

Nabila Scabine Pessotti

**Diferenciação miogênica “in vitro” de células tronco
mesenquimais murinas de diferentes origens**

Botucatu
2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE
MESQUITA FILHO
CAMPUS DE BOTUCATU**

**Diferenciação miogênica “in vitro” de células tronco
mesenquimais murinas de diferentes origens**

Nabila Scabine Pessotti

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariz Vainzof
Supervisora: Prof^a. Dr^a. Maeli Dal Pai Silva

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao
Departamento de Morfologia
do Instituto de Biociências da
Unesp – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de
Bacharelado em Ciências
Biológicas.

Botucatu
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Pessotti, Nabila Scabine.

Diferenciação miogênica “*in vitro*” de células tronco mesenquimais murinas de diferentes origens / Nabila Scabine Pessotti. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Mariz Vainzof

1. Genética 2. Células tronco

Palavras-chave: Camundongo; Células tronco mesenquimais; Diferenciação miogênica; Medula óssea; Tecido adiposo

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais,
Mauricio e Neide,
pela educação, compreensão,
amizade, apoio e carinho.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

À minha orientadora, Dra. Mariz Vainzof, por ter me recebido em seu laboratório, pelo auxílio, disponibilidade de tempo e material.

À minha supervisora, Dra. Maeli Dal Pai Silva, pelo exemplo, apoio e ensinamentos.

À minha amiga Fernanda Losi, que me apresentou ao mundo da Biologia Molecular, sempre me incentivando, ajudando e ensinando.

Aos meus colegas de laboratório: Danielle, Poliana, Paula, André, Dinorah, Vanessa, Camila, Lydia e Martinha, pelo aprendizado e convivência harmoniosa.

Aos colegas de outros laboratórios: Natássia, Mariane, Tatiana, Eder e Marcos, pela colaboração.

Às minhas amigas Ligia, Luanne, Maria Fernanda e Marina pela amizade, convivência e por tornarem esses anos de faculdade inesquecíveis.

Ao meu namorado Tiago, pela compreensão, paciência, companheirismo, amor e carinho.

Muito obrigado por tornarem essa experiência enriquecedora e gratificante, de maior importância para meu crescimento como ser humano e profissional.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas,
que já têm a forma do nosso corpo,
e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos
mesmos lugares.

É o tempo da travessia.
E se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

Resumo

As Distrofias Musculares formam um grupo de mais de 30 doenças genéticas caracterizadas por fraqueza progressiva e degeneração dos músculos esqueléticos. Até a presente data, não há um tratamento que leve à cura das diferentes formas de distrofia. Recentes estudos têm mostrado que o transplante de células tronco pode oferecer um importante potencial terapêutico para as doenças genéticas. As células tronco mesenquimais do estroma da medula óssea adulta, têm sido identificadas como uma população de células tronco não-hematopoiéticas capazes de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens celulares, incluindo osso, gordura, cartilagem e tecido conjuntivo. Por sua semelhança com células progenitoras de músculo, espera-se que quando injetadas em indivíduos afetados, sejam capazes de migrar para as áreas de degeneração do músculo esquelético e participar de processos de regeneração. O tecido adiposo constitui uma fonte alternativa de MSCs que, como as MSCs provenientes da medula óssea, são capazes de diferenciar *in vitro* em linhagens osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas. O objetivo desse trabalho é investigar o potencial miogênico “*in vitro*” de células tronco mesenquimais isoladas de medula óssea e de tecido adiposo de camundongos. Foram utilizados 4 grupos experimentais: camundongos das linhagens *Lama2dy-2J/J* e *C57black* e, células da linhagem *C₂C₁₂* e *C₂C₁₂-eGFP* transformada. As culturas de MSCs foram obtidas a partir de aspirado de medula óssea do fêmur ou a partir de gordura da região abdominal dos camundongos. A caracterização das mesmas foi feita através de citometria de fluxo e experimentos de diferenciação *in vitro*. A diferenciação em músculo foi estudada através da análise da expressão de fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação muscular e/ou a presença e quantidade de proteínas características da célula muscular diferenciada. Foi comprovada a pluripotência das MSCs de medula óssea de ambas as linhagens e, na diferenciação muscular, a linhagem *Lama2dy-2J/J* não expressou MyoD e Miogenina, sugerindo que a mutação LAMA2 poderia de alguma forma ter influenciado em sua capacidade de diferenciar em músculo. As MSCs de tecido adiposo de *C57black* e *Lama2dy-2J/J* expressaram o marcador CD31, que é um marcador endotelial, sugerindo a contaminação destas linhagens com células de outras origens. As células *C₂C₁₂* selvagem foram diferenciadas rapidamente em músculo, formando miotubos. Por outro lado, as células *C₂C₁₂* expressando a proteína eGFP não apresentaram evidências de fusão; sugerindo que essas células têm uma menor capacidade de diferenciação que pode ser dificultada pela presença da proteína eGFP.

Palavras-chave: camundongo; células tronco mesenquimais; diferenciação miogênica; medula óssea; tecido adiposo.

Abstract

Muscular dystrophy refers to a group of more than 30 genetical disorders characterized by progressive weakness and degeneration of the skeletal muscle. No effective therapy is available at present. Recent studies have reported that the transplantation of stem cells can offer an important potential therapy for genetic diseases. Adult bone marrow mesenchymal stem cells have been identified as a nonhematopoietic stem cell population capable of self-renewal with the ability to differentiate into many cell lineages, including bone, fat, cartilage and connective tissue. Because of their similarity with muscle progenitor cells, when they are injected in affected individuals, they are able to migrate into areas of skeletal muscle degeneration and participate in the regeneration process. The adipose tissue represents an alternative source of MSCs that, as the MSCs derived from bone marrow, are capable of *in vitro* differentiation into osteogenic, adipogenic, myogenic and chondrogenic lineages. The objective of this project is to investigate the “*in vitro*” myogenic potential of mesenchymal stem cells derived from murine bone marrow and adipose tissue. Four experimental groups were analyzed: mice from lineages *Lama2dy-2J/J* and *C57black* and, *C₂C₁₂* lineage cells and transformed *C₂C₁₂* expressing the eGFP protein. MSCs cultures were obtained by flushing the bone marrow femurs and tibials with α -MEM or by the subcutaneous and inguinal fat from the mice. Their characterization was done by flow cytometry and *in vitro* differentiation. Muscle differentiation was studied through the analysis of the expression of transcriptional factors involved in muscle differentiation and/or the presence and amount of specific proteins from muscle differentiated cell. The pluripotency from bone marrow MSCs of the two lineages was evidenced and, in the muscular differentiation, the lineage *Lama2dy-2J/J* does not expressed MyoD and Myogenin, suggesting that LAMA2 mutation could influence in their capacity of muscular differentiation. The MSCs from adipose tissue of *C57black* and *Lama2dy-2J/J* expressed CD31 marker, which is an endothelial cell marker, suggesting the contamination with cells from other source. The wild type *C₂C₁₂* cells were efficiently differentiated into muscle, showing myotubes. On the other hand, *C₂C₁₂* cells expressing the eGFP protein do not exhibited evidences of myotubes formation, suggesting that those cells have less differentiation capacity what could be hampered by the presence of eGFP protein.

Key word: mouse; mesenchymal stem cell; myogenic differentiation; bone marrow; adipose tissue.

Sumário

Resumo	
Abstract	
1 Introdução	8
2 Objetivos	17
3 Material e Método	18
3.1 Camundongos	18
3.2 Cultura de Células	18
3.3 Citometria de fluxo	20
3.4 Avaliação do potencial de diferenciação	21
3.5. Extração de RNA de células	22
3.6 PCR em Tempo Real (<i>Real-Time PCR - Q-PCR</i>)	22
3.7 Western Blotting	25
4 Resultados	26
4.1 Diferenciação de Células C ₂ C ₁₂	26
4.2 Citometria de fluxo	27
4.3 Avaliação do potencial de diferenciação	39
4.4 Padronização e análise da Expressão dos genes MyoD e Miogenina por RT-qPCR	42
4.5 Estudo de proteínas por Western Blotting	45
5 Discussão	48
6 Conclusões	52
7 Referências	53

1. Introdução

O músculo

O tecido muscular, responsável pelos movimentos corporais, é constituído por células de morfologia alongada que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos altamente organizados, responsáveis pela contração muscular. O tecido muscular pode ser dividido em liso, estriado esquelético ou estriado cardíaco, conforme a sua morfologia e função.

