-1,539	HHIP	hedgehog interacting protein	Plasma Membrane	other
-1,522	C3	complement component 3	Extracellular Space	peptidase
-1,521	DCN	decorin	Extracellular Space	other
-1,505	CLEC11A	C-type lectin domain family 11, member A	Extracellular Space	growth factor
-1,499	C10orf11	chromosome 10 open reading frame 11	unknown	other
-1,486	AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)	Plasma Membrane	transporter
-1,484	GJB2	gap junction protein, beta 2, 26kDa	Plasma Membrane	transporter
-1,438	SLC35G2	solute carrier family 35, member G2	Cytoplasm	other
-1,435	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	Plasma Membrane	phosphatase
-1,42	RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	Nucleus	other
-1,41	Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6	Cytoplasm	enzyme
-1,368	GPRC5A	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
-1,355	ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	Plasma Membrane	other
-1,35	GAS5	growth arrest-specific 5 (non-protein coding)	unknown	other
-1,346	Gm10393 (includes others)	predicted gene 9780	unknown	other
-1,346	Gm10393 (includes others)	predicted gene 9780	unknown	other
-1,345	Gm10393 (includes others)	predicted gene 9780	unknown	other

-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,002	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-0,997	LPHN2	latrophilin 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
-0,997	STRBP	spermatid perinuclear RNA binding protein	Cytoplasm	other
-0,996	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	Plasma Membrane	phosphatase
-0,996	RPS24	ribosomal protein S24	Cytoplasm	other
-0,996	TMEM154	transmembrane protein 154	unknown	other
-0,994	LPHN2	latrophilin 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
-0,982	LPHN2	latrophilin 2	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
-0,976	WASF1	WAS protein family, member 1	Nucleus	other
-0,975	CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme
-0,965	SEMA3F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	Extracellular Space	other
-0,964	PRRX1	paired related homeobox 1	Nucleus	transcription regulator
-0,962	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Cytoplasm	other
-0,96	MARS2	methionyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme
-0,959	STRBP	spermatid perinuclear RNA binding protein	Cytoplasm	other
-0,954	Mei4	meiosis-specific, MEI4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	other
-0,951	BAIAP2L1	BAI1-associated protein 2-like 1	Cytoplasm	other
-0,949	SH3RF2	SH3 domain containing ring finger 2	Extracellular Space	other
-0,938	FGL2	fibrinogen-like 2	Extracellular Space	peptidase
-0,934	TLL1	tolloid-like 1	Extracellular Space	peptidase
-0,926	EMP2	epithelial membrane protein 2	Plasma Membrane	other
-0,926	RPS24	ribosomal protein S24	Cytoplasm	other
-0,918	PITX1	paired-like homeodomain 1	Nucleus	transcription regulator
-0,912	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1	Extracellular Space	other
-0,896	GRIK5	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5	Plasma Membrane	ion channel
-0,896	TCEAL5	transcription elongation factor A (SII)-like 5	unknown	other
-0,891	FGF13	fibroblast growth factor 13	Extracellular Space	growth factor
-0,876	NRN1	neuritin 1	Cytoplasm	other
-0,866	TAF1D	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, D, 41kDa	Nucleus	other
-0,862	HSPB2	heat shock 27kDa protein 2	Cytoplasm	other
-0,862	HSPB6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	Cytoplasm	other
-0,855	GYPC	glycophorin C (Gerbich blood group)	Plasma Membrane	other

-0,854	TUBG2	tubulin, gamma 2	Cytoplasm	other
-0,843	NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor
-0,832	ZDHHC15	zinc finger, DHHC-type containing 15	unknown	enzyme
-0,831	DNM1	dynamamin 1	Cytoplasm	enzyme
-0,819	MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	unknown	kinase
-0,818	FAM73A	family with sequence similarity 73, member A	unknown	other
-0,817	USP11	ubiquitin specific peptidase 11	Nucleus	peptidase
-0,814	PLXNA3	plexin A3	Plasma Membrane	transmembrane receptor
-0,811	MYO1D	myosin ID	Plasma Membrane	other
-0,808	CNKSR3	CNKSR family member 3	Plasma Membrane	other
-0,804	Duxbl (includes others)	predicted gene 10394	unknown	other
-0,804	Duxbl (includes others)	predicted gene 10394	unknown	other
-0,794	TDRKH	tudor and KH domain containing	Cytoplasm	other
-0,79	MAMDC2	MAM domain containing 2	Extracellular Space	other
-0,789	ACOT11	acyl-CoA thioesterase 11	Cytoplasm	enzyme
-0,788	ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	Cytoplasm	transporter
-0,78	C10orf57	chromosome 10 open reading frame 57	Cytoplasm	other
-0,78	FNDC4	fibronectin type III domain containing 4	unknown	other
-0,777	C10orf57	chromosome 10 open reading frame 57	Cytoplasm	other
-0,761	SSPN	sarcospan	Plasma Membrane	other
-0,754	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)	Plasma Membrane	other
-0,751	C10orf57	chromosome 10 open reading frame 57	Cytoplasm	other
-0,748	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)	Plasma Membrane	other
-0,747	RRAD	Ras-related associated with diabetes	Cytoplasm	enzyme
-0,745	CHST1	carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	Cytoplasm	enzyme
-0,739	DPY19L1	dpy-19-like 1 (C. elegans)	unknown	other
-0,737	SDC4	syndecan 4	Plasma Membrane	other
-0,736	AIF1L	allograft inflammatory factor 1-like	Plasma Membrane	other
-0,726	FAM46C	family with sequence similarity 46, member C	Extracellular Space	other
-0,72	LEPROT	leptin receptor overlapping transcript	Plasma Membrane	other
-0,716	SHANK1	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 1	Cytoplasm	other
-0,716	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	Nucleus	transcription regulator
-0,715	ZNF462	zinc finger protein 462	Nucleus	other
-0,706	SOX6	SRY (sex determining region Y)-box 6	Nucleus	transcription regulator
-0,702	CCNO	cyclin O	Nucleus	enzyme
-0,699	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	Cytoplasm	kinase
-0,698	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)	Plasma Membrane	other
-0,689	LIN7A	lin-7 homolog A (C. elegans)	Cytoplasm	other
-0,682	Duxbl (includes others)	predicted gene 10394	unknown	other
-0,682	SEPW1	selenoprotein W, 1	Cytoplasm	enzyme
-0,657	ANKRD29	ankyrin repeat domain 29	unknown	other
-0,647	MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	Nucleus	other
-0,642	RGMA	RGM domain family, member A	Plasma Membrane	other
-0,622	ZNF575	zinc finger protein 575	Nucleus	other
-0,6	PLS3	plastin 3	Cytoplasm	other
-0,591	MYO1D	myosin ID	Plasma Membrane	other
-0,584	C1orf198	chromosome 1 open reading frame 198	unknown	other
-0,569	6330512M04Rik	RIKEN cDNA 6330512M04 gene	unknown	other
-0,564	MED13L	mediator complex subunit 13-like	Nucleus	other
-0,526	TUBA8	tubulin, alpha 8	Cytoplasm	other
-0,518	ARF6	ADP-ribosylation factor 6	Plasma Membrane	transporter
0,585	ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	Extracellular Space	peptidase
0,592	EXOC3L4	exocyst complex component 3-like 4	unknown	other
0,607	RND3	Rho family GTPase 3	Cytoplasm	enzyme
0,641	HMCN1	hemicentin 1	Extracellular Space	other
0,643	TRAPPC12	trafficking protein particle complex 12	unknown	other
0,644	TMEM18	transmembrane protein 18	Nucleus	other
0,648	VAMP5	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	Plasma Membrane	transporter
0,658	FAM178A	family with sequence similarity 178, member A	unknown	other
0,66	PP1L4	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4	Nucleus	enzyme

0,666	ARHGEF28	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 28	Cytoplasm	other
0,669	DPPA2	developmental pluripotency associated 2	Nucleus	other
0,675	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	unknown	other
0,678	CDR2L	cerebellar degeneration-related protein 2-like	unknown	other
0,691	PSD3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	Cytoplasm	other
0,702	CNDP2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	Cytoplasm	peptidase
0,704	TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	Nucleus	other
0,706	ABHD2	abhydrolase domain containing 2	unknown	enzyme
0,718	CCNYL1	cyclin Y-like 1	Plasma Membrane	other
0,728	PLAU	plasminogen activator, urokinase	Extracellular Space	peptidase
0,733	PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	Cytoplasm	other
0,74	LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9	Extracellular Space	other
0,763	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	Extracellular Space	peptidase
0,772	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	Plasma Membrane	transmembrane receptor
0,785	KIAA1109	KIAA1109	unknown	other
0,79	ZNF41	zinc finger protein 41	Nucleus	other
0,792	KIAA1109	KIAA1109	unknown	other
0,799	FAM161A	family with sequence similarity 161, member A	Cytoplasm	other
0,802	FGGY	FGGY carbohydrate kinase domain containing	unknown	other
0,84	ZNF41	zinc finger protein 41	Nucleus	other
0,846	GSR	glutathione reductase	Cytoplasm	enzyme
0,853	KIAA1109	KIAA1109	unknown	other
0,856	HMCN1	hemicentin 1	Extracellular Space	other
0,869	PLCB4	phospholipase C, beta 4	Cytoplasm	enzyme
0,875	OCEL1	occludin/ELL domain containing 1	unknown	other
0,876	TUBB3	tubulin, beta 3 class III	Cytoplasm	other
0,877	RNASL	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)	Cytoplasm	enzyme
0,892	KIAA1109	KIAA1109	unknown	other
0,916	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	Cytoplasm	kinase
0,931	CDK18	cyclin-dependent kinase 18	Cytoplasm	kinase
0,932	TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	Extracellular Space	other
0,936	SP110	SP110 nuclear body protein	Nucleus	other
0,943	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	Cytoplasm	kinase
0,958	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
0,96	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	Extracellular Space	enzyme
0,973	PDE2A	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	Cytoplasm	enzyme
0,98	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
0,986	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
0,994	HDHD3	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3	Cytoplasm	enzyme
0,997	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Extracellular Space	other
0,998	HMCN1	hemicentin 1	Extracellular Space	other
1,001	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
1,014	RBPMS	RNA binding protein with multiple splicing	unknown	transcription regulator
1,014	RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	Nucleus	enzyme
1,024	HMCN1	hemicentin 1	Extracellular Space	other
1,029	Olf56	olfactory receptor 56	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
1,039	IRF1	interferon regulatory factor 1	Nucleus	transcription regulator
1,042	Trim30a/Trim30d	tripartite motif-containing 30A	Nucleus	other
1,049	HMCN1	hemicentin 1	Extracellular Space	other
1,075	C330024D21Rik	RIKEN cDNA C330024D21 gene	unknown	other
1,08	SLC25A45	solute carrier family 25, member 45	Cytoplasm	transporter
1,081	MBNL3	muscleblind-like splicing regulator 3	Nucleus	other
1,082	ZNF41	zinc finger protein 41	Nucleus	other
1,101	GDA	guanine deaminase	Cytoplasm	enzyme
1,109	ATXN7L1	ataxin 7-like 1	unknown	other
1,115	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,125	UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	Cytoplasm	enzyme

1,135	LGR4	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
1,142	NAV1	neuron navigator 1	Cytoplasm	enzyme
1,177	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,178	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,178	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,246	EFNB1	ephrin-B1	Plasma Membrane	other
1,26	HMCN1	hemimentin 1	Extracellular Space	other
1,275	CYGB	cytoglobin	Cytoplasm	transporter
1,29	SP110	SP110 nuclear body protein	Nucleus	other
1,292	FRZB	frizzled-related protein	Extracellular Space	other
1,315	GLP1R	glucagon-like peptide 1 receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
1,321	GXYLT2	glucoside xylosyltransferase 2	unknown	other
1,331	BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	Cytoplasm	enzyme
1,347	HMCN1	hemimentin 1	Extracellular Space	other
1,367	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,382	TLR6	toll-like receptor 6	Plasma Membrane	transmembrane receptor
1,386	Gm4983	predicted gene 4983	unknown	other
1,39	SP110	SP110 nuclear body protein	Nucleus	other
1,39	SP110	SP110 nuclear body protein	Nucleus	other
1,401	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,426	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	Extracellular Space	other
1,428	GPR39	G protein-coupled receptor 39	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
1,436	SYNPO2	synaptopodin 2	Cytoplasm	other
1,443	THSD7A	thrombospondin, type I, domain containing 7A	unknown	other
1,444	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,475	Ifi204 (includes others)	interferon activated gene 204	Nucleus	transcription regulator
1,477	TEX15	testis expressed 15	Extracellular Space	other
1,503	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	Extracellular Space	cytokine
1,515	HMCN1	hemimentin 1	Extracellular Space	other
1,524	HMCN1	hemimentin 1	Extracellular Space	other
1,525	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,533	Csprs (includes others)	component of Sp100-rs	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
1,566	SLFN5	schlafen family member 5	Nucleus	enzyme
1,579	DPEP1	dipeptidase 1 (renal)	Cytoplasm	peptidase
1,596	HHIPL1	HHIP-like 1	unknown	other
1,652	HMCN1	hemimentin 1	Extracellular Space	other
1,657	DENND4A	DENN/MADD domain containing 4A	Nucleus	other
1,662	SCEL	sciellin	Cytoplasm	other
1,687	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Plasma Membrane	transporter
1,698	HMCN1	hemimentin 1	Extracellular Space	other
1,828	MARCI	mitochondrial amidoxime reducing component 1	Cytoplasm	enzyme
1,868	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1	Extracellular Space	other
1,872	Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4	Cytoplasm	enzyme
1,879	PAMR1	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1	Extracellular Space	peptidase
1,896	ASB5	ankyrin repeat and SOCS box containing 5	Nucleus	transcription regulator
1,9	CMAHP	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, pseudogene	Cytoplasm	enzyme
1,924	PTPRVP	protein tyrosine phosphatase, receptor type, V, pseudogene	Plasma Membrane	other
1,991	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	Cytoplasm	enzyme
1,993	PLA1A	phospholipase A1 member A	Extracellular Space	enzyme
2,027	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	Cytoplasm	peptidase
2,137	ATP12A	ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide	Plasma Membrane	transporter
2,207	Sp100	nuclear antigen Sp100	Nucleus	transcription regulator
2,373	PLAC8	placenta-specific 8	Nucleus	other
2,407	NPY6R	neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
2,521	RGS4	regulator of G-protein signaling 4	Cytoplasm	other
2,723	Gzmc	granzyme C	Cytoplasm	other
2,85	DIO3	deiodinase, iodothyronine, type III	Plasma Membrane	enzyme

3,518	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein	Extracellular Space	other
3,967	Ifi202b	interferon activated gene 202B	Nucleus	other
4,693	AKR1E2	aldo-keto reductase family 1, member E2	Cytoplasm	enzyme

Nota-se que a maioria de genes também está com expressão reduzida na comparação entre células satélites de camundongos *Large^{myd}* e *C57Black6*. Dos 361 genes, 126 estão super-expressos (34,9%), enquanto os 235 restantes estão com a expressão reduzida (65,1%) nas células de camundongos *Large^{myd}*. Existem alguns genes repetidos, já que os marcadores da lâmina de array são redundantes, ou seja, existem diversos marcadores para um só gene. Alguns outros genes exibem *splicing* alternativo e mais de um mRNA, portanto aparecem várias vezes na lista. O gene *Large*, mutado nestes animais, está com a expressão reduzida em células-satélite de camundongos *Large^{myd}*.

Tabela 22: Dados brutos da comparação entre *Lama2^{dy2J}/J* e *Large^{myd}*.

Fold Change	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
-1,954	Zfp125	zinc finger protein 125	Nucleus	transcription regulator
-1,632	LARGE MYD	like-glycosyltransferase	Cytoplasm	enzyme
-1,627	ANGPTL1	angiopoietin-like 1	Plasma Membrane	other
-1,595	Gm10002	predicted gene 10002	unknown	other
-1,549	GAS5	growth arrest-specific 5 (non-protein coding)	unknown	other
-1,525	MEOX1	mesenchyme homeobox 1	Nucleus	transcription regulator
-1,343	C10orf11	chromosome 10 open reading frame 11	unknown	other
-1,331	PTGIS	prostaglandin I2 (prostaglyclin) synthase	Cytoplasm	enzyme
-1,287	ACP1	acid phosphatase 1, soluble	Cytoplasm	phosphatase
-1,185	2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene	unknown	other
-1,06	B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	Cytoplasm	enzyme
-0,963	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)	Plasma Membrane	other
-0,855	MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	unknown	kinase
-0,804	Vmn1r90	vomer nasal 1 receptor 90	unknown	other
-0,709	GPR124	G protein-coupled receptor 124	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor
-0,693	2410018L13Rik	RIKEN cDNA 2410018L13 gene	unknown	other
-0,624	LTBP4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	Extracellular Space	growth factor
-0,607	HAUS8	HAUS augmin-like complex, subunit 8	Cytoplasm	other
-0,552	GLT25D1	glycosyltransferase 25 domain containing 1	Cytoplasm	other
-0,488	ALG9	asparagine-linked glycosylation 9, alpha-1,2-mannosyltransferase homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	enzyme
-0,447	HDAC1	histone deacetylase 1	Nucleus	transcription regulator
0,63	PP1L4	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4	Nucleus	enzyme
0,76	TRAPPC12	trafficking protein particle complex 12	unknown	other
0,953	HDHD3	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3	Cytoplasm	enzyme
0,955	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
0,985	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
0,992	FRZB	frizzled-related protein	Extracellular Space	other
0,992	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
1,027	Ifnz (includes others)	interferon zeta	Extracellular Space	cytokine
1,08	NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	Cytoplasm	enzyme
1,113	OCEL1	occludin/ELL domain containing 1	unknown	other
1,219	TLR6	toll-like receptor 6	Plasma Membrane	transmembrane receptor
1,232	Gm4983	predicted gene 4983	unknown	other
1,35	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Plasma Membrane	transporter
1,383	BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	Cytoplasm	enzyme
1,525	Hdac9	histone deacetylase 9	Nucleus	transcription regulator
1,723	PTPRVP	protein tyrosine phosphatase, receptor type, V, pseudogene	Plasma Membrane	other
2,65	PAMR1	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1	Extracellular Space	peptidase
3,8	Ifi202b	interferon activated gene 202B	Nucleus	other

Não observamos neste grupo predominância marcante de genes com expressão reduzida/aumentada. Dos 39 genes, 18 estão super-expressos em *Large^{myd}* (46%) enquanto os 21 restantes estão com a expressão reduzida em *Large^{myd}* (53%), quando os dados de expressão gênica das células da linhagem *Large^{myd}* é comparada a expressão gênica medida nas células *Lama2^{dy2J}/J*.