Os músculos estriados apresentam uma aparência “listrada” ao serem observados ao microscópio óptico. Esses músculos são formados por feixes de fibras musculares longas, cilíndricas e multinucleadas, com um diâmetro que varia entre 10 e 100 μ m. Estas fibras são geradas pela fusão de células precursoras chamadas mioblastos, formando um sincício de células musculares. A observação por microscopia eletrônica revela que as listras se originam da estrutura em bandas de miofibrilas múltiplas (Voet, 2000), compostas principalmente pelas proteínas actina e miosina, organizadas com mais proteínas para formar a unidade funcional do músculo, o sarcômero. A actina é uma proteína globular bilobada com 375 resíduos que se polimeriza formando uma fibra que se localiza na região central do filamento fino. A miosina consiste de seis cadeias polipeptídicas – duas cadeias pesadas, de 220kD, cuja porção N-terminal, chamada cabeça, possui atividade ATPásica, e dois pares de cadeias leves diferentes, chamadas cadeias leves essenciais e cadeias leves regulatórias, cujo peso varia de 15 a 22kD, dependendo da sua proveniência.

As miofibrilas, de diâmetro de 1 a 2 μ m, correm longitudinalmente à fibra muscular e apresentam repetição de unidades iguais, os sarcômeros. Cada sarcômero é formado principalmente por filamentos de actina e miosina, dispostos longitudinalmente, organizados numa distribuição simétrica e paralela. Intercaladas com a actina, encontram-se as moléculas de tropomiosina e troponina, que auxiliam na ativação da cascata contrátil pela ligação com cálcio e pela exposição dos sítios de ligação na actina às cabeças de miosina. Esta organização é mantida por diversas outras proteínas, como por exemplo, filamentos de desmina, que ligam as miofibrilas umas as outras.

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 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.

Distrofias Musculares

As Distrofias Musculares Progressivas (DMPs) constituem um grupo de doenças genéticas que se caracterizam por degeneração progressiva do tecido muscular, e podem apresentar padrão de herança autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X; (Zatz, 2004). Mais de 30 formas já foram mapeadas (Hewitt *et al.*, 2003), mas acredita-se que existem formas ainda não caracterizadas geneticamente.

Na última década, mutações em vários genes foram identificadas, resultando na deficiência ou na perda de função de diferentes proteínas musculares importantes. Análises bioquímicas e imunohistológicas localizaram essas proteínas em vários compartimentos da fibra muscular. As proteínas distrofina, sarcoglicanas e disferlina são proteínas perisarcolemas ou sarcolemas; laminina 2 e colágeno VI são proteínas da matriz extracelular; teletonina e actina são proteínas sarcoméricas; calpaína 3 e FKRP são enzimas citosólicas e, emerina e lamina A/C são proteínas nucleares (Vainzof *et al.*, 2008).

O Complexo Distrofina-glicoproteínas associadas (DGC) é um complexo oligomérico que faz a conexão entre o citoesqueleto subsarcolemal e a matriz extracelular. O DGC é formado pelos sub-complexos distroglicano (α - e β -DG), sarcoglicano (α , β -, γ -, δ - e ϵ -SG), sintrofinas, e distrobrevinas. O sítio de ligação intracelular do DGC é a proteína distrofina, que possui uma função estrutural importante nas fibras musculares. Mutações no gene da distrofina causam a forma mais comum da distrofia muscular de Duchenne ligada ao X (DMD) (Hoffman *et al.*, 1987). O domínio amino-terminal da distrofina liga-se aos filamentos de actina e com o seu domínio carboxi-terminal à proteína integral de membrana β -DG. O sub-complexo sarcoglicano também possui um sítio de ligação com a β -DG e incluem α -SG, β -SG, γ -SG e δ -SG, as quais são estritamente associadas e inseridas na membrana. Mutações nos genes que codificam as 4 proteínas SG causam formas graves de distrofia muscular de cinturas tipo LGMD2D, 2E, 2C e 2F, respectivamente. A glicoproteína de membrana periférica α -DG, um receptor para a proteína de membrana basal

heterotrimérica laminina-2, liga-se à β -DG e, portanto, completa a conexão de dentro e face externa da célula (Straub e Campbell, 1997). Mutações no gene LAMA2, que codifica a cadeia α 2 da laminina-2, causam a deficiência de α 2-laminina, e uma forma grave de distrofia muscular congênita (CMD1A) ligada ao cromossomo 6q (Tomé *et al.*, 1994). Além disso, algumas formas de distrofias musculares têm recentemente sido associadas com genes que codificam supostas ou conhecidas glicosiltransferases. Análise protéica do músculo desses pacientes demonstra uma hipoglicosilação da α -DG e uma consequente redução de numerosos componentes ligantes da matrix extracelular, como a laminina-2 (Muntoni *et al.*, 2004). Outras formas brandas de distrofia muscular são causadas por mutações em genes que codificam a enzima calpaína 3 (LGMD2A), a proteína sarcolemal disferlina (LGMD2B) e a proteína sarcomérica teletonina (LGMD2G) (revisão em Vainzof e Zatz, 2007).

Desta forma, o DGC promove a ligação entre as proteínas internas da fibra muscular (ligação actina-distrofina), e a matriz extracelular (associação α -DG-laminina 2) (Muntoni & Voit, 2004), estabilizando o sarcolema e protegendo as fibras musculares de danos de contração induzida a longo prazo e necrose. Além da função mecânica e estrutural, estudos recentes sugerem que este complexo possui uma função na comunicação celular (Hack *et al.*, 2000).

O bom funcionamento destas proteínas e do complexo DGC seria responsável pelo correto mecanismo de contração muscular (Ervasti & Campbell, 1993), visto que mutações nos genes que codificam as diversas proteínas causam doenças neuromusculares no homem.

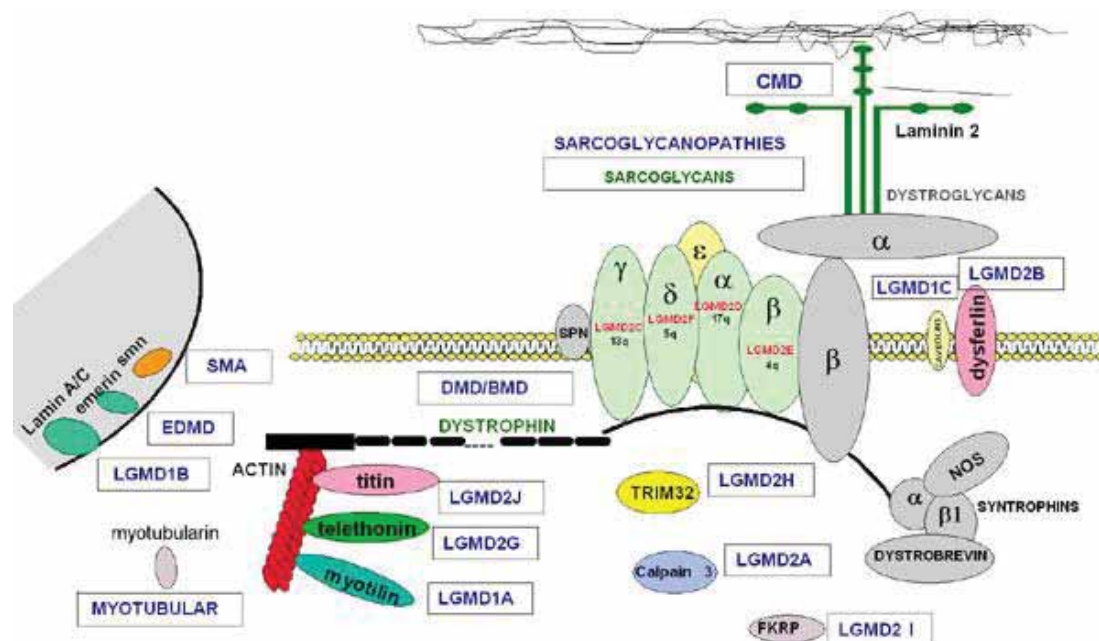


Figura 1: Representação esquemática de proteínas do sarcolema, sarcômero, citosol e núcleo envolvidas no processo de degeneração muscular nas desordens neuromusculares (Vainzof & Zatz, 2003).

Modelos Animais

Vários modelos animais manifestando fenótipos observados em doenças genéticas específicas têm sido identificados na natureza. Além disso, modelos murinos geneticamente modificados têm sido gerados. Esses animais apresentam alterações fisiopatológicas frequentemente observados em pacientes humanos, e podem ser usados como importantes ferramentas para estudos genéticos, clínicos e fisiopatológicos, provendo importantes informações para o entendimento da patogênese destas doenças (Vainzof *et al.*, 2008).

Assim, para o estudo da distrofia muscular de Duchenne, é possível fazer uso do modelo comparativo mdx (Turk *et al.*, 2005). Descrito pela primeira vez em 1984, essa linhagem de camundongos exibe naturalmente deficiência da distrofina no músculo resultante de uma mutação pontual no exon 23 resultando em um códon de parada prematuro no gene da distrofina, o que leva a ausência de distrofina detectável no músculo, com exceção de miofibras revertentes raras (Bulfield, 1984).

Para o defeito de glicosilação existe o camundongo Large^{myd} - modelo natural identificado em 1963 pelo laboratório da Jackson nos Estados Unidos - portador de uma deleção que remove os exons 4-6 do gene da Glycosyltransferase-like Large 1, que causa um códon de parada prematuro e perda de função do gene. Large é um dos cinco genes com importante papel na via de glicosilação enzimática que atua de maneira direta na via de glicosilação da proteína α -dístroglicana, e implica em várias formas de distrofia muscular, como é o caso da distrofia muscular congênita (MDC).

Os modelos murinos disponíveis para as distrofias musculares congênitas relacionadas a defeitos nas proteínas da lâmina basal são os dy/dy e sua variante alélica dy2J/dy2J. Estes camundongos apresentam defeitos na cadeia α 2 da laminina 2 muscular, e mutações no gene LAMA2, também encontrados em pacientes com DM congênita tipo 1A (Straub *et al.*, 1997). O camundongo dy/dy expressa um polipeptídeo de α 2-laminina de tamanho aparentemente normal, porém em quantidade muito reduzida levando-o a apresentar um fenótipo bastante grave de distrofia muscular, com fraqueza significativa, e ciclo de vida

reduzido (Guo, 2002). No caso da linhagem dy2J/dy2J detecta-se uma mutação no gene LAMA2 que leva a falta do domínio VI N-terminal da laminina $\alpha 2$ (Sumada, 1995).

Um outro modelo murino de interesse para o estudo do defeito na proteína sarcolemal disferlina é o SJL, portador de uma deleção de 171pb no gene que codifica a disferlina, que leva a redução de aproximadamente 85% dos níveis de disferlina no músculo, quando comparado a animais normais (Bittner *et al.*, 1999). Essa linhagem é um bom modelo para a distrofia muscular de cintura 2B (LGMD2B).

O papel crucial destes modelos animais no estabelecimento de terapias vem crescendo. Eles são amplamente utilizados em testes farmacológicos, e foram importantes em diversos experimentos de terapia gênica. Mais recentemente, modelos animais com deficiências de proteínas específicas são muito informativos para verificar o potencial terapêutico de células tronco de diferentes origens.

As células tronco

As células tronco são definidas por duas propriedades. Primeiro, elas são células que podem se dividir indefinidamente, produzindo populações idênticas à anterior. Além disso, elas também podem sofrer divisão assimétrica e dar origem a duas linhagens de células, uma idêntica à parental e outra que contém diferentes instruções genéticas e que se caracterizam por uma reduzida capacidade proliferativa e um potencial de desenvolvimento menor que da célula original. Normalmente, as células tronco são conhecidas como células progenitoras ou precursoras, comprometidas com a produção de uma ou poucas células diferenciadas (Fischbach & Fischbach, 2004).

As células tronco embrionárias e adultas diferem devido ao seu potencial de diferenciação e capacidade de expansão *in vitro*. As células tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto e, por definição, são capazes de ilimitada auto-renovação *in vitro* e possuem a habilidade de se diferenciar em qualquer tipo celular do corpo. Causas éticas e políticas a respeito dessa linhagem de células de humanos, entretanto, tornam seu uso ainda difícil. Por outro lado, as células tronco adultas constituem um reservatório para a regeneração tecidual durante a vida adulta, elas são tecido-específicas e possuem uma capacidade limitada de expansão *ex vivo* (Darabi *et al.*, 2008).

A medula óssea contém uma população heterogênea de células incluindo as células tronco hematopoiéticas (HSCs), as quais podem originar todas as linhagens sanguíneas, e uma população de células tronco adultas localizadas no estroma, conhecidas como células

tronco mesenquimais (MSCs), capazes de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens celulares, e tecidos, incluindo osso, gordura, cartilagem e tecido conjuntivo (Darabi *et al.*, 2008). Uma década atrás, Ferrari e seus colegas demonstraram pela primeira vez que as células presente na medula óssea eram capazes de migrar para áreas de degeneração do músculo esquelético e participar do processo de regeneração.

O tecido adiposo constitui uma fonte alternativa de MSCs, especificamente denominadas células tronco derivadas do tecido adiposo (ASCs). Essas células, como as MSCs provenientes da medula óssea, são capazes de diferenciar *in vitro* em linhagens osteogênicas, adipogênicas, miogênicas e condrogênicas quando tratadas com fatores específicos estabelecidos para cada linhagem (Zuk *et al.*, 2002).

Além disso, outros tecidos têm sido identificados como reservatório de populações semelhantes às células tronco mesenquimais incluindo músculo, tendão, polpa dental, ligamento periodontal, cordão sanguíneo umbilical, placenta, periosteio, fígado, cartilagem, sinovium, fluido sinovial, baço e timo (Nakahara *et al.*, 1990; Gronthos *et al.*, 2000; Romanov *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004; Pountos & Giannoudis, 2005; Bi *et al.*, 2007; Zannettino *et al.*, 2008).

Fenotipicamente, as células tronco mesenquimais expressam um conjunto de marcadores de membrana. Estes entretanto, não são específicos desta linhagem celular. Dentre eles, são marcadores positivos CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, Stro-1, bem como as moléculas de adesão CD106, CD166, molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e CD29. Por outro lado, já é bem aceito que as MSCs humanas não expressam os marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11. Elas também não expressam as moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 ou CD40 ou as moléculas de adesão CD31, CD18 ou CD56 (Haynesworth *et al.*, 1992; Galmiche *et al.*, 1993; Pittenger *et al.*, 1999; Conget *et al.*, 1999; Sordi *et al.*, 2005; Le Blanc *et al.*, 2003). MSCs provenientes de outras espécies não expressam os mesmos marcadores que as células humanas, por exemplo, embora as MSCs humanas e de ratos foram caracterizadas como CD34 negativas, alguns artigos mostram expressão variável de CD34 em MSC's murinas (Peister *et al.*, 2004). De forma geral, é aceito que todas as MSC não expressam os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45. (Chamberlain *et al.*, 2007).

Existe também uma expressão variável de vários marcadores mencionados devido ao tecido de origem, ao método de isolamento e cultura e às diferentes espécies (Javazon *et al.*, 2004; Baddoo *et al.*, 2003). Por exemplo, o tecido adiposo humano é uma fonte de células tronco multipotentes chamadas de células de lipoaspiração processadas (PLA). Entretanto, há

algumas diferenças na expressão de alguns marcadores: CD49d é expresso em células PLA mas não em MSCs, e CD106 é expresso em MSCs mas não em células PLA. CD106 em MSCs de medula óssea têm sido funcionalmente associado com a hematopoiese, assim a falta da expressão de CD106 em células PLA é consistente com a localização dessas células em um tecido não-hematopoiético (Zuk *et al.*, 2002).