O programa IPA pode, então, analisar os dados brutos e criar redes de relação entre as moléculas que estão diferencialmente expressas. Essas redes podem ser mais ou menos enriquecidas e podemos utilizar parâmetros para tentar elencar redes que sejam mais relevantes aos nossos estudos, ao invés de trabalhar com a lista completa de genes diferencialmente expressos. Isto é importante pois já sabemos que a distrofia e a lesão celular que causa podem interferir de maneira indireta em vias de sinalização e metabolismo celular não relacionadas ao defeito primário ou tecido-alvo. Além disso, elimina-se genes com função desconhecida ou predita, sem observação na literatura.

Realizamos então um primeiro filtro, apenas determinando que o tecido de origem foi músculo esquelético, visto que estamos trabalhando com células provenientes deste tecido. Com este filtro, reduzimos a quantidade de moléculas avaliadas nas vias, conforme tabela abaixo.

Tabela 23: Quantidade de genes diferencialmente expressos selecionados, antes e após filtro.

	<i>C57Black6</i> x <i>Lama2^{dy2J}/J</i>	<i>C57Black6</i> x <i>Large^{myd}</i>	<i>Lama2^{dy2J}/J</i> x <i>Large^{myd}</i>
Inicial	110 (107 conhecidos)	383 (294 conhecidos)	39 (36 conhecidos)
Após filtro - origem muscular	62	160	22

Para facilitar a análise, comparamos os resultados das três análises pareadas.

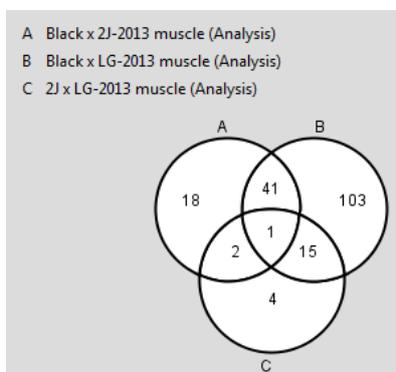


Figura 30: Diagrama de Venn comparando as moléculas obtidas em cada uma das análises.

Neste diagrama de Venn, os números dentro de cada círculo representam a quantidade de genes que estão na intersecção entre dois grupos. Inicialmente, podemos verificar quais moléculas são únicas de cada uma das análises, ou seja, as que dão a característica de cada uma das diferentes distrofias.

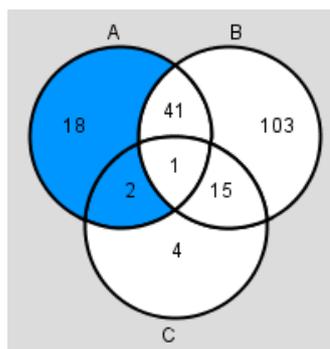


Figura 31: Diagrama de Venn ilustrando o grupo de genes diferencialmente expressos apenas nos animais *Lama2^{dy2J}/J*.

Neste grupo selecionado, dos genes alterados apenas nos animais *Lama2^{dy2J}/J*, foram identificados 20 genes, sendo 4 ainda caracterizados, como podemos ver na tabela 24 abaixo.

Tabela 24: Genes diferencialmente expressos identificados apenas nos animais *Lama2^{dy2J}/J*.

Symbol	Entrez Gene Name
ADRA2A	--
ASIC3	acid-sensing (proton-gated) ion channel 3
CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase
CP	ceruloplasmin (ferroxidase)
EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
GLRB	glycine receptor, beta
Gm10002	predicted gene 10002
GRIK5	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
LRRC8B	leucine rich repeat containing 8 family, member B
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
NNT	--
NRN1	--
PALMD	palmdelphin
PCDH20	protocadherin 20
SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6
TMEM154	transmembrane protein 154
WDFY1	--

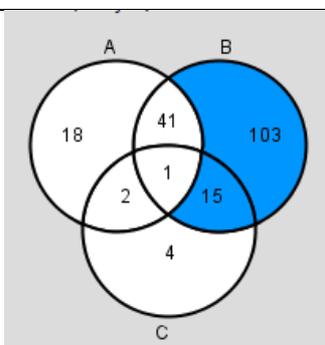


Figura 32: Diagrama de Venn ilustrando o grupo de genes diferencialmente expressos apenas nos animais *Large^{myd}*.

Neste grupo selecionado, dos genes alterados apenas nos animais *Large^{myd}*, foram identificados 118 genes, sendo 11 ainda não mapeados, como podemos ver na tabela abaixo.

Tabela 25: Genes diferencialmente expressos identificados apenas nos animais *Large^{myd}*.

Symbol	Entrez Gene Name
2700079J08Rik	RIKEN cDNA 2700079J08 gene
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
ACP1	acid phosphatase 1, soluble
APLN	apelin
AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)
ASB5	ankyrin repeat and SOCS box containing 5
ATP10A	ATPase, class V, type 10A
ATP12A	ATPase, H+/K+ transporting, nongastric, alpha polypeptide
ATXN7L1	ataxin 7-like 1
BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
C3	complement component 3
C10orf11	chromosome 10 open reading frame 11
C130021I20Rik	Riken cDNA C130021I20 gene
C330024D21Rik	RIKEN cDNA C330024D21 gene
CA9	carbonic anhydrase IX
CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
Chr2	--
CD109	CD109 molecule
CD200	CD200 molecule
CISH	cytokine inducible SH2-containing protein
CLEC11A	C-type lectin domain family 11, member A
CMAHP	--
COMP	--
CPM	carboxypeptidase M
CRABP1	cellular retinoic acid binding protein 1
CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4
CYGB	cytoglobin
DENND4A	--
DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila)
DPEP1	dipeptidase 1 (renal)
EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
EYA2	eyes absent homolog 2 (Drosophila)
FBLN1	fibulin 1
FLRT3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
FRZB	frizzled-related protein
GAREM	GRB2 associated, regulator of MAPK1
GAS5	growth arrest-specific 5 (non-protein coding)
GDA	guanine deaminase
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa
GJB2	gap junction protein, beta 2, 26kDa
GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
GLP1R	glucagon-like peptide 1 receptor
Gm4983	predicted gene 4983
Gm15698	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 pseudogene
GPR39	G protein-coupled receptor 39
GPRC5A	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A
GREM2	gremlin 2, DAN family BMP antagonist
Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4
Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6
GXYLT2	glucoside xylosyltransferase 2

HHIP	hedgehog interacting protein
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
HMCN1	hemicentin 1
HTR2A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A, G protein-coupled
Ifi202b	interferon activated gene 202B
Ifi204 (includes others)	interferon activated gene 204
Ifnz (includes others)	interferon zeta
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
IL16	interleukin 16
IL33	interleukin 33
IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1
IRF1	interferon regulatory factor 1
ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
KLHDC8A	kelch domain containing 8A
LARGEMYD	--
LGR4	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4
LHX9	LIM homeobox 9
LIF	leukemia inhibitory factor
LMO7	LIM domain 7
LPHN2	latrophilin 2
MAOB	monoamine oxidase B
MBNL3	muscleblind-like splicing regulator 3
MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1
MDK	midkine (neurite growth-promoting factor 2)
MEOX1	mesenchyme homeobox 1
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4
MGP	matrix Gla protein
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2
MOGAT2	monoacylglycerol O-acyltransferase 2
NAV1	--
NPY6R	--
Olfir56	olfactory receptor 56
PAMR1	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1
PCDH11X/PCDH11Y	protocadherin 11 X-linked
Plac9b	placenta specific 9b
PRSS35	protease, serine, 35
PTPRVP	--
Raet1b	retinoic acid early transcript beta
RBPM5	RNA binding protein with multiple splicing
RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)
RGS4	regulator of G-protein signaling 4
RGS17	regulator of G-protein signaling 17
RPL39L	ribosomal protein L39-like
SCEL	sciellin
SCXA/SCXB	scleraxis homolog A (mouse)
SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
SERINC2	serine incorporator 2
SIX2	SIX homeobox 2
SLC25A45	solute carrier family 25, member 45
SLC35G2	solute carrier family 35, member G2
SLFN5	schlafen family member 5
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor
SMPDL3B	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B
SNORD22	small nucleolar RNA, C/D box 22
SP110	SP110 nuclear body protein
SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein
TEX15	testis expressed 15
TGFB3	transforming growth factor, beta 3
THBS4	thrombospondin 4

THSD7A	thrombospondin, type I, domain containing 7A
TLR6	toll-like receptor 6
TNFAIP6	--
Trim30a/Trim30d	--
TTC9	tetratricopeptide repeat domain 9
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
Zfp125	zinc finger protein 125
ZNF41	--

Identificamos também as moléculas que apareceram tanto na análise entre *C57Black6* e *Lama2^{dy2J}/J* quanto na análise entre *C57Black6* e *Large^{myd}*. Estas moléculas em comum provavelmente estão relacionadas com a característica distrófica destes animais, independentemente da mutação que carregam.

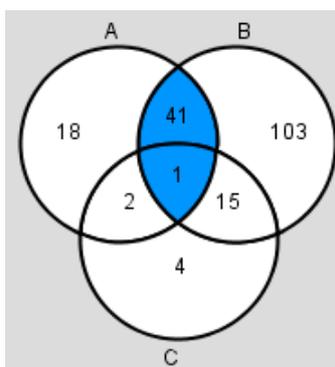


Figura 33: Diagrama de Venn ilustrando o grupo de genes diferencialmente expressos tanto nos animais *Lama2^{dy2J}/J* quanto nos animais *Large^{myd}*.

Nestes animais foram encontrados 42 genes, sendo que uma delas ainda não está mapeada.

Tabela 26: Genes diferencialmente expressos identificados nas duas linhagens distróficas.

Symbol	Entrez Gene Name
ADCY2	adenylate cyclase 2 (brain)
AKR1E2	aldo-keto reductase family 1, member E2
ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
ANGPTL7	angiopoietin-like 7
ANXA8L2 (includes others)	annexin A8-like 2
CAPN6	calpain 6
CCDC85A	coiled-coil domain containing 85A
Csprs (includes others)	--
DCN	decorin
DIO3	deiodinase, iodothyronine, type III
EFNB1	ephrin-B1
ESM1	endothelial cell-specific molecule 1
EZR	ezrin
GALNT14	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GalNAc-T14)
GRB14	growth factor receptor-bound protein 14
GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)
HHPL1	HHIP-like 1
HS6ST2	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2
LCN2	lipocalin 2
LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1

MAB21L2	mab-21-like 2 (<i>C. elegans</i>)
MARCI	mitochondrial amidoxime reducing component 1
MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2
MGLL	monoglyceride lipase
MKX	mohawk homeobox
MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2
PENK	proenkephalin
PLA1A	phospholipase A1 member A
PLAC8	placenta-specific 8
PRG4	proteoglycan 4
PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase
RARRES1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 3
SLC38A1	solute carrier family 38, member 1
SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2
Sp100	nuclear antigen Sp100
SYNPO2	synaptopodin 2
TBX4	T-box 4
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b

Por fim, é possível também identificar um grupo onde existem genes que estão diferentes entre as duas linhagens distróficas mas não entre cada uma delas e o controle.

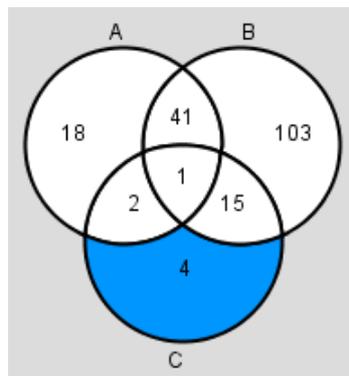


Figura 34: Diagrama de Venn ilustrando o grupo de genes diferencialmente expressos tanto nos animais *Lama2^{dy21/J}* quanto nos animais *Large^{myd}*, porém que não deram diferencialmente expressos entre cada linhagem distrófica e o controle.

Foram identificados 4 genes, sendo que um deles não está mapeado. Este grupo é dos genes que estão subexpressos em uma das linhagens e superexpressos na outra. Quando cada linhagem é comparada com o controle a diferença na expressão destes quatro genes não é suficientemente significativa.

Tabela 27: Genes diferencialmente expressos identificados nas duas linhagens distróficas porém não quando comparadas ao controle.

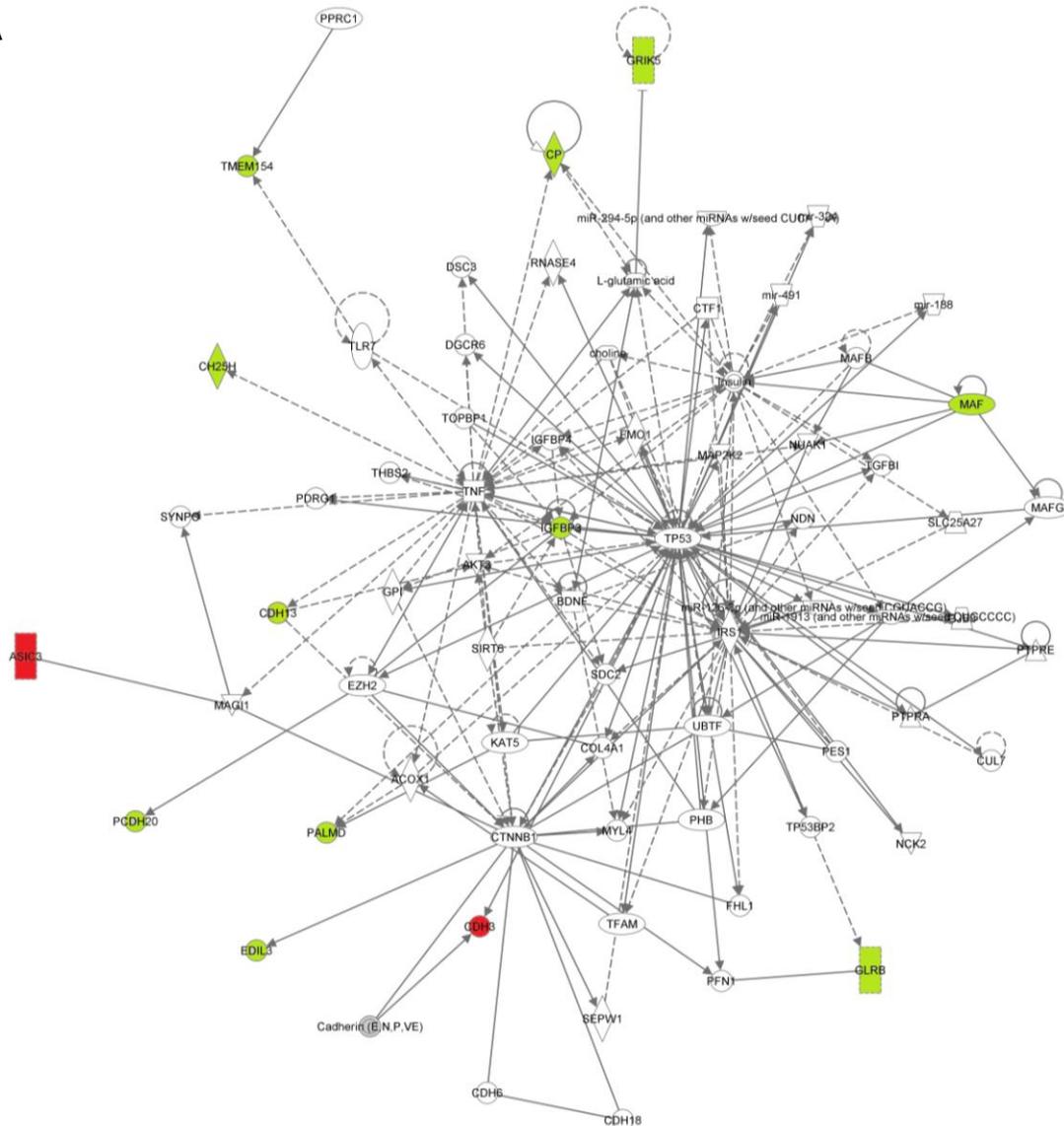
© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.	
Symbol	Entrez Gene Name
ANGPTL1	angiopoietin-like 1
B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
Hdac9	--
OCEL1	occludin/ELL domain containing 1

De um modo geral, o que podemos perceber destes genes é que a mutação presente nos animais *Large^{myd}* está alterando muito mais vias do que a mutação em *Lama2*. Também podemos verificar que a situação de um gene subexpresso em um dos modelos e superexpresso no outro modelo é um evento raro, que aconteceu apenas com 4 genes.

Para aprofundar a análise destes genes é possível buscar vias nas quais eles estão envolvidos, todas com referências em literatura e automaticamente selecionadas pelo IPA com base em parâmetros que podemos especificar. Para conseguirmos o maior número possível de vias, decidimos especificar apenas o tecido de origem, muscular. Também é possível conseguir as principais funções das vias levantadas e para auxiliar na compreensão destes dados tentaremos relacionar com as 5 funções mais representadas.

Iniciamos com os 20 genes diferencialmente expressos identificados apenas nos animais *Lama2^{dy2J}/J*. Abaixo, um panorama geral das relações entre os genes e os níveis de expressão identificados.