Linhagens celulares estabelecidas: C₂C₁₂

Determinação é a capacidade das células ou tecidos elaborarem certo programa de desenvolvimento na ausência de seu ambiente normal, ou seja, independentemente de fatores de diferenciação e desenvolvimento externos ao programa intrínseco da própria célula (Garcia, 2001). A linhagem de células C₂C₁₂, claramente determinada, é um subclone da linhagem celular murina de mioblastos. Esta linhagem se diferencia rapidamente, formando miotubos contráteis e produzindo as proteínas musculares características. A linhagem celular C₂C₁₂, pelo seu alto potencial miogênico, é uma excelente ferramenta para o entendimento de processos específicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Seu potencial terapêutico já foi descartado, especialmente em virtude de ser carcinogênica (Rando, 1994).

Fatores de transcrição e fatores de crescimento envolvidos no processo de diferenciação muscular

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). Esses fatores pertencem à família protéica *helix-loop-helix* (HLH) e têm um papel fundamental na miogênese e na regeneração: as células onde eles não são expressos não se diferenciam em músculo (Seale & Rudnicki, 2000). As principais proteínas são *Myf5*, *MyoD*, *Myf6* (também chamado 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, Costa *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, determinando a diferenciação de mioblastos em miotubos (Brand-Saberi e Christ, 1999).

O *MyoD* (Antígeno de Diferenciação Miogênico – *Myf3*) 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 & Garry, 2001). O fator *Myf5* é expresso pelas células-satélite de camundongo e linhagens celulares miogênicas na fase proliferativa, mas a proteína não foi detectada após diferenciação e fusão em miotubos (Lindon, Montarras *et al.*, 1998; Yablonka-Reuveni, Rudnicki *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, Day *et al.*, 2008). O fator *Myf5* está estruturalmente relacionado ao *MyoD* e também atua na determinação dos mioblastos durante o desenvolvimento embrionário, auxiliando na proliferação das células satélites (Hawke & Garry, 2001). Quando a inativação do gene do *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, Brown *et al.*, 2002): os camundongos duplo-nocautes *Myf5/MyoD* não possuem musculatura esquelética porque são incapazes de diferenciar os precursores em mioblastos (Rudnicki, Schnegelsberg *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, Braun *et al.*, 1992; Weintraub, 1993; Braun e Arnold, 1996; Wang, Schnegelsberg *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

A diferenciação dos mioblastos em fibra muscular também depende de *Myf6* e, particularmente, Miogenina (Buckingham, Bajard *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, Brown *et al.*, 2002).

Outro fator de transcrição que influencia a atividade das células satélites é o *Pax7* (*paired box transcription factor 7*), expresso em células quiescentes e em proliferação. A presença de mutações neste gene causa ausência total de progenitores miogênicos no músculo (Hawke & Garry, 2001; Muntoni *et al.*, 2002). Essas descobertas suportam a hipótese de que o Pax7 é essencial para a especificação das células satélites.

O Fator de Crescimento de Hepatócitos (*HGF*) aumenta a proliferação de células precursoras miogênicas induzindo a ativação de células quiescentes, assim como diminui a sua diferenciação, inibindo os fatores regulatórios da miogênese (Chargé & Rudnicki, 2004).

O Fator de Crescimento de Fibroblastos (*FGF*) tem 9 isoformas (*FGF-1* a *FGF-9*). Os *FGF-1*, -2, -4, -6 e -9 estimulam a proliferação celular, enquanto *FGF-5*, -7 e -8 não têm atividade miogênica. Além do aumento da atividade proliferativa, essa família de fatores também atenua a diferenciação das miofibras (Hawke & Garry, 2001).

O Fator de Crescimento Transformador β (*TGF β*) é uma importante citosina regulatória do crescimento celular (Chargé & Rudnicki, 2004). A miostatina (*GDF-8*) é um dos membros desta superfamília e sua atuação inibe a proliferação e a diferenciação muscular, pois silencia a ativação dos fatores de transcrição (Hawke & Garry, 2001). Desta forma, ela determina a massa muscular esquelética e atua como regulador negativo do crescimento muscular (Muntoni *et al.*, 2002).

2. Objetivos

Os objetivos desse trabalho são investigar o potencial miogênico “in vitro” de células tronco mesenquimais isoladas de medula óssea e de tecido adiposo de diferentes linhagens de camundongos e avaliar o potencial de diferenciação miogênica de células da linhagem C₂C₁₂ expressando a proteína eGFP.

3. Material e Método

3.1 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. Foram utilizadas as linhagens de camundongos *Lama2dy-2J/J* e *C57black6* (camundongo normal). Esses animais são mantidos em nosso próprio biotério e nos biotérios do IPEN e da Faculdade de Veterinária da USP (departamento de Patologia).

3.2 Cultura de células

Foram realizadas culturas de células de diferentes origens, tais como mioblastos primários, células-tronco mesenquimais de medula óssea e de tecido adiposo e células da linhagem *C₂C₁₂* selvagem e expressando a proteína eGFP.

Cultura de mioblastos

A cultura primária de mioblastos consiste na proliferação de células musculares mononucleadas, que ainda não expressam a proteína distrofina por estarem indiferenciadas (Campion, 1984). Esta foi estabelecida a partir de fragmentos musculares de camundongos *Lama2dy-2J/J* e *C57black6*. Para a obtenção das culturas, foram sacrificados camundongos das 2 linhagens em câmara de CO₂, com a finalidade de se extrair tecido muscular. Esses tecidos foram, então, dissociados e implantados em garrafas de cultura estéreis contendo meio essencial de cultura *Dulbecco modified Eagle medium* (DMEM, GIBCO), acrescido de 20% de Soro Fetal Bovino (SFB, GIBCO) e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (GIBCO), e incubados em estufa mantida a 37°C com 5% de CO₂ em ambiente úmido. Após 4 a 7 dias, iniciou-se o processo de liberação das células satélites (mioblastos) presentes no fragmento muscular (figura 2), e a sua proliferação foi monitorada, para que elas não entrassem em processo de diferenciação. A cada 2 dias, durante a incubação, as células foram analisadas (tamanho, aspecto morfológico, quantidade, etc) e o meio de cultura foi trocado, até que atingiram o crescimento compatível a uma monocamada subconflente (70% da área cultivável recoberta por células).

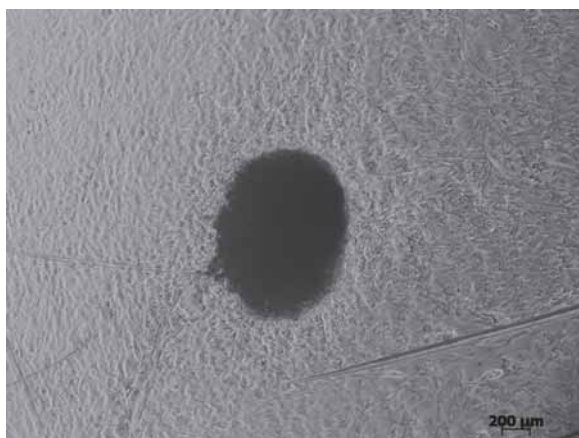


Figura 2: Processo de liberação das células satélites (mioblastos) presentes no fragmento muscular.

Para se fazer um estoque destas linhagens celulares, as células multiplicaram-se até atingirem a confluência, quando, então, foram destacadas da placa por ação enzimática de Tripsina – solução de Tripsina 25% e EDTA 1mM, em PBSA 1X (solução tampão fosfato salina sem cálcio e magnésio) – e utilizadas nos experimentos ou congeladas com a proteção de DMSO (dimetil sulfoxido), sendo conservadas em nitrogênio líquido.

Afim de promover a diferenciação das células musculares, frascos com células atingindo a confluência foram cultivados com meio DMEM com 10% de SFB e 5% de Soro de Cavalo (SC), até se fusionarem e ocorrer a formação de vários miotubos multinucleares. Nesta fase passam a expressar uma série de proteínas musculares.

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. Células dessa mesma linhagem expressando a proteína eGFP foram obtidas por transfecção, pela aluna de doutorado Paula Oliveira Onofre.

Para promover a diferenciação dessa linhagem, frascos com células parcialmente confluentes foram cultivados com meio DMEM com 3% de Soro de Cavalo (SC), até se fusionarem e ocorrer a formação de vários miotubos multinucleares.

Obtenção e cultura de células tronco mesenquimais de medula óssea e de tecido adiposo

As células tronco mesenquimais (MSC) podem ser diretamente isoladas de aspirados de medula óssea por causa de sua habilidade de adesão à superfície da garrafa de cultura. Sendo assim, camundongos das linhagens de interesse foram sacrificados numa câmara de CO₂ e sua medula óssea aspirada do fêmur e da tíbia com meio de cultura. Após lavagem pela centrifugação a 1000 RPM por 5 minutos, as células foram ressuspensas em meio α -MEM (SIGMA-ALDRICH) contendo 10% de SFB (GIBCO) e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (GIBCO). A cultura foi mantida a 37°C em incubadora de CO₂ com 5% de umidade por 24 horas. Após esse tempo, as células que não aderiram à garrafa (linhagem hematopoiética e debris) foram removidas através da aspiração do meio de cultura, restando aderidas as células tronco mesenquimais. Depois de trocas consecutivas do meio, a cultura foi se tornando enriquecida e homogênea, com a remoção da contaminação inicial provocada pelas células hematopoiéticas também presentes na medula óssea recém extraída.

A separação de ASCs foi realizada a partir do tecido adiposo subcutâneo e da região inguinal. O tecido foi lavado com PBS (*phosphate-buffered saline*) contendo 2,5% de antibióticos penicilina e estreptomicina (GIBCO) seguida pela dissociação com 0,075% de colagenase (Sigma) a 37°C por 30 minutos. A atividade da colagenase é neutralizada por D-MEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 - Invitrogen) contendo 10% SFB (Soro Fetal Bovino – Gibco). O infranadante foi centrifugado a 1200 x G por 5 minutos. As células do pellet foram plaqueadas em frascos de cultivo celular em D-MEM/F12 contendo 20% FBS e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (GIBCO). A cultura foi mantida a 37°C em incubadora de CO₂ com 5% de umidade e são lavadas com PBS 72 horas após serem plaqueadas para remover as células mortas.

Quando as células atingiram a confluência, foram realizadas subseqüentes passagens com a finalidade de proliferação, estocagem, caracterização e utilização das mesmas nos experimentos de diferenciação *in vitro*.

3.3 Citometria de fluxo

As células foram caracterizadas analisando a expressão de proteínas de membrana por citometria de fluxo. A citometria de fluxo foi realizada utilizando o citômetro Guava EasyCyte System (Guava Technologies) com um laser azul (488 nm). As células foram tripsinizadas, seguida pela centrifugação 300 x G por 5 minutos e ressuspensas em PBS a

concentração de 1×10^5 cells/ml. Para cada anticorpo foram utilizadas 1×10^5 células. Estas foram incubadas no escuro por 45 minutos em temperatura ambiente com os anticorpos primários conjugados, na concentração e condições descritas pelo fabricante. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas em 0,20 ml de PBS gelado.

O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas. As células foram separadas pelo “*forward scatter*” para eliminar os *debris*. Para eliminar uma possível autofluorescência das MSCs, os parâmetros foram ajustados de maneira a remover qualquer contribuição das células não marcadas. Para cada amostra foram contados no mínimo 5000 eventos.

Foram analisados os marcadores nas células murinas: CD29-PE, CD105-PE, CD90-PE, CD44-PE, CD31-PE, CD34-PE, CD13-PE e CD45-PerCP-CyTM5.5 (BD Pharmingen).

O fluoróforo PE ou ficoeritrina é um pigmento fotossintético encontrado em algas vermelhas. A excitação deste ocorre a 566 nm e sua emissão a 576 nm, comprimento de onda correspondente a cor amarela. Já o fluoróforo PerCP-CyTM5.5 é um sistema conjugado que combina Per-CP (componente do aparato fotossintético encontrado no dinoflagelado *Glenodinium*) com o corante cianina (Cy5.5). Sua excitação ocorre a 482 nm e sua emissão a 696 nm, comprimento de onda correspondente a cor vermelha.

3.4 Avaliação do potencial de diferenciação

A verificação do potencial de diferenciação das MSCs em várias linhagens celulares foi realizada utilizando meios de indução segundo protocolos descritos por Zuk *et al.* (2002).

Para confirmar a diferenciação adipogênica, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 minutos e coradas com 0,3% de Oil Red (Sigma) por 15 minutos. A diferenciação osteogênica foi avaliada pela coloração de von Kossa. Para tal, as células foram coradas com 1% de nitrato de prata (Sigma) por 45 minutos sobre luz ultravioleta. Em seguida as células foram tratadas com 1% Safranina (Sigma) por 5 minutos e coradas com van Gienson também por 5 minutos. Na diferenciação miogênica, as culturas foram submetidas ao processo de extração de RNA e de proteínas para a sua análise molecular e através da técnica de *Western blotting*, para proteínas musculares.

3.5 Extração de RNA de células

A extração de RNA total dos experimentos de cultura celular foi realizada com o reagente Trizol® (Invitrogen), conforme as especificações do fabricante. O RNA foi diluído em água tratada com dietilpírocarbonato 0,01% (DEPC) (livre de ribonucleases) e armazenado em freezer -70°C . Para a síntese de DNA codificante total (cDNA), o RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro, utilizando-se 1 mg de RNA total diluído em 5mL de água ultra pura (água classe 1), acrescentando-se 1.5mg de random primer e 0.5mg de oligo dT ao RNA e deixando-se 10 minutos a 65°C em termociclador. Após esta primeira incubação, adicionou-se os demais reagentes obtendo-se um tampão de reação 50mM de Tris-HCl pH 8,3 / 75mM de KCl / 3mM de MgCl₂ (5x First Strand Buffer – Invitrogen), 10mM de DTT (Invitrogen), 50U/ μL de transcriptase reversa (Superscript™ II, Invitrogen), 0,25U de inibidor de ribonuclease (Invitrogen), 1mM de cada dNTP (Invitrogen) e água classe 1 tratada com DEPC, num volume total de 20ml. A mistura foi incubada a 45°C por 1 hora em termociclador e o cDNA pronto foi estocado em freezer -20°C .

3.6 PCR em Tempo Real (*Real-Time PCR - Q-PCR*) – Quantificação Relativa

Foram selecionados para este estudo os genes *MyoD* e Miogenina (Chen e Goldhamer, 2003), sendo que o gene GAPDH foi utilizado como gene endógeno, necessário para a normalização dos dados obtidos.

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 (tabela 1) e o *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), em um volume final de 25 μL . Cada placa foi corrida no termociclador para Real-Time 7500 da Applied Biosystems utilizando-se os seguintes parâmetros: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para cada amostra, foi plotado um gráfico de amplificação mostrando o aumento da fluorescência do SYBR® Green (ΔRn) em cada ciclo da PCR. Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A reação de amplificação será específica quando a curva de dissociação apresentar um único pico, mostrando que os produtos amplicados apresentaram o mesmo tamanho e, portanto, desnaturaram na mesma temperatura, de acordo com a queda brusca de fluorescência do SYBR Green observada nessa curva (Guide to Performing

Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems, 2004).

Para validar o Método do $\Delta\Delta Ct$, em uma placa de reação foram construídas duas curvas-padrão, uma para os genes alvo (MyoD e Miogenina) e uma para o gene endógeno (GAPDH), utilizando-se como amostra inicial o cDNA da linhagem de células C₂C₁₂ diferenciadas em músculo. O primeiro ponto da curva correspondia à mistura inicial de cDNA (1ng RNA), o segundo ponto correspondia à diluição na ordem de 1:2 do ponto anterior (0,5ng RNA), e assim, sucessivamente, até completarem-se sete diluições (0,25ng; 0,125ng; 0,0625ng; 0,03125ng e 0,015625ng).

Tabela 1. Primers utilizados na RT-PCR em Tempo Real.