A



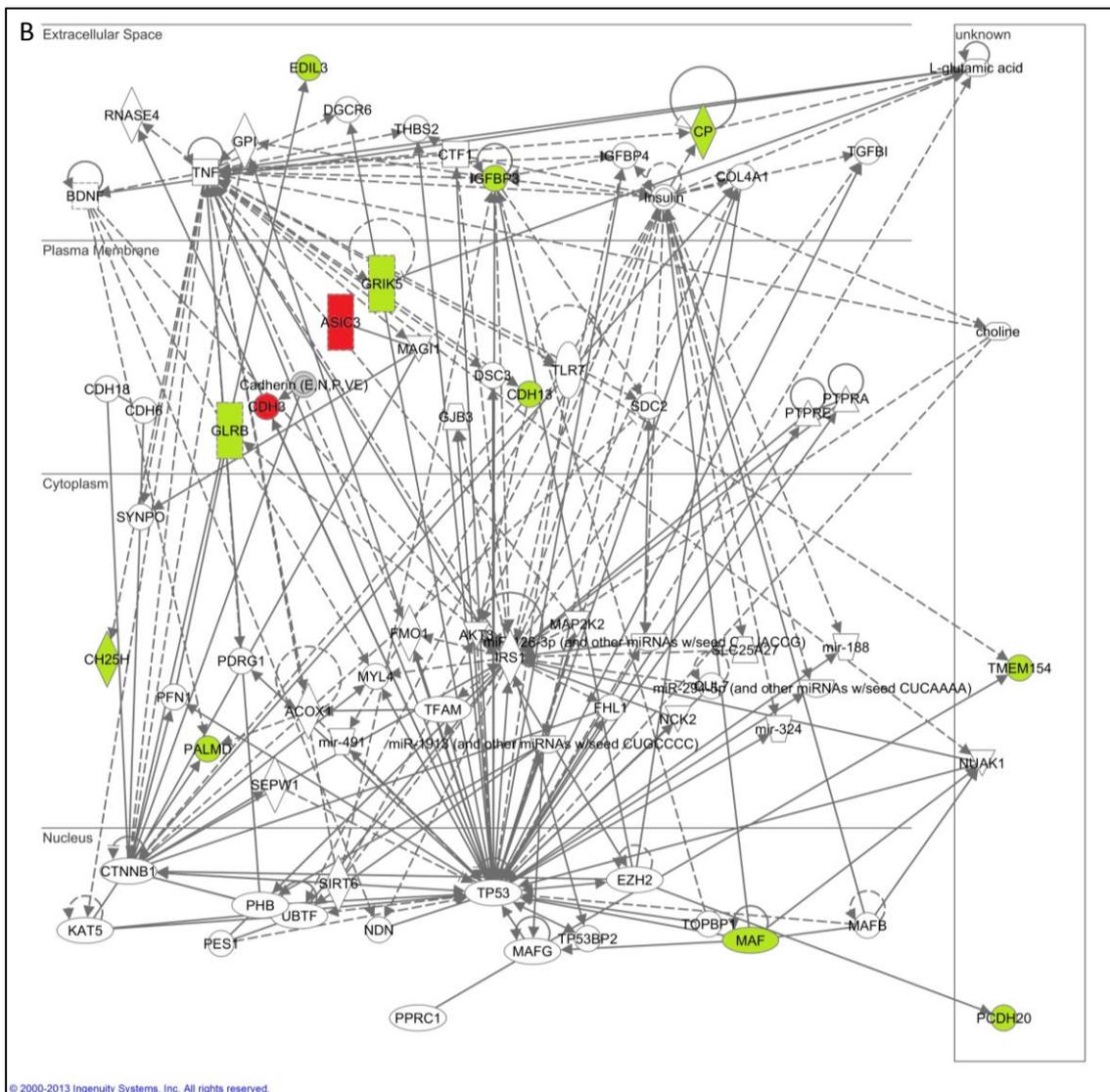
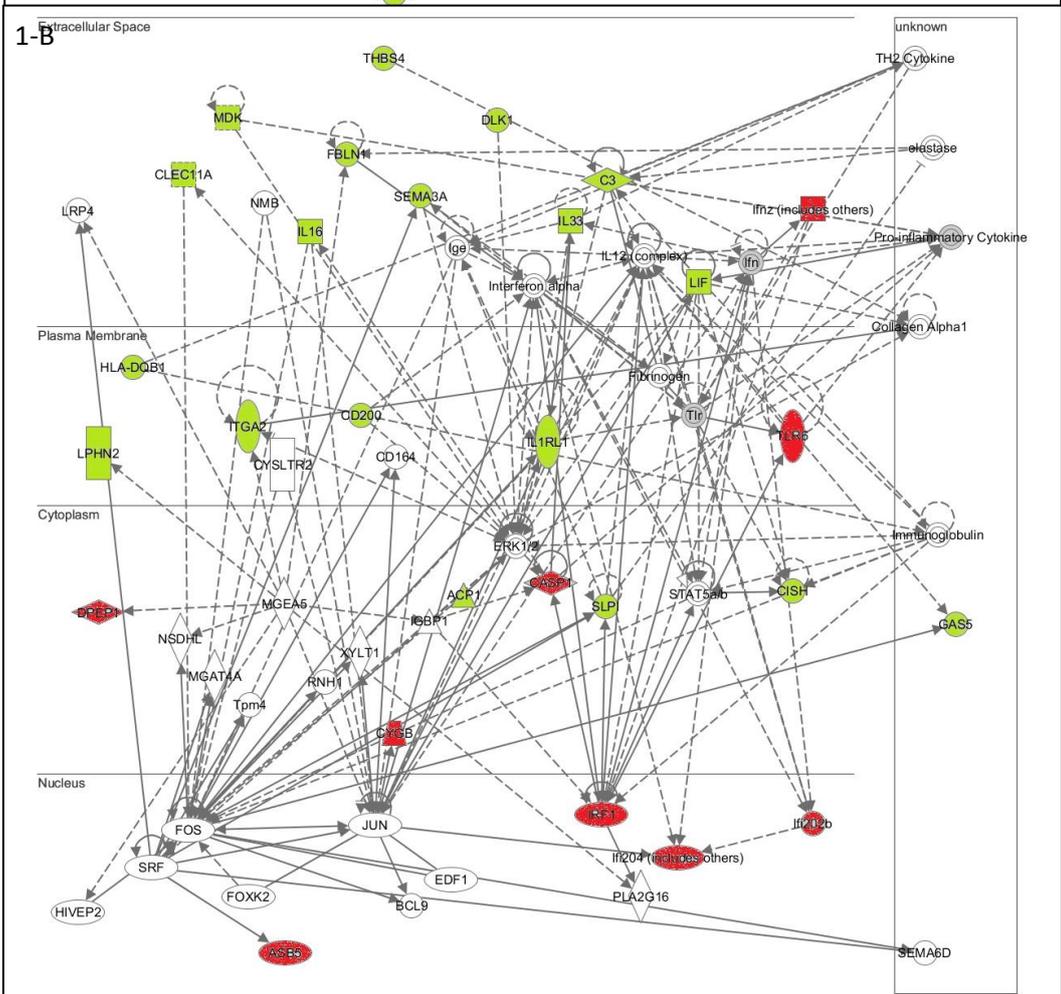
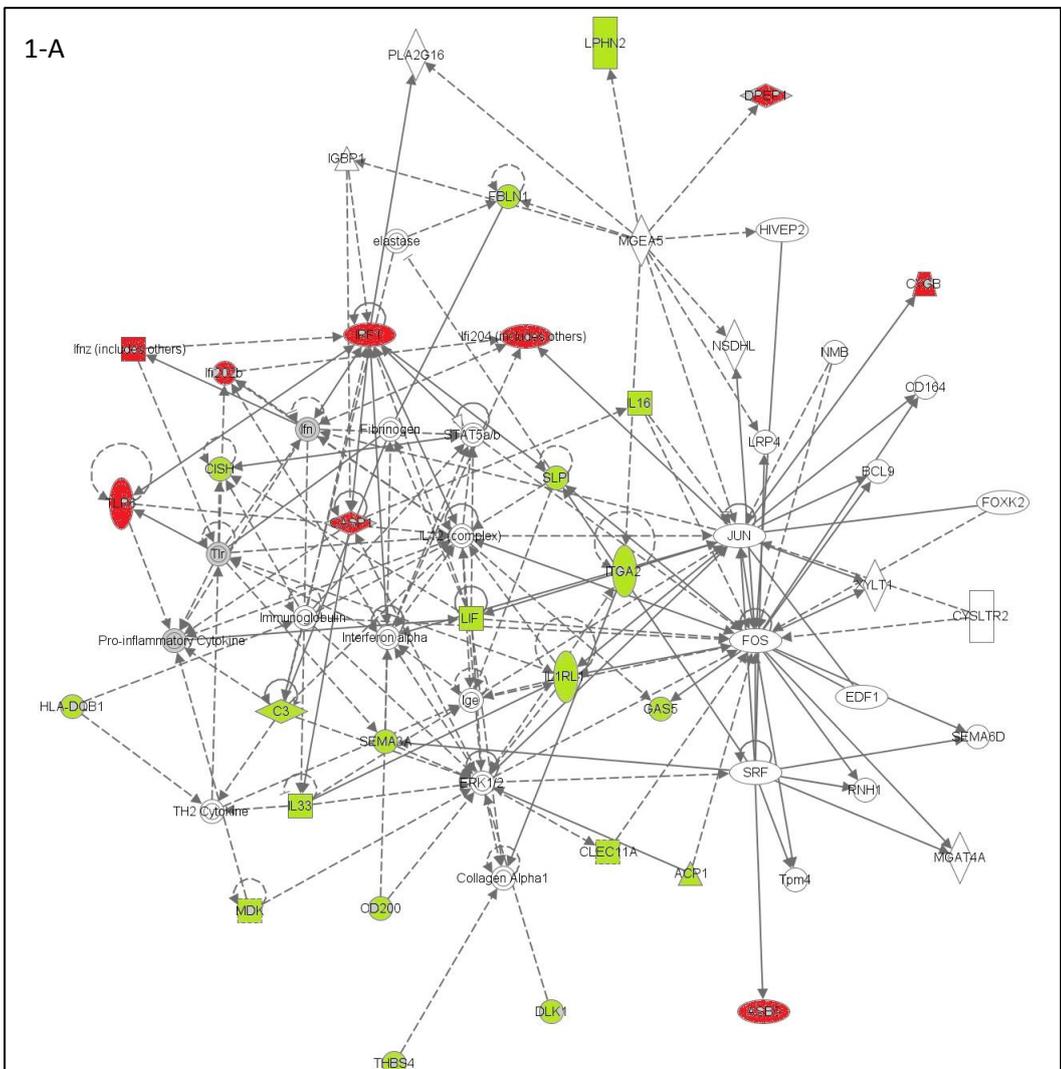


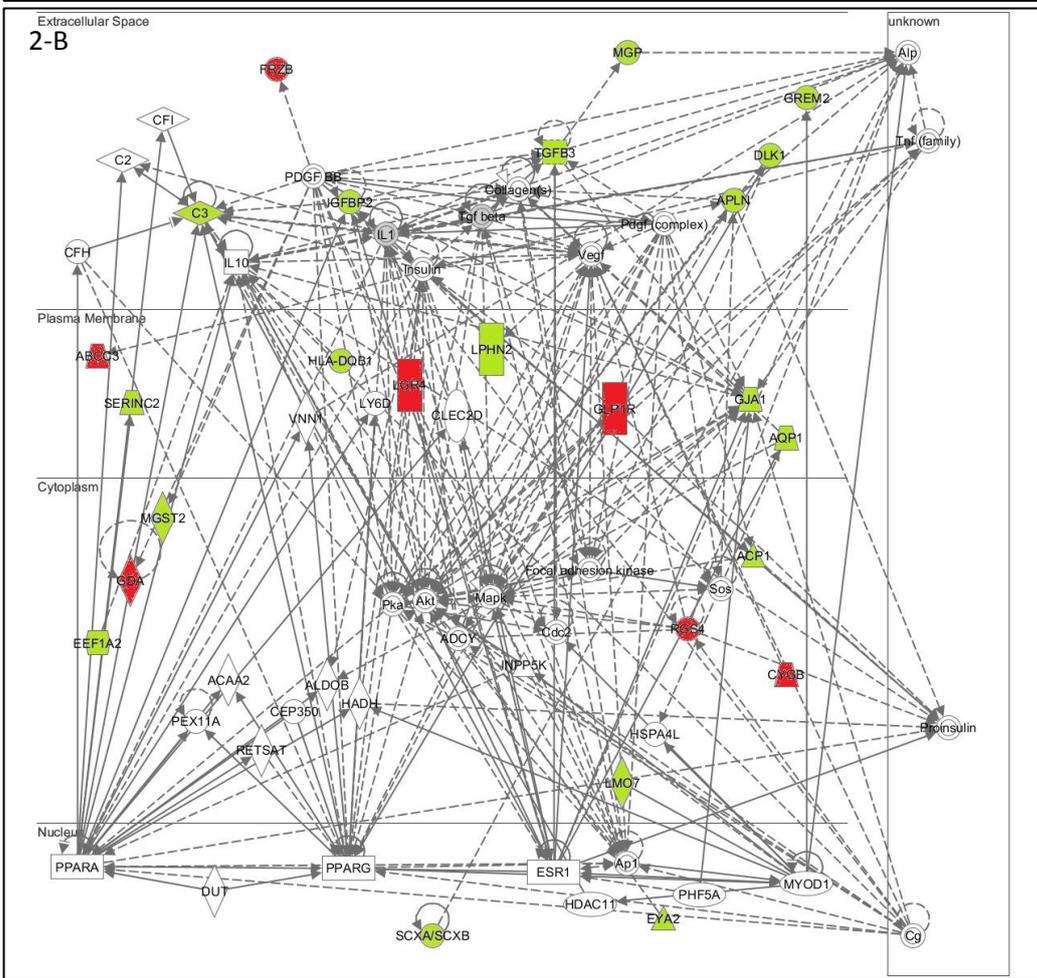
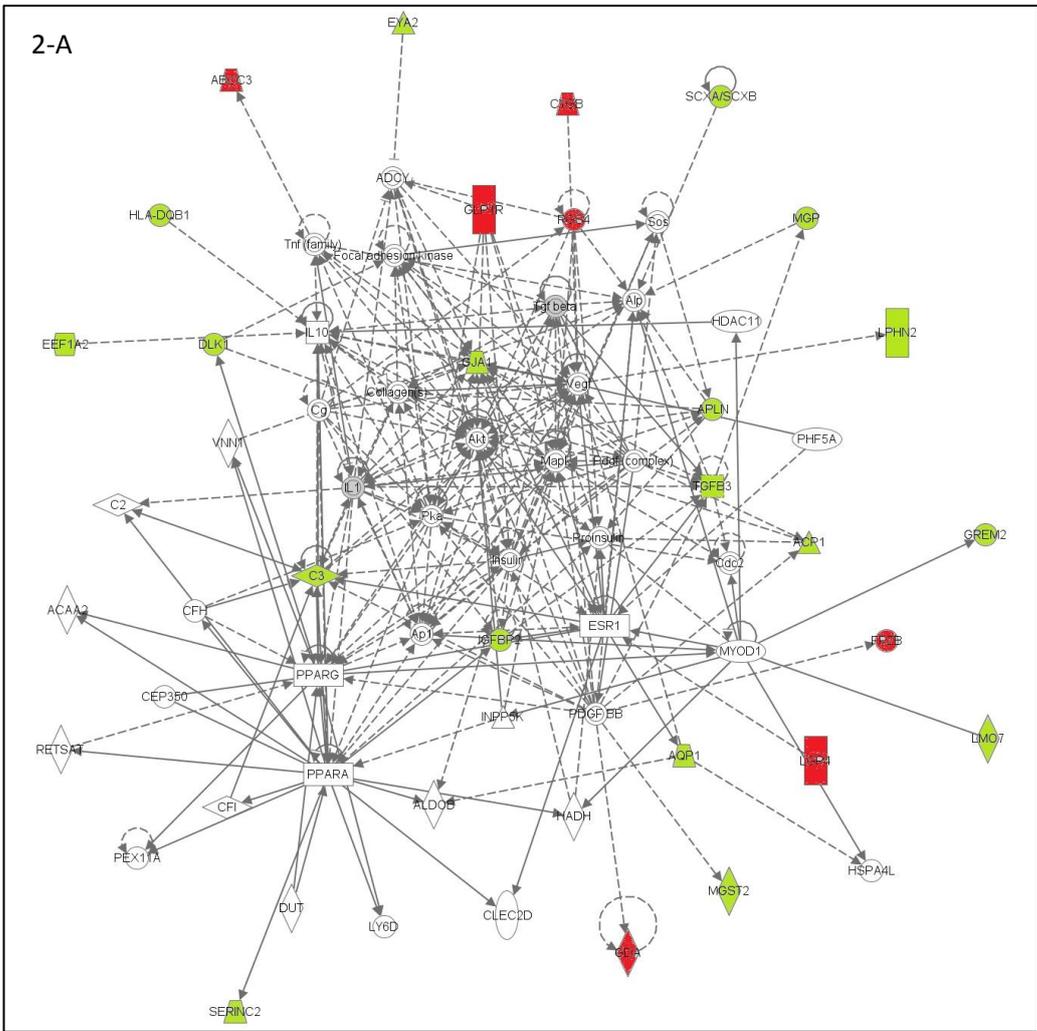
Figura 35: Ilustração dos genes diferencialmente expressos identificados apenas na linhagem *Lama2^{dy21}/J*. Em A, estão as moléculas relacionadas e em B, o espaço celular onde residem. Em verde, genes com expressão reduzida e em vermelho genes com expressão aumentada.

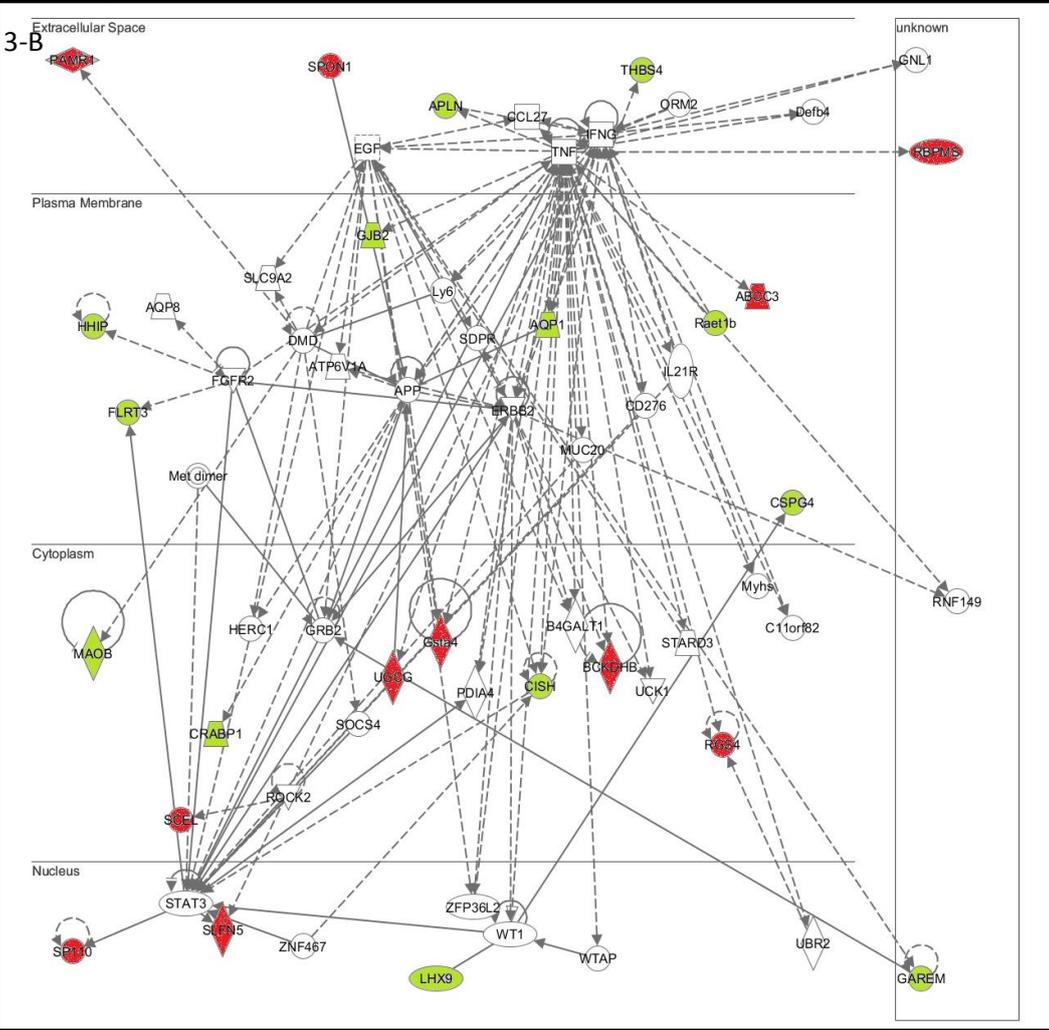
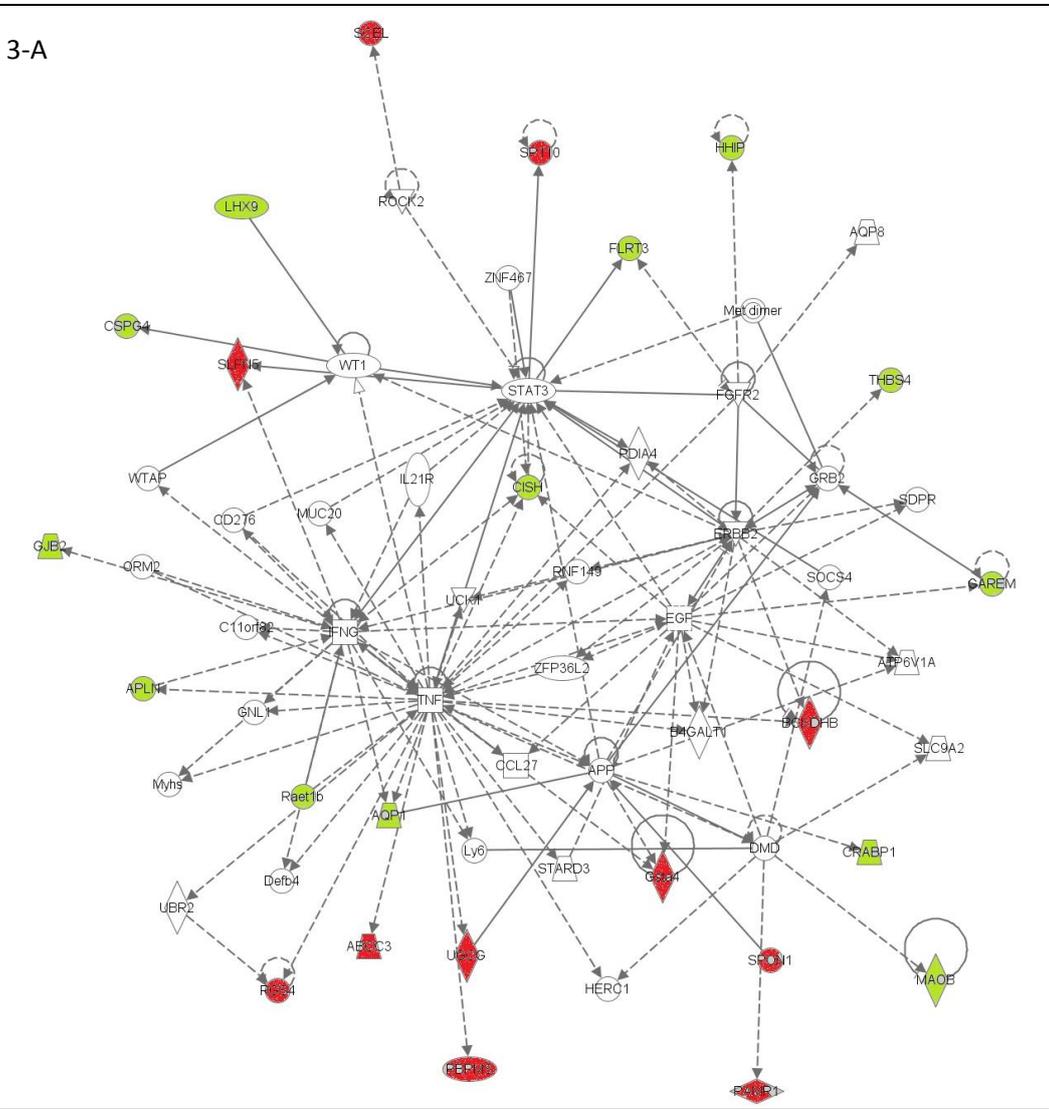
Os gráficos sugerem um maior envolvimento de proteínas de membrana plasmática e matriz extracelular neste modelo. Isto condiz com o esperado, visto que a subunidade da proteína mutada neste modelo é uma das responsáveis pela ligação de proteínas de membrana à matriz extracelular no músculo.

Dentre as principais funções selecionadas, estão morte celular por apoptose, proliferação de células e necrose. Além disso, alguns destes genes estão relacionados com movimento celular e migração de células. Embora nesta via tenhamos dois genes superexpressos, estes são periféricos e provavelmente não mudam o comportamento da célula. Genes com baixa expressão estão tanto na periferia quanto no centro das vias.

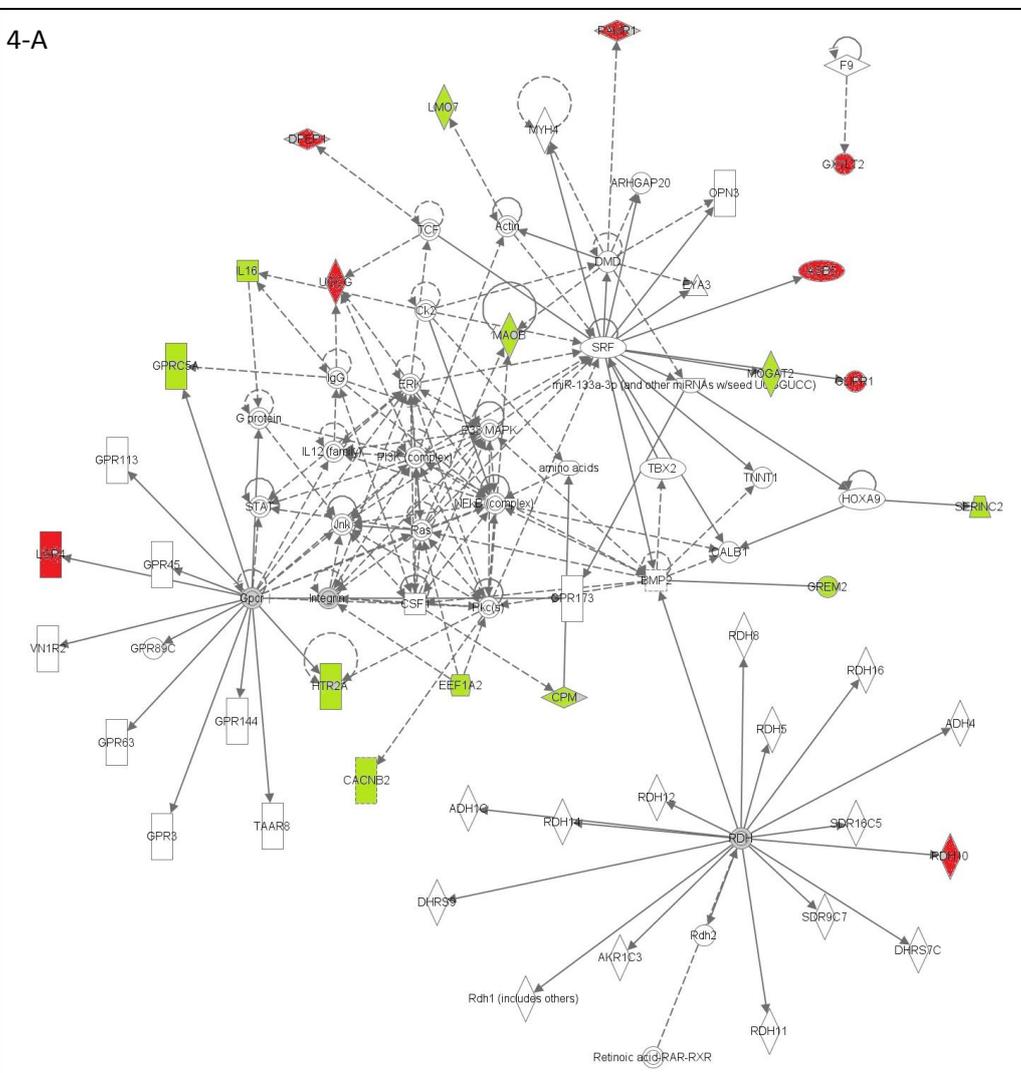
Este tipo de análise, no modelo *Large^{myd}*, é muito mais complexo, visto que a quantidade de genes diferencialmente expressos selecionados foi muito maior. Apenas a título de exemplo, abaixo estão os gráficos gerados para esta linhagem.







4-A



4-B

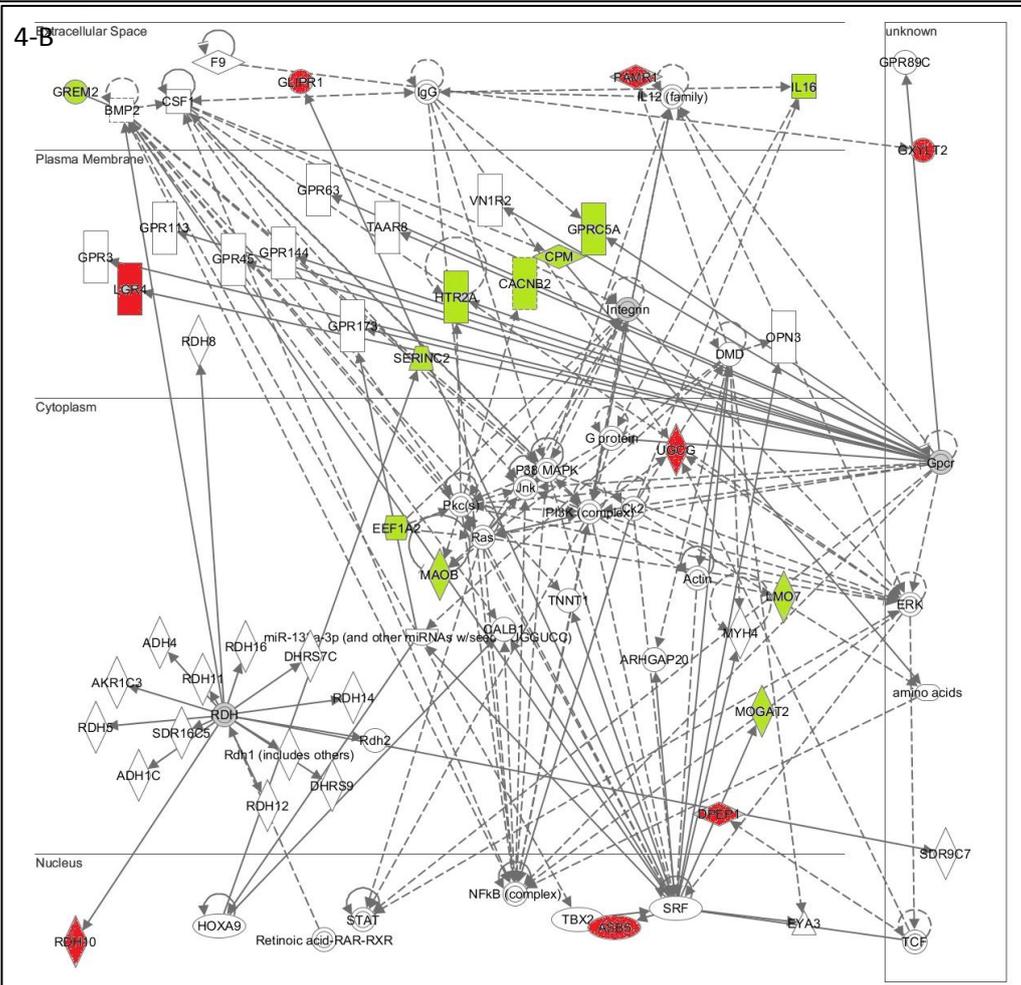
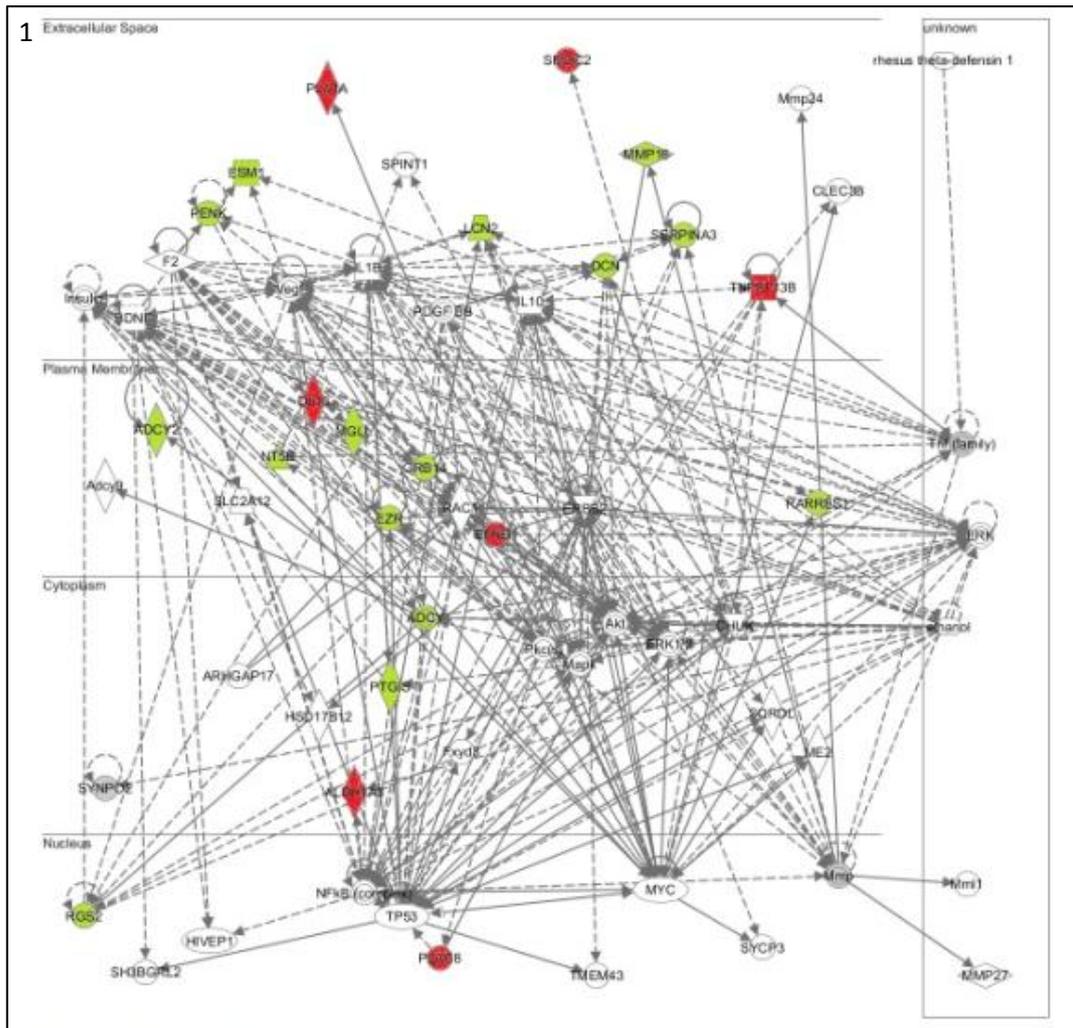


Figura 36: Ilustração dos genes diferencialmente expressos identificados apenas na linhagem *Large^{myd}*. Em A, estão as moléculas relacionadas e em B, o espaço celular onde residem. Em verde, genes com expressão reduzida e em vermelho genes com expressão aumentada. Cada número (1-4) corresponde a uma via diferente.