Gene	Seqüência do primer (5' – 3')
MyoD	S: TAC AGT GGC GAC TCA GAT GC A: TAG TAG GCG GTG TCG TAG CC
Miogenina	S: CAG TAC ATT GAG CGC CTA CAG A: GGA CCG AAC TCC AGT GCA T
GAPDH	S: AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG A: TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA

Após a reação de qRT-PCR, o Software “7500 System SDS” (Applied Biosystems) gerou um gráfico de amplificação para cada amostra da placa. A partir dos gráficos obtidos para os sete pontos da curva-padrão, foram determinados o Baseline e o Ciclo Threshold (Ct). O Baseline corresponde à fluorescência emitida nos primeiros ciclos da PCR antes do termociclador detectar a fluorescência do amplicon específico. O Ct corresponde ao ciclo da PCR no qual a fluorescência gerada na reação ultrapassa o limiar de detecção (Threshold), determinado manual ou automaticamente pelo software. Esse limiar é traçado para que as amostras sejam comparadas numa mesma condição de reação, incluindo a fase exponencial

(Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems, 2004).

O mesmo software também produz a curva padrão a partir da plotação do C_T (eixo y) versus o log das sete diluições do cDNA (eixo x). A inclinação da curva padrão (a ou slope) descreve a eficiência da PCR e, é definida pela equação: $C_T = a(\log Q) + b$, onde C_T é o ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção (cycle threshold - Ct), Q é a quantidade inicial e b é a interseção do eixo y. Quando a amplificação da PCR possui 100 % de eficiência, resultando no dobro do produto a cada ciclo, a inclinação será -3,32 (Medhurst *et al.*, 2000). A eficiência da PCR (E_x) é calculada a partir da equação $E_x = 10^{-1/\text{inclinação}} - 1$ (Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems, 2004).

Para realizar a validação do Método do $\Delta\Delta C_t$, ou seja, para confirmar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e constitutivo são iguais (100%), os dados obtidos para as curvas-padrão dos genes alvos (MyoD e Miogenina) e do gene endógeno (GAPDH) foram utilizados para construir gráficos representando o valor de ΔC_t (eixo y), onde $\Delta C_t = C_t \text{ alvo} - C_t \text{ endógeno}$, versus o valor do log das diluições utilizadas no eixo x. A quantificação relativa da expressão gênica pode ser realizada por dois métodos: a análise da curva padrão e o C_t comparativo (Wong & Medrano, 2005). Durante a realização do protocolo para a validação do Método do $\Delta\Delta C_t$, se o valor da inclinação da reta obtido for menor que 0.1, o Método do $\Delta\Delta C_t$ pode ser utilizado e a quantificação relativa da expressão gênica é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (User Bulletin #2, Applied Biosystems, 2001).

Após a validação do $\Delta\Delta C_t$, foram construídas placas contendo as amostras individuais de cDNA das células de cada grupo, um controle negativo da PCR (amostra substituída por água livre de RNase) e um controle negativo para a reação de transcrição reversa (amostra substituída por mistura inicial contendo quantidades iguais de RNA de todas as amostras). Os valores obtidos não foram comparados estatisticamente devido ao pequeno tamanho do n dos grupos experimentais, de modo que a análise qualitativa foi suficiente para a interpretação dos nossos resultados.

3.7 Western blotting

A metodologia descrita a seguir foi realizada no trabalho de Zubrzycka-Gaarn *et al.* (1988): As células foram cultivadas em frascos próprios até a confluência, sendo então liberadas da garrafa e lavadas com PBS 1X. Depois de preparadas e homogeneizadas, foi realizado o processo de extração de proteínas, submetidos ao contato com tampão de solubilização fervente (SDS, DTT, EDTA, tris, pH 8,0), onde uma alíquota de amostra foi misturada na proporção 1:1 de tampão de amostra (tris, glicerol, SDS, mercaptoetanol, BFB, pH 6,8), submetida à fervura, aplicada em mini-gel de poliacrilamida e corrida sob tensão de 70V.

Para a determinação das bandas das proteínas em estudo, o experimento foi realizado, aplicando-se um volume de extrato de proteínas totais em gel de poliacrilamida. Após a eletroforese, o gel é eletro-transferido para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente 250-300 mA, durante 1 hora a temperatura de 4°C. A membrana foi seca, lavada com água destilada e corada com Ponceau, um corante de proteína que permite checar a transferência do gel para a membrana de nitrocelulose, também funcionando como um controle positivo da presença de proteínas nos extratos. Em seguida, a membrana foi descorada com TTBS (TBS 1x com Tween 20 0,05%) e submetida à reação com anticorpos primários overnight. Os anticorpos secundários utilizados foram ligados à fosfatase alcalina e a reação foi revelada com NBT e BCIP, evidenciando uma banda de coloração roxa. Uma amostra de peso molecular padrão foi incluída em cada *blot* para construção de curva de peso molecular. Para esta análise, foram preparados extratos de proteínas das culturas celulares primárias, de células tronco de medula óssea e de tecido adiposo e células da linhagem C₂C₁₂ selvagem e expressando a proteína eGFP indiferenciadas e diferenciadas em músculo.

A identificação das proteínas foi feita através do anticorpo primário:

- **ANTI-DISTROFINA VP-D508 (VECTOR)**: Anticorpo policlonal de região N-terminal desenvolvido em camundongo.
- **α -ACTININA**: anticorpo de pesquisa do laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada desenvolvido em coelho.
- **MIOSINA ANTI-ESQUELÉTICA**: anticorpo específico para a banda A da miosina esquelética humana, desenvolvido em coelho.

4. Resultados

4.1 Diferenciação de Células C₂C₁₂

Para promover a diferenciação dessa linhagem selvagem, frascos com células pouco confluentes foram cultivados com meio DMEM com 3% de Soro de Cavalo (SC) durante 7 dias, até se fusionarem e ocorrer a formação de vários miotubos multinucleares, como mostrado na Figura 3. Células dessa mesma linhagem transfectadas com o gene eGFP foram cultivadas com meio DMEM com 10% de SFB e 5% de SC durante 4 dias, visto que essas células possuem uma maior dificuldade em diferenciar-se em miotubos, e se destacam da placa facilmente, como mostra a Figura 4.

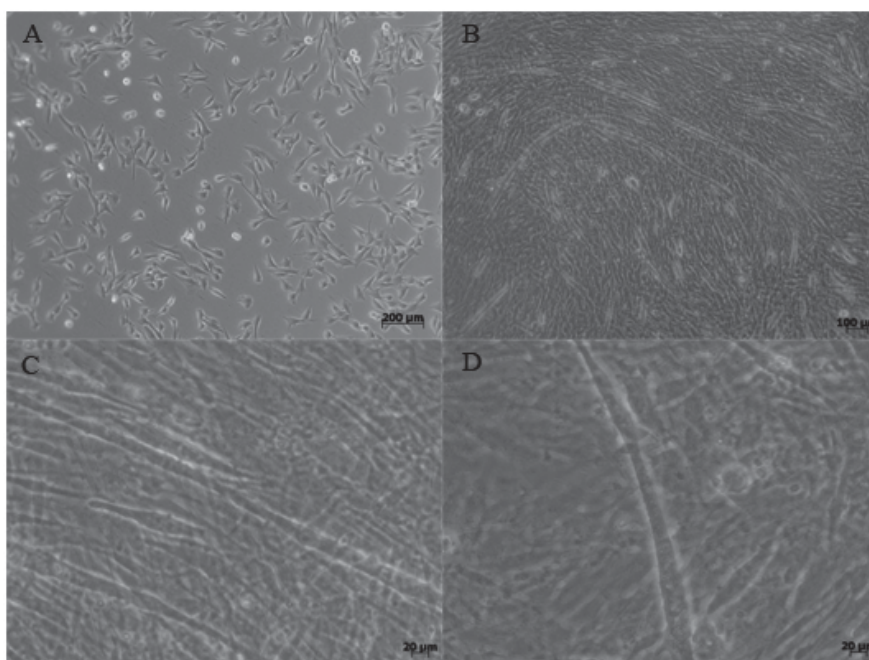


Figura 3: A- Morfologia das células C₂C₁₂ indiferenciadas, B/C/D- células C₂C₁₂ diferenciadas após 7 dias com 3% de soro de cavalo.