No modelo *Large^{myd}*, de maneira bem geral e simplificada, o que podemos verificar é o envolvimento de diversas cascatas, tanto com ativação como com desligamento de vias. Muitas funções diferentes estão envolvidas, inclusive algumas relacionadas com diferenciação, migração, proliferação e morte celular.

O que as duas linhagens distróficas possuem em comum pode ser resumido nos diagramas abaixo.



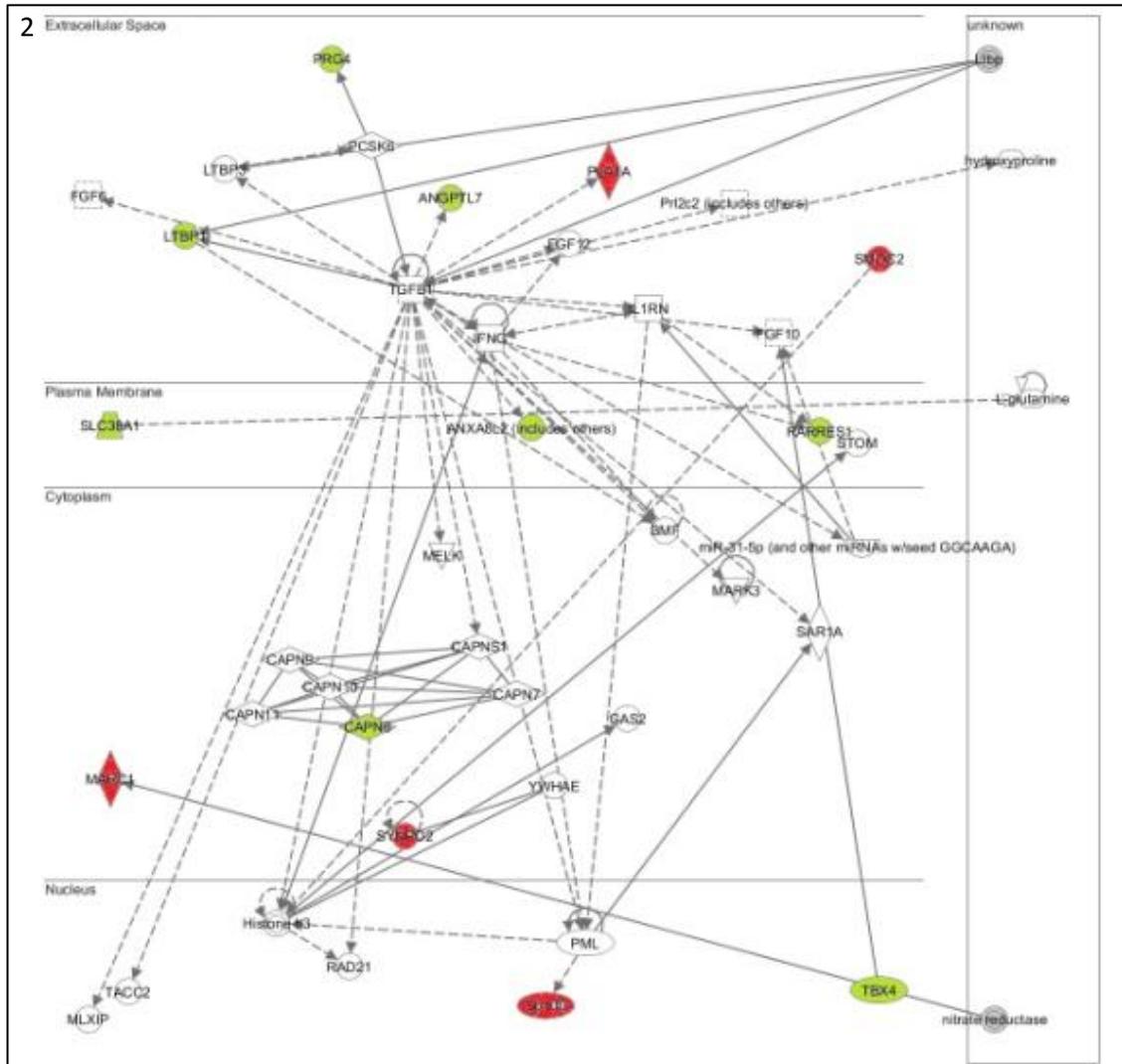


Figura 37: Ilustração dos genes diferencialmente expressos identificados nos dois modelos distróficos. Em verde, genes com expressão reduzida e em vermelho genes com expressão aumentada.

Os animais distróficos apresentam, em sua maioria, genes com expressão reduzida, sendo as principais funções relacionadas com a progressão do ciclo celular, resposta inflamatória, síntese de DNA e fibrose. Estas funções levantadas estão de acordo com resultados anteriores de nosso grupo, além de serem confirmados pelas alterações causadas nos tecidos distróficos. Mais interessante, estes sinais estão sendo enviados pelas próprias células que seriam responsáveis pelo reparo do tecido.

No grupo onde alguns genes estavam com expressão aumentada em uma linhagem e reduzida no outro modelo existem apenas três genes identificados: ANGPTL1 (expressão reduzida no *Large^{myd}*), B3GNT5 (expressão reduzida no *Large^{myd}*) e OCEL1 (expressão aumentada no *Large^{myd}*).

O gene ANGPTL1 tem como função principal a sinalização para a formação de vasos. Este gene pertence à família de fatores de crescimento endoteliais vasculares e é expresso em

uma vasta quantidade de tecidos. Alguns estudos *in vitro* mostram que este fator secretado não é um mitógeno endotelial.

B3GNT5 é uma enzima que transfere galactosil-N-acetilglicosaminil para substratos de glicolípides e participa do processamento de O-glicanos. O fato desta enzima estar subexpressa em animais *Large^{myd}* é extremamente interessante visto que a enzima *Large* também participa destes processos de O-glicosilação.

Para tornar os dados obtidos mais robustos e tentar esclarecer ainda mais a participação dos genes nos processos complexos envolvidos, realizamos o cruzamento das listas de genes diferencialmente expressos, sem nenhum tipo de filtro, com o banco de dados MADMuscle (Baron, Dubois, *et al.*, 2011).

A análise comparativa cria um *ranking* com os genes que tiveram similaridade com os grupos do banco de dados, além de listar as principais funções envolvidas com os genes diferencialmente expressos.

Selecionando apenas aquelas vias onde o ranking foi maior de 50, temos que na análise que compara os animais *Lama2^{dy2J}/J* com *C57Black6* e *Large^{myd}* com *C57Black6* temos o envolvimento de transporte mediado por vesícula / migração celular / matriz extracelular / regulação de qualidade biológica.

Apesar de serem as mesmas funções os genes com sobreposição foram outros: *Adcy2* / *Aldh1a3* / *Angptl7* / *Bcl6b* / *Capn6* / *Ccdc85a* / *Cdh13* / *Ch25h* / *Cp* / *Cx3c11* / *Dab2* / *Dcn* / *Edil3* / *Efnb1* / *Esm1* / *Fbn1* / *Gja1* / *Glr* / *Grik5* / *Il16* / *Lcn2* / *Ltbp1* / *Mab2112* / *Map3k8* / *Mef2c* / *Mgll* / *Mmp16* / *Myo1d* / *Nfkb1a* / *Nt5e* / *Palmd* / *Pcdh20* / *Pitx1* / *Pla1a* / *Plac8* / *Prg4* / *Prrx1* / *Rcan1* / *Rgs2* / *Slc24a6* / *Slc25a45* / *Smoc2* / *Sp100* / *Tgfb3* / *Tnfaip8* / *Tnfsf13b* / *Wdfy1* (47) em *Lama2^{dy2J}/J*.

Adamts1 / *Adcy2* / *Aldh1a3* / *Angptl7* / *Aqp1* / *Arf6* / *Atp10a* / *Bambi* / *Bckdhb* / *C3* / *Trim21* / *Capn6* / *Casp1* / *Cbr2* / *Ccdc85a* / *Cd200* / *Cd99* / *Cdr2l* / *Chst1* / *Cish* / *Clec11a* / *Cmah* / *Cndp2* / *Col11a1* / *Comp* / *Cspg4* / *Cygb* / *Dcn* / *Dlk1* / *Dnm1* / *Dpep1* / *Eef1a2* / *Efnb1* / *Emp2* / *Erap1* / *Esm1* / *Eya2* / *Fbln1* / *Fgl2* / *Fndc4* / *Frzb* / *Gas5* / *Gda* / *Gja1* / *Gjb2* / *Gpx3* / *Grik5* / *Gypc* / *Il16* / *Il33* / *Irf1* / *Lcn2* / *Leprot* / *Lgals9* / *Lif* / *Ltbp1* / *Lyn* / *Mab2112* / *Map3k6* / *Map3k8* / *Mdk* / *Meox1* / *Mfap4* / *Mgll* / *Mgp* / *Mmp16* / *Mpp7* / *Myo1d* / *Nr4a2* / *Nt5e* / *Ocel1* / *Parp14* / *Pde2a* / *Pitx1* / *Pla1a* / *Plac8* / *LOC100039246* / *Plau* / *Plcb4* / *Pls3* / *Prg4* / *Prrx1* / *Prss35* / *Psd3* / *Ptprk* / *Rbpms* / *Rdh10* / *Rgs2* / *Rgs4* / *Rnasel* / *Rnd3* / *Rpl39l* / *Rps24* / *Rad* / *Sdc4* / *Sema3f* / *Sepw1* / *Slc25a45* / *Smarca1* / *Smoc2* / *Sp100* / *LOC100041034* / *Spon1* / *Sspn* / *Tceal6* / *Tfpi* / *Tgfb3* / *Thbs4* / *Tll1* / *Tlr6* / *Tmem140* / *Tnfaip6* / *Tnfsf13b* / *Tuba8* / *Usp11* (115) em *Large^{myd}*.

Na análise que comparou *Lama2^{dy2J}/J* com *Large^{myd}* foram selecionadas duas vias: uma relacionada com fosforilação oxidativa / transporte de elétrons pela mitocôndria/NADH (15 genes) e processo metabólico de ácidos graxos / beta-oxidação de ácidos graxos / mecanismos

anti-apoptose / processo metabólico monocarboxílico (13 genes). Foi muito interessante termos encontrado processos associados à mitocôndria, pois em nenhuma destas distrofias sabe-se do envolvimento desta organela no processo distrófico.

e. Validação por Q-PCR do gene *LARGE*

Apesar da técnica de *microarray* já estar bem estabelecida e ser bastante reprodutível, adota-se como padrão ouro a validação de alguns genes selecionados entre os diferencialmente expressos pela técnica de Real Time PCR. O resultado de expressão semelhante obtido por uma técnica diferente serve para confirmar que os dados obtidos são verdadeiramente resultado da expressão gênica analisada e não um artefato.

As amostras de RNA extraído previamente foram novamente quantificadas para a síntese de cDNA.

Tabela 28: Quantificação de RNA para a síntese de cDNA necessária ao Q-PCR. Amostras sinalizadas em amarelo não possuíam quantidade suficiente (volume) para prosseguir na reação.

	µg/mL
BL-01	214,70
BL-05	123,30
BL-08	129,40
BL-11	208,90
BL-14	394,60
BL-15	297,20
BL-16	236,30
BL-17	259,80
BL-18	373,60
BL-19	201,60
2J-75	160,00
2J-76	161,20
2J-78	192,20
2J-87	291,00
2J-88	173,00
2J-89	106,80
2J-90	368,20
LG-021	307,90
LG-024	219,70
LG-025	261,10
LG-027	121,40
LG-028	294,90
LG-055	147,40
LG-056	244,10
LG-073	302,70
LG-108	123,90
LG-109	154,10

As amostras sinalizadas em amarelo não possuíam quantidade de RNA suficiente para a síntese de cDNA, portanto não puderam prosseguir para a validação. Passamos, então, à síntese de cDNA com as amostras restantes, que foram então amplificadas:

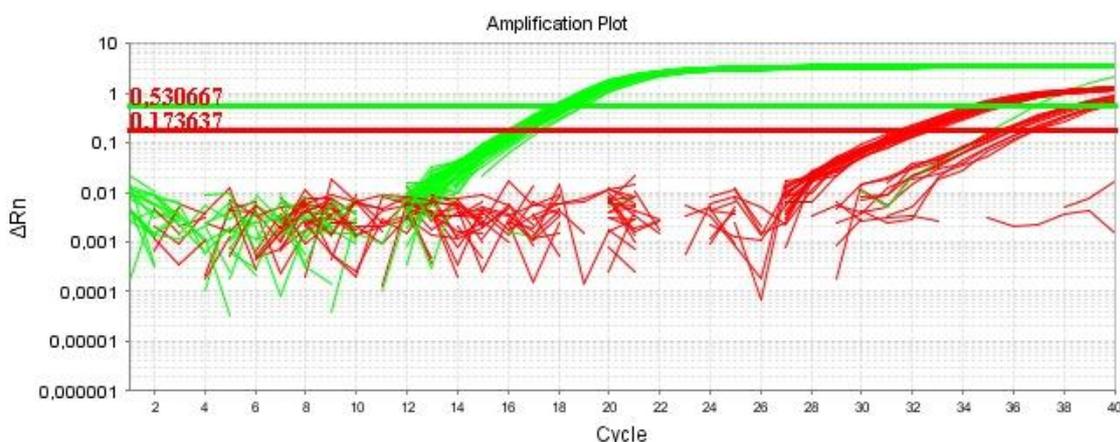


Figura 38: Amplificação das amostras das três linhagens estudadas. Em verde o gene Gapdh e em vermelho o gene *Large*.

Passamos, então, para a quantificação relativa das amostras. O *threshold* escolhido para os cálculos foi automaticamente selecionado pelo programa. Após a quantificação, a diferença obtida entre os grupos foi testada quanto à sua significância através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

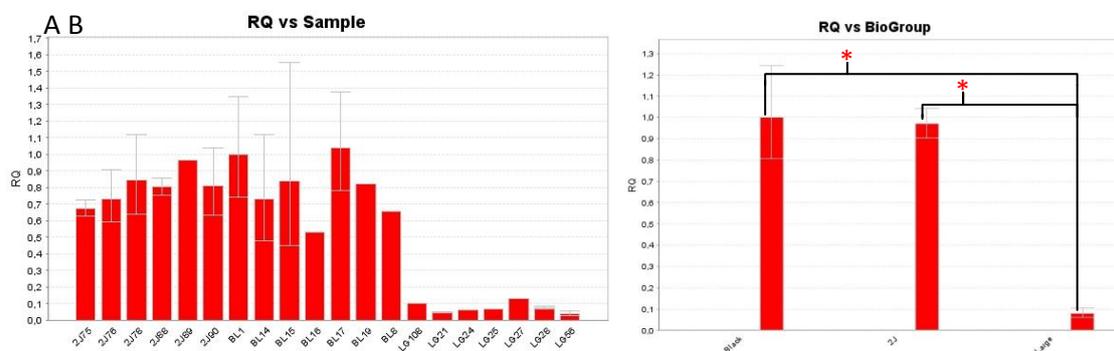


Figura 39: Quantificação relativa da expressão do gene *Large* nas diferentes amostras estudadas (A) ou média da expressão relativa nos grupos (B). No asterisco, $p < 0,05$.

Pudemos confirmar, com estes resultados, a reprodutibilidade e confiabilidade dos experimentos de *microarray*, visto que os valores de expressão obtidos para os animais *Large^{myd}* através de Q-PCR estão concordantes com os valores obtidos por *microarray*, tanto na comparação com os controles normais quanto na comparação com os animais *Lama2^{dy2J}/J*. Da mesma forma, os valores obtidos para os animais normais e os animais da linhagem *Lama2^{dy2J}/J* por meio do Q-PCR também estão concordantes com os valores obtidos por *microarray*.

Discussão

As miofibras, unidades funcionais responsáveis pela contração muscular, são formadas na embriogênese, quando células mononucleares denominadas mioblastos se fundem em fibras musculares imaturas, os miotubos. Os núcleos das fibras maduras, em condições normais, não podem entrar novamente em estado proliferativo. Dessa forma, durante a vida pós-natal, todo o crescimento e reparo musculares são realizados pela população de células mononucleares miogênicas conhecida como células-satélite (Hawke e Garry, 2001; Zammit, Partridge e Yablonka-Reuveni, 2006).

As células-satélite foram inicialmente descritas na década de 60, primeiramente por sua localização anatômica na superfície das fibras musculares, entre a lâmina basal e a membrana da fibra muscular (Mauro, 1961). Entretanto, só se provou que estas células eram de fato progenitores musculares quando foram capazes de produzir linhagens miogênicas, capazes de proliferar, diferenciar e se auto-renovar *in vitro* e *in vivo* (Bischoff, 1975; Konigsberg, Lipton e Konigsberg, 1975; Rosenblatt *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 2005). Na maioria dos músculos normais adultos, as células-satélite estão em seu estado quiescente, até que sua ativação é desencadeada por lesões musculares (Schultz, Gibson e Champion, 1978; Grounds e Yablonka-Reuveni, 1993; Hawke e Garry, 2001). Lesões sutis podem levar a uma pequena proliferação de células satélite ativadas enquanto que um trauma maior pode recrutar um grande número de células-satélite e promover um período de proliferação mais longo antes do início da diferenciação. Como pequenas lesões nas miofibras ocorrem rotineiramente durante as atividades diárias, este mecanismo de reparo é essencial para a manutenção do músculo ao longo da vida do indivíduo (Danoviz e Yablonka-Reuveni, 2012).

A ativação dos precursores miogênicos é controlada por sinais dados pelo nicho muscular, rede de microvasos e células inflamatórias (Bischoff, 1989; Yablonka-Reuveni, Seger e Rivera, 1999; Gopinath e Rando, 2008). Fatores sistêmicos também podem regular a ativação (Conboy *et al.*, 2005; Carlson *et al.*, 2009). O comportamento das células-satélite está sob controle regulatório rígido, de forma a equilibrar os vários estados mantidos ativamente, incluindo a quiescência, entrada na proliferação e continuidade no ciclo celular e diferenciação terminal (Day, Paterson e Yablonka-Reuveni, 2009; Danoviz e Yablonka-Reuveni, 2012). Além disso, estas células também possuem a capacidade de repovoar um *pool* de reserva e se auto-renovar, tornando-as células-tronco tecido-específicas (Collins *et al.*, 2005; Sacco *et al.*, 2008). Nas distrofias musculares, entretanto, imagina-se que ocorra a exaustão das células-satélite devido à demanda contínua por células miogênicas de reparo (Blau, Webster e Pavlath, 1983;

Webster e Blau, 1990; Aguenouz *et al.*, 2011). O isolamento e estudo desas células, portanto, é crucial para o entendimento de seu papel no músculo.

1. Extração de células-satélite

Para conseguir realizar nossos estudos com as células-satélite, decidimos inicialmente trabalhar com estas células *in vitro*. Embora seu nicho seja bem conhecido, o isolamento destas células não é trivial e diversas metodologias surgiram para conseguir retirar a célula-satélite de sua posição próxima ao músculo.

Existem técnicas extremamente sofisticadas para fazer o isolamento das células. Em alguns trabalhos é possível inclusive verificar a remoção das células por meio de microdissecção a laser e estudo de expressão gênica de cada célula individualmente (Vanderburg e Clarke, 2013). Entretanto, estas metodologias requerem uma especialização e equipamentos próprios, e se aplicam a estudos básicos, onde basta uma célula ou linhagem para responder à questão em estudo. Como em nosso trabalho, comparamos as populações de diversas linhagens distróficas e controle normal, selecionamos metodologias possíveis de serem aplicadas em um número grande de amostras. Além disso, os objetivos deste trabalho não envolvem as especificidades dos perfis de expressão de cada célula individualmente, mas sim um perfil de expressão global que pudesse explicar parte das diferenças encontradas entre os dois modelos estudados (*Lama2^{du2J}/J* e *Large^{myd}*) e o animal normal. Assim, para este trabalho é mais interessante ter um *pool* representativo das diversas subpopulações de células-satélite presentes no músculo dos animais, o que conseguimos através das técnicas de isolamento testadas.

Testamos também a técnica de isolamento de fibra única (Yablonka-Reuveni e Rivera, 1994; Rosenblatt *et al.*, 1995; Shefer *et al.*, 2006; Yablonka-Reuveni e Anderson, 2006), buscando estudar células-satélite quiescentes, embora não tenhamos conseguido manter essas fibras e células por mais tempo em cultura, além de termos conseguido um rendimento extremamente baixo.

a. Método do explante

Neste método, um dos primeiros a serem desenvolvidos (Rosenblatt *et al.*, 1995), pudemos verificar que as células-satélite migram do tecido implantado no frasco de

cultura e permanecem aderidas, multiplicando-se. Esta migração, entretanto, é lenta. Ainda assim, este método possibilita a obtenção de uma cultura de células-satélite e mioblastos com menos células contaminantes de outros tipos, tais como fibroblastos.

b. Método da digestão

Ao usar enzimas para digerir o tecido muscular é possível isolar um número maior de células-satélite e povoar o frasco de cultura num período de tempo muito mais curto. As células do meio do tecido, que não migrariam espontaneamente no método do explante, podem ser liberadas e aderirem livremente na garrafa. Assim, este método possibilita uma maior quantidade de células num período muito mais curto, já que não precisa se aproveitar da mobilidade e capacidade de migração das células (Shefer *et al.*, 2006). De fato, em nossos experimentos, obtivemos comparativamente uma quantidade de células muito maior após mesmo período em cultura, está de acordo com o descrito em literatura.

Por outro lado, a contaminação de outros tipos celulares na cultura é, infelizmente, muito maior com o uso da técnica da digestão (Li, Pan e Huard, 2010). Especialmente nas linhagens distróficas, onde existe infiltração de tecido conjuntivo e adiposo em todo o tecido muscular, é claro que estes tecidos também serão digeridos e poderão contribuir com células com capacidade de aderir à garrafa, como fibroblastos, células endoteliais, mesenquimais, entre outras. Um método de purificação da cultura se faz necessário, portanto realizamos *pre-plating* em todas as nossas amostras, conforme descrito por Li (Li, Pan e Huard, 2010).

Uma dificuldade encontrada, portanto, para a obtenção de uma linhagem de células-satélite musculares foi a de como retirar estas células sem ativá-las e mantendo suas características, necessárias para a avaliação da expressão gênica. Infelizmente não foi possível para este trabalho conseguirmos as células-satélite quiescentes, portanto trabalhamos apenas com as obtidas pela técnica da digestão, que são células ativas.

2. Caracterização fenotípica e identificação de subpopulações

A caracterização das células-satélite por marcadores de superfície celular também não é trivial. Existem diversos marcadores que podem ser usados para identificar essas células nos vários estágios de diferenciação tais como PAX3, PAX7, MYOD e miogenina. É possível identificar as células-satélite em sua posição fisiológica com a utilização de anticorpos anti-PAX7, em diferentes espécies, como camundongo (Seale *et al.*, 2000; Zammit *et al.*, 2004), rato (Shefer *et al.*, 2010), galinha (Halevy *et al.*, 2004) e humano (Lindström e Thornell, 2009). Porém todos estes anticorpos específicos para células-satélite são intracelulares e requerem a fixação e permeabilização das células para sua utilização na identificação de subpopulações por citometria seletiva. Assim, mesmo identificando estas sub-populações de interesse, estas células não estarão mais viáveis para cultivo e análise.

Procuramos então identificar o perfil fenotípico das células com diversos outros marcadores. Alguns deles são utilizados para identificação de células mesenquimais (Dominici *et al.*, 2006; Patki *et al.*, 2010), tais como CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD 105+ e SCA1. Ao mesmo tempo, alguns marcadores são reconhecidamente negativos em células mesenquimais por serem específicos de outros tipos celulares: CD45, que marca células hematopoiéticas e CD31, que marca células endoteliais. O marcador CD13 é indicativo de senescência celular (Dominici *et al.*, 2006).

Também testamos a contribuição de células CD133+ em nossas linhagens. Torrente *et al.* identificaram uma subpopulação de células-tronco musculares que expressavam este marcador e eram capazes de diferenciar em músculo, endotélio e tecido hematopoiético (Torrente *et al.*, 2004). Em outro estudo (Negroni *et al.*, 2009) o grupo comparou a capacidade regenerativa de células humanas CD133+ e mioblastos derivados de células-satélite em um modelo de crio-lesão. As células CD133+ foram mais eficientes regenerando o músculo, repovoando o nicho de células-satélite e migraram mais extensivamente. Depois destes trabalhos, outros grupos tentaram identificar o potencial miogênico destas células (Fishman *et al.*, 2013; Ohkawa *et al.*, 2013), e seus resultados sugerem que estas possuem sim um potencial miogênico maior que outras populações.

Com relação aos marcadores especificamente miogênicos, algumas publicações estabeleceram que as células-satélite podem ser isoladas baseada na seleção positiva para CD29, CD34, CD56 e CXCR4 (Cerletti *et al.*, 2008; Ieronimakis *et al.*, 2010;

Uezumi *et al.*, 2010; Chirieleison *et al.*, 2012). O potencial miogênico de células da *side population* também parece estar aumentado em células Sca1 positivas (Penton *et al.*, 2013).

Em nossas linhagens, primeiramente observamos que as amostras não foram contaminadas por outros tipos celulares, conforme os baixos valores de CD45 (< 16%) e CD31 (< 7%), nem estavam em estágio de senescência, com valores abaixo de 15% de marcação em CD13.

A caracterização das populações de células-satélite isolada de animais normais identificou que não houve diferença nos marcadores testados em PP1 e PP2, à exceção do marcador CD56 e CD44, mais expresso nas células de PP2, o que sugere um enriquecimento da população miogênica com característica mesenquimal. Além disso, observamos o aumento das células CD29+, CD44+, CD90/105+, CD73+, SCA1+, CXCR4+ e CD133+ em PP6. Isto sugere um enriquecimento de células com capacidade miogênica/mesenquimal ao longo dos *pre-platings*. Existem trabalhos que dizem que as células isoladas em PP2 são os mioblastos mais comprometidos e que as células isoladas em PP6 são mais próximas à tronco (Chirieleison *et al.*, 2012; Fishman *et al.*, 2013). Nas comparações das linhagens normais, observamos estas mesmas características, evidenciadas pelos marcadores de superfície que identificaram em PP1 e PP2 um padrão de expressão mais próximo ao observado na linhagem controle de mioblastos C2C12 e em PP6, um padrão semelhante ao controle de células-tronco mesenquimais de medula óssea .

O que podemos concluir é que: 1) a população de células obtidas após PP1 e PP2 mostram um padrão fenotípico observado em linhagens com características miogênicas, como mioblastos indiferenciados; 2) foi possível identificar um enriquecimento de uma sub-população em PP2 expressando mais o marcador CD56; 3) a técnica de *pre-plating*, quando levada ao ponto máximo de PP6, destacou este padrão de seleção misto de células com características mesenquimais e miogênicas. Em etapa posterior, pretendemos testar a potencialidade das células PP6 em ensaios de diferenciação destas células em diferentes tecidos de origem mesenquimal, como osso, cartilagem e gordura. Já nas células provenientes das linhagens de animais distróficos, observamos que em PP1 da linhagem *Lama2^{dy2J}/J* a população inicial de células foi mais enriquecida com fenótipo CD29+, CD44+, CD90/105+, CD73+, SCA1+ e CXCR4+ que nos controles e em relação às outras linhagens isoladas. A expressão de todos estes marcadores é diferente em PP1 com relação a PP2, evidenciando uma população inicial mais

heterogênea. Estas observações sugerem que nas culturas dos modelos distróficos houve um padrão de seleção diferente, onde nas amostras provenientes da linhagem *Lama2^{dy2J}/J* foram implantadas populações iniciais mais ricas em células semelhantes às C2C12. Estes marcadores podem indicar uma população inicial maior de células em estado de proliferação, que se perdem na passagem de PP1 para PP2. Concluimos que: 1) na linhagem *Lama2^{dy2J}/J* a população inicial é mais heterogênea e rica em células semelhantes a mioblastos C2C12, sugerindo maior número de células em estágio proliferativo; 2) a técnica de *pre-plating*, quando usada nos animais distróficos, seleciona negativamente estas células, tornando os PP2 das duas linhagens distróficas mais semelhantes entre si; 3) as células isoladas em PP2 exibem padrão de expressão de marcadores semelhante aos mioblastos C2C12, sendo portanto constituídas de população com característica miogênica.

3. Estudo do perfil de expressão gênica

a. Capacidade proliferativa das células isoladas

Observamos que várias culturas dos animais *C57Black* não proliferaram adequadamente, enquanto que o grau de sucesso das culturas dos animais distróficos foi muito maior. Atribuímos esta diferença ao ganho de experiência técnica do experimentador. Não foi possível verificar diferenças na proliferação entre as linhagens, mas sabemos que estamos selecionando as células com a maior capacidade de proliferação dentre aquelas presentes no tecido.

Infelizmente no prazo para realização deste trabalho, apesar de termos coletado células de 12 animais, apenas 10 proliferaram e destas 7 foram para os estudos de expressão. Não conseguimos todos os 10 animais *Lama2^{dy2J}/J* que esperávamos obter para a realização das análises. Como dito anteriormente, essa linhagem é mantida em heterozigose e apenas 25% dos animais de cada ninhada são de interesse. Por este mesmo motivo, não determinamos um sexo específico para a coleta das amostras - o que iria reduzir ainda mais a quantidade de animais de interesse em cada ninhada.

b. Extração e purificação de RNA, Pré-análise, normalização e controles de qualidade

De todas as amostras extraídas e purificadas, apenas uma amostra não teve a extração adequada de seu RNA, por motivos desconhecidos, e duas amostras de *Lama2^{dy2J}/J* não foram purificadas adequadamente, também por problemas não identificados.

A análise dos controles de qualidade dos *microarrays* excluiu apenas uma lâmina de *C57Black6*. Todas as outras foram aprovadas nestes controles e seguiram para a análise.

Escolhemos realizar o pré-processamento por RMA (*Robust Multichip Average*), já disponível no software distribuído pela Affymetrix responsável pelos controles de qualidade das lâminas. No pré-processamento por RMA são realizados três passos: ajuste do *background*, normalização por quantil (quartis) e sumarização (Bolstad *et al.*, 2003; Irizarry, Bolstad, *et al.*, 2003; Irizarry, Hobbs, *et al.*, 2003).

c. Análise dos resultados dos *microarrays* de expressão

i. Genes diferencialmente expressos

Utilizamos o método estatístico SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) para a seleção dos genes diferencialmente expressos. O SAM é um método desenvolvido especificamente para o uso com dados de *microarrays*, que irá selecionar os genes através de cálculos não-paramétricos. Neste método, permutações repetidas dos dados são usadas para determinar se a expressão de qualquer gene é significativa (Tusher, Tibshirani e Chu, 2001). Análises baseadas em permutação são usadas para estabelecer correlação entre genes e evita que se assuma a distribuição normal.

Os genes diferencialmente expressos foram selecionados e colocados em listas para a seguir serem adicionadas as notações de cada um deles. Nestas listas é possível perceber um enriquecimento de genes com expressão diminuída, independentemente da distrofia associada. Estas listas de genes diferencialmente expressos, porém, são difíceis de serem analisadas pela quantidade de genes envolvidos, portanto aplicamos um filtro determinando a origem muscular das amostras analisadas. Este filtro reduziu os genes a aproximadamente 50%. Analisamos então os genes com expressão modificada em cada uma das distrofias e entre elas.

• Células-satélite de animais *Lama2^{dy2J}/J*

No perfil de expressão apresentado pelas células provenientes dos animais *Lama2^{dy2J}/J* foi possível unir todos os genes com modificações em apenas uma via, que parece estar preferencialmente inibida. A análise da distribuição das moléculas com expressão variada identifica um maior número de alterações na membrana plasmática ou matriz extracelular, mesmo compartimento celular da laminina 2.

Dentre as principais funções da via selecionada podemos destacar crescimento e proliferação celular, movimento celular, morte e sobrevivência celular. A molécula regulatória, de ação nuclear, existente na via é MAF. MAF é um fator de transcrição responsável por regular a diferenciação em vários processos, especialmente em neurônios mecanosensoriais, (Wende *et al.*, 2012), células oculares, células hematopoiéticas, (Wende, Lechner e Birchmeier, 2012) entre outros. Quando inibido, não sinaliza para promover o início da diferenciação (Wende *et al.*, 2012). Seu papel na diferenciação muscular ainda não foi elucidado. Nos animais *Lama2^{dy2J}/J* observamos

redução na expressão de MAF, o que pode ser compatível com a manutenção do estado proliferativo destas células no músculo destes animais. De acordo com nossa publicação anterior, quando há estímulo à diferenciação as células reduzem a expressão de marcadores de proliferação e vice-versa (Onofre-Oliveira *et al.*, 2012).

Já GLRB codifica para subunidade beta do receptor de glicina, que funciona como um canal iônico mediado por neurotransmissor e que produz hiperpolarização por aumento na condutância de íons cloro. É interessante notar que mutações neste gene levam a "doença do sobressalto" (*startle disease*) (Andermann *et al.*, 1980), que quando associada a mutações no gene GLRB possui herança autossômica recessiva (Rees *et al.*, 2002) e perda de sensibilidade ao agonista. Animais *Lama2^{dy2J}/J* apresentam comportamento semelhante ao descrito, especialmente quando submetidos a stress. Outros fatores certamente estão envolvidos no fenótipo do *Lama2^{dy2J}/J*, como a falta de mielinização correta nos nervos periféricos (Yang *et al.*, 2005), mas a baixa expressão desta proteína também pode dar informações importantes para a descrição do modelo.

Em relação aos genes superexpressos neste modelo, dois deles merecem destaque: *Asic3* - sensor de acidose extracelular e outros metabólitos relacionados com isquemia e exercício (Gautam e Benson, 2013), recentemente descrito e cujo papel no músculo distrófico ainda não foi elucidado; e *Cdh3*, uma caderina, glicoproteína de adesão celular dependente de cálcio, envolvida em eventos de perda de heterozigose e desenvolvimento de câncer (Hibi *et al.*, 2009).

Assim, alguns dos genes identificados nas células provenientes de animais *Lama2^{dy2J}/J* sugerem regulação positiva da proliferação celular e inibição à diferenciação, com alterações significativas da membrana e matriz extracelular, condizentes com a mutação que carregam.

- Células-satélite de animais *Large^{myd}*

Já nas células provenientes dos animais *Large^{myd}* observamos uma quantidade notável de genes diferencialmente expressos. A mutação no gene *Large* leva a perda de um domínio funcional da enzima por ele codificada, membro da família das N-acetilglicosaminiltransferases. Esta enzima participa da glicosilação da alfa-distroglicana e pode também participar da síntese de glicoproteínas e cadeias de glicosíngolípides. Também pode estar envolvida na adição de unidades repetidas de dissacarídeos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9215>). Estas diferentes funções podem

explicar a alteração de tantos genes diferentes, que podem ser regulados direta ou indiretamente por LARGE. Também verificamos que o gene *Large*, nos animais que possuem mutação, está com expressão reduzida, evidenciando instabilidade do RNA mensageiro do gene mutado.