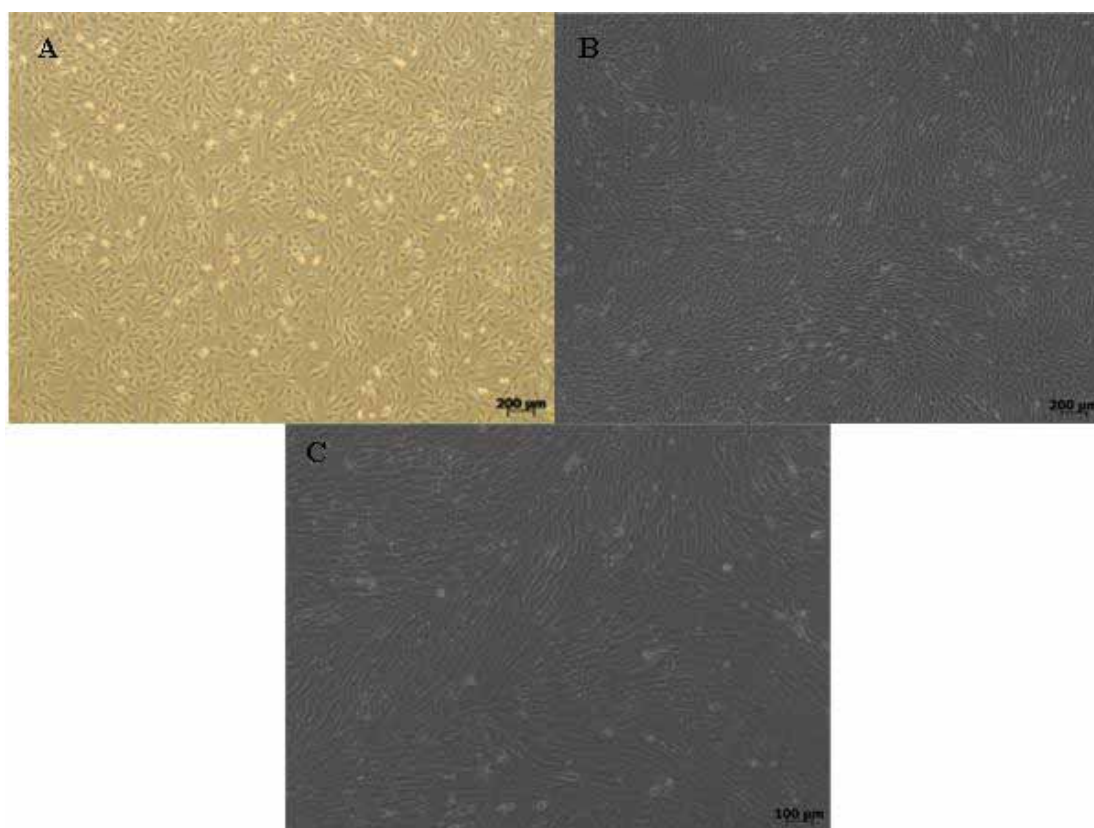


Figura 4: A- Morfologia das células C_2C_{12} transfectada com a proteína eGFP indiferenciadas, B/C- células C_2C_{12} diferenciadas após 4 dias com 10% de soro fetal bovino e 5% de soro de cavalo.

4.2 Citometria de Fluxo

Linhagem C_2C_{12}

Foi realizada a citometria de fluxo para confirmar a expressão da proteína eGFP nas células dessa linhagem transfectada, de acordo com a figura 5. Essa linhagem possui 95% de suas células expressando a proteína eGFP.

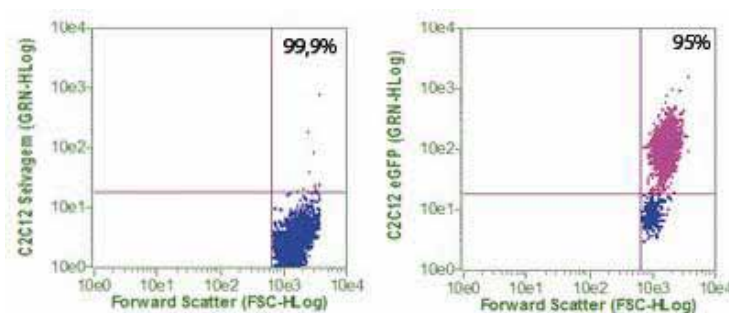


Figura 5: Citometria de fluxo de células da linhagem C₂C₁₂ selvagem e transfectadas com a proteína eGFP. O eixo x representa o tamanho da célula (forward scatter) e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

De acordo com a citometria de fluxo, as células tronco mesenquimais de medula óssea isoladas da linhagem C57black foram positivas para CD29 (99%), CD44 (99%) e CD13 (83%), e negativas para CD90 (20%), CD105 (6%), CD34 (1%), CD31 (3%) e CD45 (3%) (Figura 6). Esse mesmo tipo celular isolado da linhagem *Lama2dy-2J/J* foi positivo para CD29 (99%), CD105 (96%), CD90 (99%), CD44 (98%) e CD13 (70%), e negativas para CD34 (3%), CD31 (7%) e CD45 (6%) (Figura 7).

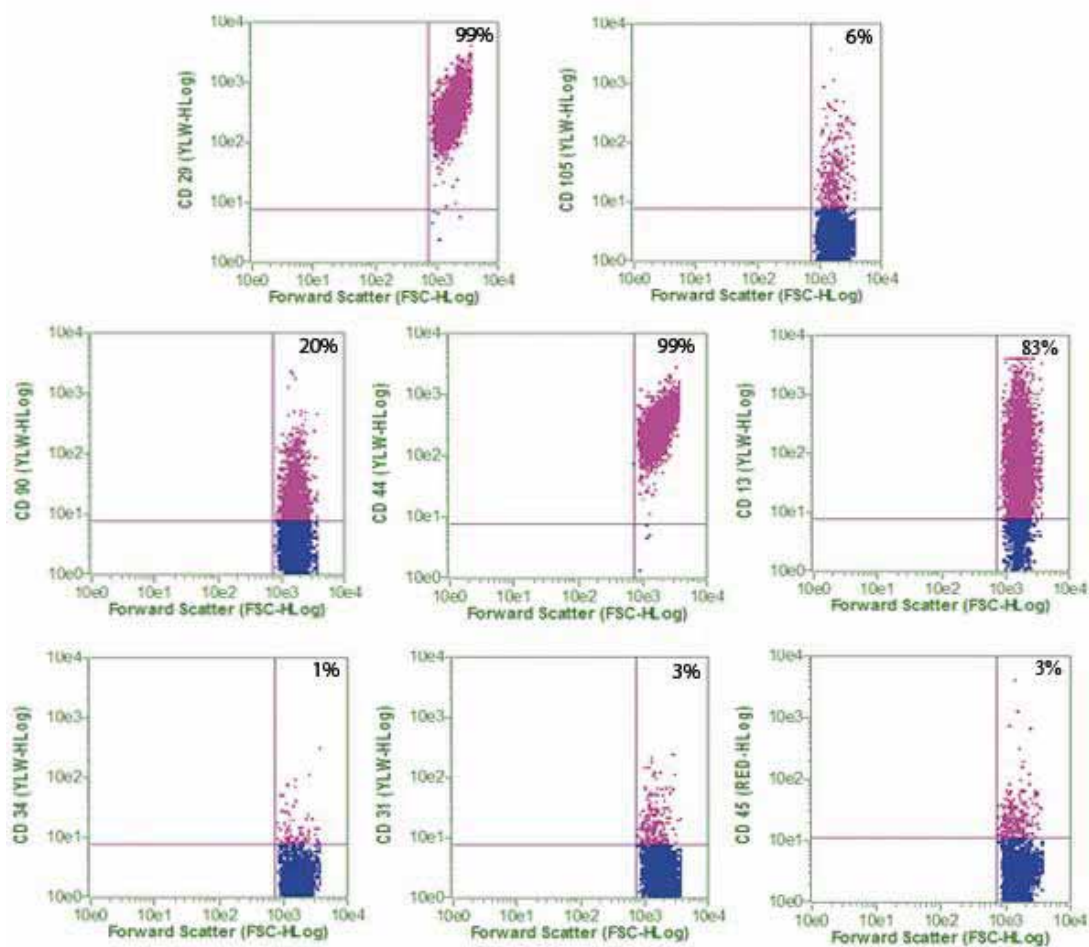


Figura 6: Citometria de fluxo de células tronco mesenquimais de medula óssea isoladas da linhagem *C57black*. O eixo x representa o tamanho da célula (forward scatter) e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