Na via 1 selecionada observamos intensa ativação nuclear, levando à redução na expressão de genes da membrana plasmática e espaço extracelular. Dentre os genes ativados podemos salientar interferon zeta e outros genes regulados/de regulação ao interferon, como *Ifi202b* e *Irf1*, além de *Tlr6*. Interferon é uma molécula imunomodulatória secretada em resposta principalmente a patógenos. Esta citocina ativa o sistema imune e diferentemente de outros interferons o interferon zeta possui uma atividade mais específica, com um número limitado de sinais e atividades biológicas (Oritani e Tomiyama, 2004). Sabe-se que em mioblastos C2C12 a adição de interferon no meio de cultura pode levar a distúrbios de miogênese regulada por IGF-I (Wieteska-Skrzeczyńska, Grzelkowska-Kowalczyk e Rejmak, 2011). O IGF possui efeito anabólico em adultos e atua pela via de AKT, que estimula o crescimento e proliferação celular. Na presença de interferon, o crescimento e proliferação celulares estariam inibidos ou funcionando anormalmente. Também notamos a ativação de *Casp1*, enzima envolvida com morte celular por apoptose, causando a perda prematura das células selecionadas.

Nas via 2 e 3 e 4 observamos ativação de moléculas de citoplasma e membrana plasmática interferindo na expressão de genes que codificam proteínas da membrana e matriz extracelular. Nenhum destes genes possui função conhecida relacionada ao músculo, portanto não é possível assumir relações entre a expressão destes genes e o fenótipo das células-satélite.

Na via 4 observamos o aparecimento do gene *Dmd*, que apesar de não estar diferencialmente expresso tem relação com a superexpressão de *Pamr1* (*peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1*), associado com regeneração muscular e reduzido em pacientes com DMD (Nakayama *et al.*, 2004), porém aumentado em camundongos *Dmd^{mdx}* (Hara, Nakayama e Nara, 2005) e *Asb5*, relacionado com diferenciação muscular (Jensen *et al.*, 2012). O que esta via indica é um direcionamento à diferenciação celular, mesmo sem estímulo, o que pode estar inibindo a proliferação celular desta população de células.

A única via canônica que parece estar suprimida nestas células é a de TGFB, que por sua vez deixa de ativar MAPK. Sabe-se que MAPK está envolvida em regulação de

ciclo celular, sendo inclusive associada a câncer, onde sua superexpressão pode levar ao crescimento e transformação celulares (Wegiel *et al.*, 2010). Assim, uma variedade de funções celulares controladas por estas moléculas, como regulação de transcrição e apoptose também ficam alteradas.

De fato, trabalhos recentes associam *Large* com funções não antes imaginadas, como primeiro modificador conhecido de anti-trombina plasmática, ou seja, envolvido na modulação de secreção extracelular de glicoproteínas (De La Morena-Barrio *et al.*, 2013). Se *Large* está envolvido com modulação de secreção, mutações nesta proteína podem alterar os mecanismos de *feedback* de diversas outras proteínas glicosiladas, alterando assim a expressão de muitos genes.

- Distróficos *versus* controles normais

Nos animais distróficos comparados aos animais normais podemos destacar a baixa expressão de MMP16, uma das moléculas envolvidas no remodelamento do tecido muscular e importante na regeneração muscular. MMP16 ativa MMP2 por meio de clivagem e esta, então, age degradando colágeno tipo IV (Morgunova *et al.*, 2002).

Pudemos observar também a ativação de PLAC8, regulador positivo de proliferação celular (Song *et al.*, 2011); EFNB1, proteína com papel em adesão celular e responsável por guiar o desenvolvimento de axônios, relacionada com craniossinostoses (Passos-Bueno *et al.*, 2008); SYNPO2, ligante de alfa-actinina muscular, inicialmente relacionada a músculo liso (Schroeter *et al.*, 2008); SMOC2, proteína responsável por organizar matriz extracelular (Basciano *et al.*, 2011), altamente expressa em lesões cutâneas no processo de cura (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64094>). Ao mesmo tempo, observamos expressão reduzida de DCN, proteína de matriz extracelular que se liga às fibras tipo I de colágeno e possui papel na organização da matriz extracelular (Brandan, Cabello-Verrugio e Vial, 2008), sendo também um gene candidato para a síndrome de Marfan (Raghunath *et al.*, 1993).

- *Lama2^{dy2J}/J versus Large^{myd}*

Os genes identificados apenas nos animais distróficos e não nos animais normais revelam genes que estão com expressão aumentada em uma das linhagens e diminuída na outra. Porém, quando os níveis de expressão destes genes é comparado ao nível dos

animais normais o aumento/redução não é suficiente para tornar-se estatisticamente significativa. A importância biológica deste grupo é a identificação de genes com perfil de expressão oposto nas duas linhagens distróficas, que poderia explicar diferenças no fenótipo exibido pelos animais.

O gene *Angpt11* é membro da família dos fatores de crescimento endotelial, únicos fatores altamente específicos para endotélio vascular, que participam na formação de vasos sanguíneos (Oike, Yasunaga e Suda, 2004). Esta proteína é largamente expressa em diversos tecidos, sendo que níveis mais altos de RNAm são obtidos em tecidos altamente vascularizados (Oike, Yasunaga e Suda, 2004). Como nossos estudos foram feitos em células as diferenças nos valores de expressão deste gene não refletem o grau de vascularização do tecido mas sim diferenças no estímulo a esta vascularização. Além disso, é importante salientar que esta proteína secretada não age como mitógeno endotelial *in vitro* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9068>) e portanto deve ter outras funções no estímulo a vascularização tecidual. O animal *Large^{myd}* possui redução na expressão deste gene em relação ao animal *Lama2^{dy2J/J}*, o que poderia refletir na capacidade regenerativa das linhagens celulares, na medida em que o estímulo à maior vascularização do tecido pode favorecer o acesso mais fácil das células de reparo às lesões.

O gene *B3gnt5* codifica uma proteína de membrana membro da família beta-1,3-N-acetilglicosaminiltransferase que possui uma forte atividade para transferir GlcNAc a substratos glicolípides (Kuan *et al.*, 2010). O papel destas moléculas ainda não está totalmente elucidado, porém animais nocaute para B3GNT5 apresentam diversas características anormais como retardo no crescimento, morte prematura e redução da expectativa de vida (Kuan *et al.*, 2010). Este gene também está reduzido em *Large^{myd}*.

O gene *Hdac9*, superexpresso nos animais *Large^{myd}* codifica para a histona deacetilase 9, importante molécula responsável pela regulação gênica através da alteração da estrutura da cromatina. Sabe-se que este gene reprime MEF2, outro gene importante no desenvolvimento muscular (Miska *et al.*, 1999; Lemercier *et al.*, 2000).

Por fim, outro gene cuja expressão está aumentada é o *Ocell*, porém não existe literatura a respeito de seu papel na célula.

d. Validação por Q-PCR do gene *Large*

Geralmente as listas de genes obtidas são extensas e é muito improvável que todos sejam validados. Para as publicações é suficiente que se faça a validação de 5 genes. Neste trabalho, fizemos a validação de um deles, o gene *Large*, em todas as amostras onde o *microarray* foi realizado. Os dados de expressão obtidos por esta técnica foram concordantes com os dados obtidos por *microarray*, confirmando a confiabilidade dos ensaios.

Conclusões

- I.** A caracterização fenotípica das populações de células isoladas identificou:
- a. *MÚSCULO NORMAL*
 - i. a população de células que aderem mais precocemente (PP1) e mais tardiamente (PP2) mostram um padrão fenotípico semelhante entre si e com características mais próximas às miogênicas.
 - ii. a técnica de *pre-plating*, quando levada ao ponto máximo de PP6, isolou uma população de células com padrão de marcação misto, mantendo as características miogênicas, mas apresentando também padrão de células mesenquimais, evidenciando células mais imaturas.
 - b. *MÚSCULO DISTRÓFICO*
 - i. Em *Lama2^{dy2J}/J*, a população inicial PP1 é mais heterogênea e rica em células com alta expressão dos marcadores miogênicos, sugerindo a presença de um número maior de células em estágio proliferativo nesta linhagem.
 - ii. Em *Large^{myd}* não houve diferença no padrão de marcação das populações em PP1 e PP2, sugerindo a seleção de uma população inicial mais homogênea.
 - iii. Em *Large^{myd}* as duas populações PP1 e PP2 expressaram pelo menos um marcador característico de células tronco mesenquimais, sugerindo maior imaturidade.
- II.** A análise comparativa do perfil de expressão gênica das diversas linhagens mostrou:
- a. Exclusivo da linhagem *Lama2^{dy2J}/J*
 - i. Os genes diferentemente expressos pertencem a uma única via relacionada predominantemente com moléculas de membrana ou matriz extracelular
 - ii. Os genes envolvidos sugerem regulação positiva da proliferação celular e inibição da diferenciação.
 - b. Exclusivo da linhagem *Large^{myd}*
 - i. Há modificação na expressão de um grande número de genes, condizente com funções ainda não esclarecidas da atividade de LARGE, inclusive com modulação de secreção extracelular de glicoproteínas
 - ii. As vias envolvidas relacionam-se principalmente com distúrbios na miogênese e com ativação da diferenciação celular mesmo sem estímulo.
 - c. Distróficos x Normais
 - i. Redução de expressão de genes ligados a regeneração e remodelamento muscular e de organização da matriz extracelular
 - ii. Ativação de reguladores positivos de proliferação celular e organização de matriz extracelular
 - d. *Lama2^{dy2J}/J versus Large^{myd}*
 - i. Novos genes identificados nunca antes relacionados ao processo distrófico, com papel ainda a ser elucidado.

Referências Bibliográficas

ABMAYR, S. M.; PAVLATH, G. K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. **Development**, v. 139, n. 4, p. 641-56, Feb 2012. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274696> >.

AGUENNOUZ, M. et al. Telomere shortening is associated to TRF1 and PARP1 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiol Aging**, v. 32, n. 12, p. 2190-7, Dec 2011. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20137830> >.

ALDERTON, J. M.; STEINHARDT, R. A. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. **Trends Cardiovasc Med**, v. 10, n. 6, p. 268-72, Aug 2000. ISSN 1050-1738 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11282306 >.

ANDERMANN, F. et al. Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome. **Brain**, v. 103, n. 4, p. 985-97, Dec 1980. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6777025> >.

ASAKURA, A.; RUDNICKI, M. A. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. **Exp Hematol**, v. 30, n. 11, p. 1339-45, Nov 2002. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423688> >.

BARON, D. et al. Meta-analysis of muscle transcriptome data using the MADMuscle database reveals biologically relevant gene patterns. **BMC Genomics**, v. 12, p. 113, 2011. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324190> >.

_____. Immune response and mitochondrial metabolism are commonly deregulated in DMD and aging skeletal muscle. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26952, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096509> >.

BASCIANO, L. et al. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC Cell Biol**, v. 12, p. 12, 2011. ISSN 1471-2121. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21450070> >.

BEAUCHAMP, J. R. et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. **J Cell Biol**, v. 151, n. 6, p. 1221-34, Dec 11 2000. ISSN 0021-9525 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11121437 >.

BERCHTOLD, M. W.; BRINKMEIER, H.; MÜNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1215-65, Jul 2000. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893434> >.

BERG, Z. et al. Muscle satellite cells from GRMD dystrophic dogs are not phenotypically distinguishable from wild type satellite cells in ex vivo culture. **Neuromuscul Disord**, v. 21, n. 4, p. 282-90, Apr 2011. ISSN 1873-2364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277207> >.

BERNASCONI, P. et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 1137-44, Aug 1995. ISSN 0021-9738 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7635950 >.

BISCHOFF, R. Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. **Anat Rec**, v. 182, n. 2, p. 215-35, Jun 1975. ISSN 0003-276X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/168794> >.

_____. Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture. **Med Sci Sports Exerc**, v. 21, n. 5 Suppl, p. S164-72, Oct 1989. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2607951> >.

BITTNER, R. E. et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. **Nat Genet**, v. 23, n. 2, p. 141-2, Oct 1999. ISSN 1061-4036 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10508505 >.

BLAU, H. M.; WEBSTER, C.; PAVLATH, G. K. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 15, p. 4856-60, Aug 1983. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6576361> >.

BOLSTAD, B. M. et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. **Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p.

185-93, Jan 2003. ISSN 1367-4803. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538238> >.

BRAND-SABERI, B.; CHRIST, B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. **Cell Tissue Res**, v. 296, n. 1, p. 199-212, Apr 1999. ISSN 0302-766X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10199980 >.

BRANDAN, E.; CABELLO-VERRUGIO, C.; VIAL, C. Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. **Matrix Biol**, v. 27, n. 8, p. 700-8, Oct 2008. ISSN 0945-053X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694824> >.

BRAUN, T.; ARNOLD, H. H. Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. **Embo J**, v. 15, n. 2, p. 310-18, Jan 15 1996. ISSN 0261-4189 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8617206 >.

BROWNING, C. A. et al. A rapid PCR method for genotyping the Large(myd) mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v. 15, n. 5, p. 331-5, May 2005. ISSN 0960-8966 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15833424 >.

BUCKINGHAM, M. et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **J Anat**, v. 202, n. 1, p. 59-68, Jan 2003. ISSN 0021-8782 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12587921 >.

BULFIELD, G. et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 4, p. 1189-92, Feb 1984. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6583703 >.

CARLSON, M. E. et al. Relative roles of TGF-beta1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. **Aging Cell**, v. 8, n. 6, p. 676-89, Dec 2009. ISSN 1474-9726. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732043> >.

CERLETTI, M. et al. Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. **Cell**, v. 134, n. 1, p. 37-47, Jul 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614009> >.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 209-38, Jan 2004. ISSN 0031-9333 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14715915 >.

CHEN, J. C.; GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, p. 101, Nov 13 2003. ISSN 1477-7827 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14614776 >.

CHIRIELEISON, S. M. et al. Human muscle-derived cell populations isolated by differential adhesion rates: phenotype and contribution to skeletal muscle regeneration in Mdx/SCID mice. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 3-4, p. 232-41, Feb 2012. ISSN 1937-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21854253> >.

CHOI, J. et al. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 20, p. 7988-92, Oct 1990. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2172969 >.

CLARK, K. A. et al. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. 637-706, 2002. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179413400023 >.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 10, p. 1456-71, Oct 2000. ISSN 0148-639X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11003781 >.

COHN, R. D. et al. Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 639-48, Sep 6 2002. ISSN 0092-8674 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12230980 >.

COLLINS, C. A. et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 289-301, Jul

2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051152> >.

CONBOY, I. M. et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 760-4, Feb 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15716955> >.

DANOVIZ, M. E.; YABLONKA-REUVENI, Z. Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. **Methods Mol Biol**, v. 798, p. 21-52, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130829> >.

DAY, K.; PATERSON, B.; YABLONKA-REUVENI, Z. A distinct profile of myogenic regulatory factor detection within Pax7+ cells at S phase supports a unique role of Myf5 during posthatch chicken myogenesis. **Dev Dyn**, v. 238, n. 4, p. 1001-9, Apr 2009. ISSN 1058-8388. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19301399> >.

DE LA MORENA-BARRIO, M. E. et al. Identification of antithrombin-modulating genes. Role of LARGE, a gene encoding a bifunctional glycosyltransferase, in the secretion of proteins? **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64998, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23705025> >.

DIMARIO, J. X.; UZMAN, A.; STROHMAN, R. C. Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle. **Dev Biol**, v. 148, n. 1, p. 314-21, Nov 1991. ISSN 0012-1606 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1936568 >.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.

DUBOWITZ, V.; SEWRY, C. A.; LANE, R. J. M. **Muscle biopsy : a practical approach**. 3rd. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. xiii, 611 p. ISBN 9781416025931

1416025936.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 809-23, Aug 1993. ISSN 0021-9525 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8349731 >.

FISHMAN, J. M. et al. Skeletal Muscle Tissue Engineering: Which Cell to Use? **Tissue Eng Part B Rev**, Jul 2013. ISSN 1937-3376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23679017> >.

GAUTAM, M.; BENSON, C. J. Acid-sensing ion channels (ASICs) in mouse skeletal muscle afferents are heteromers composed of ASIC1a, ASIC2, and ASIC3 subunits. **FASEB J**, v. 27, n. 2, p. 793-802, Feb 2013. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109675> >.

GHEDINI, P. C. et al. Increased expression of acetylcholine receptors in the diaphragm muscle of MDX mice. **Muscle Nerve**, v. 38, n. 6, p. 1585-94, Dec 2008. ISSN 0148-639X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19016551 >.

GOETSCH, S. C. et al. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. **Physiol Genomics**, v. 14, n. 3, p. 261-71, Aug 15 2003. ISSN 1531-2267 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12799472 >.

GOODELL, M. A. et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. **J Exp Med**, v. 183, n. 4, p. 1797-806, Apr 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666936> >.

GOPINATH, S. D.; RANDO, T. A. Stem cell review series: aging of the skeletal muscle stem cell niche. **Aging Cell**, v. 7, n. 4, p. 590-8, Aug 2008. ISSN 1474-9726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462272> >.

GOSSELIN, L. E. et al. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle Nerve**, v. 30, n. 5, p. 645-53, Nov 2004. ISSN 0148-639X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15389721 >.

GRANDE, J. P.; MELDER, D. C.; ZINSMEISTER, A. R. Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor-beta1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV. **J Lab Clin Med**, v. 130, n. 5, p. 476-86, Nov 1997. ISSN 0022-2143 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9390635 >.

GREWAL, P. K.; HEWITT, J. E. Mutation of Large, which encodes a putative glycosyltransferase, in an animal model of muscular dystrophy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1573, n. 3, p. 216-24, Dec 19 2002. ISSN 0006-3002 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12417403 >.

GROUNDS, M. D.; YABLONKA-REUVENI, Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. **Mol Cell Biol Hum Dis Ser**, v. 3, p. 210-56, 1993. ISSN 1470-0573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8111541> >.

GUO, L. T. et al. Laminin alpha2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. **Neuromuscul Disord**, v. 13, n. 3, p. 207-15, Mar 2003. ISSN 0960-8966 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12609502 >.

HALEVY, O. et al. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. **Dev Dyn**, v. 231, n. 3, p. 489-502, Nov 2004. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15390217> >.

HARA, T.; NAKAYAMA, Y.; NARA, N. [Regenerative medicine of skeletal muscle]. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 45, n. 11, p. 880-2, Nov 2005. ISSN 0009-918X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447752> >.

HARTEL, J. V. et al. Impact of prednisone on TGF-beta1 and collagen in diaphragm muscle from mdx mice. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 3, p. 428-32, Mar 2001. ISSN 0148-639X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11353432 >.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 2, p. 534-51, Aug 2001. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457764> >.

HELGASON, C. D.; MILLER, C. L. **Basic cell culture protocols**. 3rd. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005. xii, 371 p. ISBN 9781588292841

1588292843 (hardcover alk. paper)

1588295451 (pbk. alk. paper)

1592598382 (e-ISBN).

HIBI, K. et al. Demethylation of the CDH3 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. **Anticancer Res**, v. 29, n. 6, p. 2215-7, Jun 2009. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528483> >.

HOFFMAN, E. P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 9, p. 465-70, Sep 2001. ISSN 0165-6147 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11543874 >.

IERONIMAKIS, N. et al. Absence of CD34 on murine skeletal muscle satellite cells marks a reversible state of activation during acute injury. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10920, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532193> >.

IGNOTZ, R. A.; MASSAGUE, J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. **J Biol Chem**, v. 261, n. 9, p. 4337-45, Mar 25 1986. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3456347 >.

IRIZARRY, R. A. et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 4, p. e15, Feb 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582260> >.

_____. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. **Biostatistics**, v. 4, n. 2, p. 249-64, Apr 2003. ISSN 1465-4644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925520> >.

JENSEN, J. H. et al. Gene expression profiling of porcine skeletal muscle in the early recovery phase following acute physical activity. **Exp Physiol**, v. 97, n. 7, p. 833-48, Jul 2012. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337866> >.

JONES, D. A.; ROUND, J. M. **Skeletal muscle in health and disease: a textbook of muscle physiology**. 5^a ed. Great Britain: Manchester University Press, 1996.

KALLESTAD, K. M.; MCLOON, L. K. Defining the heterogeneity of skeletal muscle-derived side and main population cells isolated immediately ex vivo. **J Cell Physiol**, v. 222, n. 3, p. 676-84, Mar 2010. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020527> >.

KAPSA, R.; KORNBERG, A. J.; BYRNE, E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. **Lancet Neurol**, v. 2, n. 5, p. 299-310, May 2003. ISSN 1474-4422 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12849184 >.

KILPINEN, S. K.; OJALA, K. A.; KALLIONIEMI, O. P. Alignment of gene expression profiles from test samples against a reference database: New method for context-specific interpretation of microarray data. **BioData Min**, v. 4, p. 5, 2011. ISSN 1756-0381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21453538> >.

KOENIG, M. et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. **Am J Hum Genet**, v. 45, n. 4, p. 498-506, Oct 1989. ISSN 0002-9297 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2491009 >.

KONIGSBERG, U. R.; LIPTON, B. H.; KONIGSBERG, I. R. The regenerative response of single mature muscle fibers isolated in vitro. **Dev Biol**, v. 45, n. 2, p. 260-75, Aug 1975. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1193298> >.

KOTELNIKOVA, E. et al. Novel approach to meta-analysis of microarray datasets reveals muscle remodeling-related drug targets and biomarkers in Duchenne muscular dystrophy. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 2, p. e1002365, Feb 2012. ISSN 1553-7358. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319435> >.

KOTTLORS, M.; KIRSCHNER, J. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. **Cell Tissue Res**, v. 340, n. 3, p. 541-8, Jun 2010. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467789> >.

KRENN, V. et al. On the origin of cells determined to form skeletal muscle in avian embryos. **Anat Embryol (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 49-54, 1988. ISSN 0340-2061 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3213955 >.

KUAN, C. T. et al. Multiple phenotypic changes in mice after knockout of the B3gnt5 gene, encoding Lc3 synthase--a key enzyme in lacto-neolacto ganglioside synthesis. **BMC Dev Biol**, v. 10, p. 114, 2010. ISSN 1471-213X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087515> >.

KUANG, S. et al. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 999-1010, Jun 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540178> >.

LEMERCIER, C. et al. mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. **J Biol Chem**, v. 275, n. 20, p. 15594-9, May 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10748098> >.

LI, X.; MCFARLAND, D. C.; VELLEMAN, S. G. Extracellular matrix proteoglycan decorin-mediated myogenic satellite cell responsiveness to transforming growth factor-beta1 during cell proliferation and differentiation Decorin and transforming growth factor-beta1 in satellite cells. **Domest Anim Endocrinol**, v. 35, n. 3, p. 263-73, Oct 2008. ISSN 0739-7240 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18650056 >.

LI, Y. et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **Am J Pathol**, v. 164, n. 3, p. 1007-19, Mar 2004. ISSN 0002-9440 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14982854 >.

LI, Y.; PAN, H.; HUARD, J. Isolating stem cells from soft musculoskeletal tissues. **J Vis Exp**, n. 41, 2010. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644509> >.

LINDON, C.; MONTARRAS, D.; PINSET, C. Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. **J Cell Biol**, v. 140, n. 1, p. 111-8, Jan 12 1998. ISSN 0021-9525 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9425159 >.

LINDSTRÖM, M.; THORNELL, L. E. New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. **Histochem Cell Biol**, v. 132, n. 2, p. 141-57, Aug 2009. ISSN 1432-119X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19484472> >.

LONGMAN, C. et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 21, p. 2853-61, Nov 1 2003. ISSN 0964-6906 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12966029 >.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 9, p. 493-5, Feb 1961. ISSN 0095-9901. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13768451> >.

MEIER, H.; SOUTHARD, J. L. Muscular dystrophy in the mouse caused by an allele at the dy-locus. **Life Sci**, v. 9, n. 3, p. 137-44, Feb 8 1970. ISSN 0024-3205 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5434356 >.

MISKA, E. A. et al. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. **EMBO J**, v. 18, n. 18, p. 5099-107, Sep 1999. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10487761> >.

MORGUNOVA, E. et al. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 11, p. 7414-9, May 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032297> >.

MUNTONI, F. et al. Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. **Neuromuscul Disord**, v. 12, n. 5, p. 438-46, Jun 2002. ISSN 0960-8966 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12031617 >.

NAKAYAMA, Y. et al. Cloning of cDNA encoding a regeneration-associated muscle protease whose expression is attenuated in cell lines derived from Duchenne muscular dystrophy patients. **Am J Pathol**, v. 164, n. 5, p. 1773-82, May 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111323> >.

NAWROTZKI, R.; BLAKE, D. J.; DAVIES, K. E. The genetic basis of neuromuscular disorders. **Trends Genet**, v. 12, n. 8, p. 294-8, Aug 1996. ISSN 0168-9525 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8783938 >.

NEGRONI, E. et al. In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. **Mol Ther**, v. 17, n. 10, p. 1771-8, Oct 2009. ISSN 1525-0024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19623164> >.

OHKAWA, S. et al. Magnetic targeting of human peripheral blood CD133+ cells for skeletal muscle regeneration. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 19, n. 8, p. 631-41, Aug

2013. ISSN 1937-3392. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23298291> >.

OHLENDIECK, K.; CAMPBELL, K. P. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. **J Cell Biol**, v. 115, n. 6, p. 1685-94, Dec 1991. ISSN 0021-9525 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1757468 >.

OIKE, Y.; YASUNAGA, K.; SUDA, T. Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis. **Int J Hematol**, v. 80, n. 1, p. 21-8, Jul 2004. ISSN 0925-5710. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15293564> >.

ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G. et al. Differential expression of genes involved in muscular degeneration in four dystrophic mouse models. **Neuromuscular Disorders**, v. 19, n. 8-9, p. 574-575, SEP 2009 2009.

_____. Differential Expression of Genes Involved in the Degeneration and Regeneration Pathways in Mouse Models for Muscular Dystrophies. **Neuromolecular Medicine**, v. 14, n. 1, p. 74-83, MAR 2012 2012.

ORITANI, K.; TOMIYAMA, Y. Interferon-zeta/limitin: novel type I interferon that displays a narrow range of biological activity. **Int J Hematol**, v. 80, n. 4, p. 325-31, Nov 2004. ISSN 0925-5710. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15615256> >.

OVERALL, C. M.; WRANA, J. L.; SODEK, J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. **J Biol Chem**, v. 266, n. 21, p. 14064-71, Jul 25 1991. ISSN 0021-9258 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1649834 >.

PASSOS-BUENO, M. R. et al. Genetics of craniosynostosis: genes, syndromes, mutations and genotype-phenotype correlations. **Front Oral Biol**, v. 12, p. 107-43, 2008. ISSN 1420-2433. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391498> >.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J Neurol Sci**, v. 129, n. 2, p. 97-105, Apr 1995. ISSN 0022-510X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7608742 >.

PATKI, S. et al. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. **Hum Cell**, v. 23, n. 2, p. 35-40, May 2010. ISSN 1749-0774. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712706> >.

PENTON, C. M. et al. Muscle side population cells from dystrophic or injured muscle adopt a fibro-adipogenic fate. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54553, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336007> >.

RAGHUNATH, M. et al. Decreased extracellular deposition of fibrillin and decorin in neonatal Marfan syndrome fibroblasts. **Hum Genet**, v. 90, n. 5, p. 511-5, Jan 1993. ISSN 0340-6717. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8428751> >.

RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v. 24, n. 12, p. 1575-94, Dec 2001. ISSN 0148-639X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745966> >.

RANDO, T. A.; BLAU, H. M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. **J Cell Biol**, v. 125, n. 6, p. 1275-87, Jun 1994. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8207057> >.

REES, M. I. et al. Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (GLRB). **Hum Mol Genet**, v. 11, n. 7, p. 853-60, Apr 2002. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929858> >.

ROBERTSON, T. A. et al. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. **Exp Cell Res**, v. 207, n. 2, p. 321-31, Aug 1993. ISSN 0014-4827 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8344384 >.

ROSENBLATT, J. D. et al. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 31, n. 10, p. 773-9, Nov 1995. ISSN 1071-2690. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564066> >.

RUDNICKI, M. A. et al. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. **Cell**, v. 71, n. 3, p. 383-90, Oct 30 1992. ISSN 0092-8674 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1330322 >.

_____. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1351-9, Dec 31 1993. ISSN 0092-8674 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8269513 >.

SACCO, A. et al. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 502-6, Nov 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806774> >.

SAEED, A. I. et al. TM4 microarray software suite. **Methods Enzymol**, v. 411, p. 134-93, 2006. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939790> >.

_____. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, n. 2, p. 374-8, Feb 2003. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12613259> >.

SCHROETER, M. M. et al. In vitro characterization of native mammalian smooth-muscle protein synaptopodin 2. **Biosci Rep**, v. 28, n. 4, p. 195-203, Aug 2008. ISSN 0144-8463. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588515> >.

SCHULTZ, E.; GIBSON, M. C.; CHAMPION, T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. **J Exp Zool**, v. 206, n. 3, p. 451-6, Dec 1978. ISSN 0022-104X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/712350> >.

SCOTT, I. C. et al. Large-scale isolation of human skeletal muscle satellite cells from post-mortem tissue and development of quantitative assays to evaluate modulators of myogenesis. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 4, n. 2, p. 157-69, Jun 2013. ISSN 2190-5991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23344890> >.

SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. **Dev Biol**, v. 218, n. 2, p. 115-24, Feb 15 2000. ISSN 0012-1606 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10656756 >.

SEALE, P. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, v. 102, n. 6, p. 777-86, Sep 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030621> >.

SHARMA, K.; ZIYADEH, F. N. The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. **Am J Physiol**, v. 266, n. 6 Pt 2, p. F829-42, Jun 1994. ISSN 0002-9513 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8023963 >.

SHEFER, G. et al. Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13307, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967266> >.

_____. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Dev Biol**, v. 294, n. 1, p. 50-66, Jun 2006. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554047> >.

SONG, W. Y. et al. Common functions or only phylogenetically related? The large family of PLAC8 motif-containing/PCR genes. **Mol Cells**, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan 2011. ISSN 0219-1032. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347707> >.

SPIRITO, P. et al. The management of hypertrophic cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 336, n. 11, p. 775-85, Mar 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9052657> >.

STEINMETZ, P. R. et al. Independent evolution of striated muscles in cnidarians and bilaterians. **Nature**, v. 487, n. 7406, p. 231-4, Jul 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763458> >.

SUNADA, Y. et al. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. **Hum Mol Genet**, v. 4, n. 6, p. 1055-61, Jun 1995. ISSN 0964-6906 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7655459 >.

TAJIKA, Y. et al. VAMP2 marks quiescent satellite cells and myotubes, but not activated myoblasts. **Acta Histochem Cytochem**, v. 43, n. 4, p. 107-14, Aug 2010. ISSN 1347-5800. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20824121> >.

TOME, F. M. et al. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. **C R Acad Sci III**, v. 317, n. 4, p. 351-7, Apr 1994. ISSN 0764-4469 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8000914 >.

TORRENTE, Y. et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 182-95, Jul 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254585> >.

TUSHER, V. G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 9, p. 5116-21, Apr 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309499> >.

UEZUMI, A. et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 2, p. 143-52, Feb 2010. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081842> >.

VAINZOF, M. et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **J Mol Neurosci**, v. 34, n. 3, p. 241-8, Mar 2008. ISSN 0895-8696 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18202836 >.

VAN REEUWIJK, J. et al. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. **Hum Genet**, v. 121, n. 6, p. 685-90, Jul 2007. ISSN 0340-6717 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17436019 >.

VANDERBURG, C. R.; CLARKE, M. S. Laser capture microdissection of metachromatically stained skeletal muscle allows quantification of fiber type specific gene expression. **Mol Cell Biochem**, v. 375, n. 1-2, p. 159-70, Mar 2013. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23196635> >.

VILQUIN, J. T. et al. Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles. **Gene Ther**, v. 6, n. 5, p. 792-800, May 1999. ISSN 0969-7128 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10505103 >.

_____. Identification of homozygous and heterozygous dy2J mice by PCR. **Neuromuscul Disord**, v. 10, n. 1, p. 59-62, Jan 2000. ISSN 0960-8966 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10677866 >.

WAGERS, A. J.; CONBOY, I. M. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 659-67, Sep 9 2005. ISSN 0092-8674 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16143100 >.

WANG, Y. et al. Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. **Nature**, v. 379, n. 6568, p. 823-5, Feb 29 1996. ISSN 0028-0836 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8587605 >.

WEBSTER, C.; BLAU, H. M. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. **Somat Cell Mol Genet**, v. 16, n. 6, p. 557-65, Nov 1990. ISSN 0740-7750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2267630> >.

WEGIEL, B. et al. Molecular pathways in the progression of hormone-independent and metastatic prostate cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 10, n. 4, p. 392-401, Jun 2010. ISSN 1873-5576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384583> >.

WEINTRAUB, H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1241-4, Dec 31 1993. ISSN 0092-8674 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8269506 >.

WENDE, H.; LECHNER, S. G.; BIRCHMEIER, C. The transcription factor c-Maf in sensory neuron development. **Transcription**, v. 3, n. 6, p. 285-9, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 2154-1272. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889842> >.

WENDE, H. et al. The transcription factor c-Maf controls touch receptor development and function. **Science**, v. 335, n. 6074, p. 1373-6, Mar 2012. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22345400> >.

WIETESKA-SKRZECZYŃSKA, W.; GRZELKOWSKA-KOWALCZYK, K.; REJMAK, E. Growth factor and cytokine interactions in myogenesis. Part II. Expression of IGF binding proteins and protein kinases essential for myogenesis in mouse C2C12 myogenic cells exposed to TNF-alpha and IFN-gamma. **Pol J Vet Sci**, v. 14, n. 3, p. 425-31, 2011. ISSN 1505-1773. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21957737> >.

XU, H. et al. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. **Nat Genet**, v. 8, n. 3, p. 297-302, Nov 1994. ISSN 1061-4036 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7874173 >.

YABLONKA-REUVENI, Z.; ANDERSON, J. E. Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. **Dev Dyn**, v. 235, n. 1, p. 203-12, Jan 2006. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258933> >.

YABLONKA-REUVENI, Z. et al. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. **J Anim Sci**, v. 86, n. 14 Suppl, p. E207-16, Apr 2008. ISSN 1525-3163 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17878281 >.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RIVERA, A. J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. **Dev Biol**, v. 164, n. 2, p. 588-603, Aug 1994. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913900> >.

YABLONKA-REUVENI, Z. et al. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. **Dev Biol**, v. 210, n. 2, p. 440-55, Jun 15 1999. ISSN 0012-1606 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10357902 >.

YABLONKA-REUVENI, Z.; SEGER, R.; RIVERA, A. J. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. **J Histochem Cytochem**, v. 47, n. 1, p. 23-42, Jan 1999. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857210> >.

YAJIMA, H. et al. Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 17, p. 2932-44, Oct 2010. ISSN 1090-2422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20696153> >.

YANG, D. et al. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. **J Cell Biol**, v. 168, n. 4, p. 655-66, Feb 2005. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699217> >.

ZAMMIT, P. S. et al. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? **J Cell Biol**, v. 166, n. 3, p. 347-57, Aug 2004. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15277541> >.

ZAMMIT, P. S.; PARTRIDGE, T. A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. **J Histochem Cytochem**, v. 54, n. 11, p. 1177-91, Nov 2006. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899758> >.

ZAMMIT, P. S. et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 9, p. 1824-32, May 1 2006. ISSN 0021-9533 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16608873>.

ZANOTTI, S. et al. Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. **Matrix Biol**, v. 26, n. 8, p. 615-24, Oct 2007. ISSN 0945-053X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17662584>.

ZATZ, M. Distrofias musculares Progressivas. In: CARAKUSHANSKY, G. (Ed.). **Doenças Genéticas em pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

Anexos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/027/2009
Ref. 2009.1.1043.41.2

São Paulo, 31 de agosto de 2009.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada nesta data, **APROVOU** o Projeto "Caracterização e estudo da capacidade regenerativa de células-satélite de camundongos distróficos com diferentes defeitos moleculares" – **Protocolo 097/2009**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Paula Cristina Gorgueira Onofre Oliveira).

Atenciosamente.

Prof. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilma. Sra.

Prof. Dra. MARIZ VAINZOF

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.