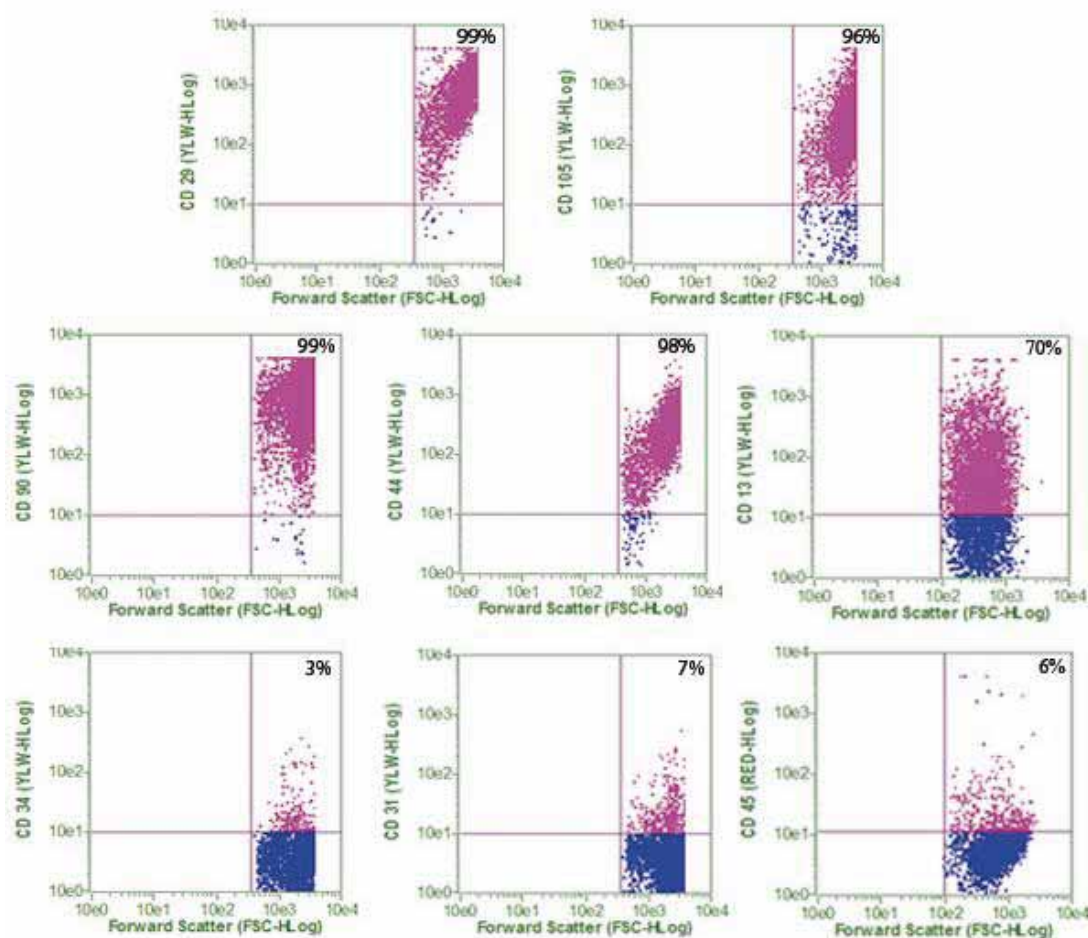


Figura 7: Citometria de fluxo de células tronco mesenquimais de medula óssea isoladas da linhagem *Lama2dy-2J/J*. O eixo x representa o tamanho da célula (forward scatter) e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As células tronco mesenquimais de tecido adiposo isoladas da linhagem C57black foram positivas para CD29 (97%), CD105 (86%), CD90 (99%), CD44 (99%), CD13 (85%) e CD31 (80%), e negativas para CD34 (4%) e CD45 (10%) (Figura 8). Esse mesmo tipo celular isolado da linhagem *Lama2dy-2J/J* foi positivo para CD29 (96%), CD105 (87%), CD90 (97%), CD44 (99%) e CD31 (96%), e negativas para CD34 (9%) e CD45 (3%) e CD13 (9%) (Figura 9).

A tabela 2 resume a expressão dos marcadores de membrana das células tronco mesenquimais isoladas de medula óssea e tecido adiposo.

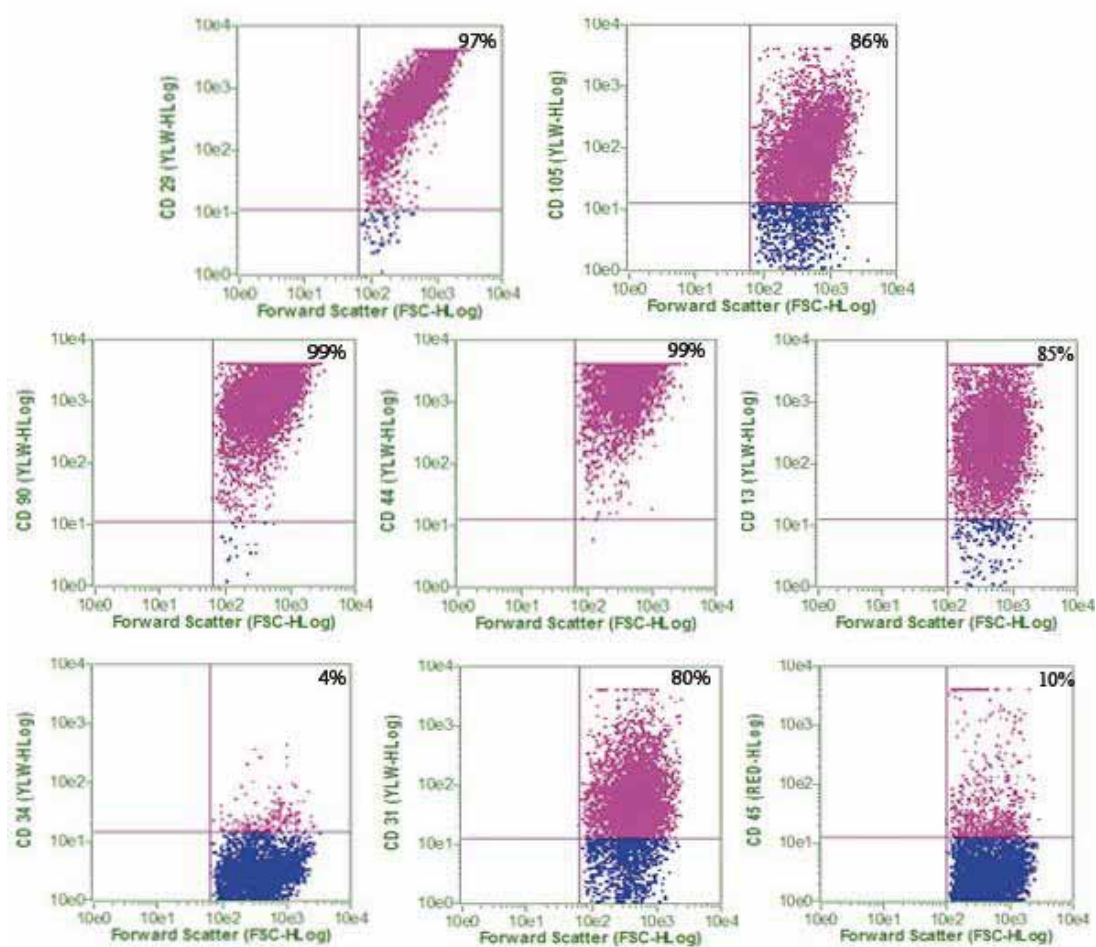


Figura 8: Citometria de fluxo para células tronco mesenquimais de tecido adiposo isoladas da linhagem *C57black*. O eixo x representa o tamanho da célula (forward scatter) e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

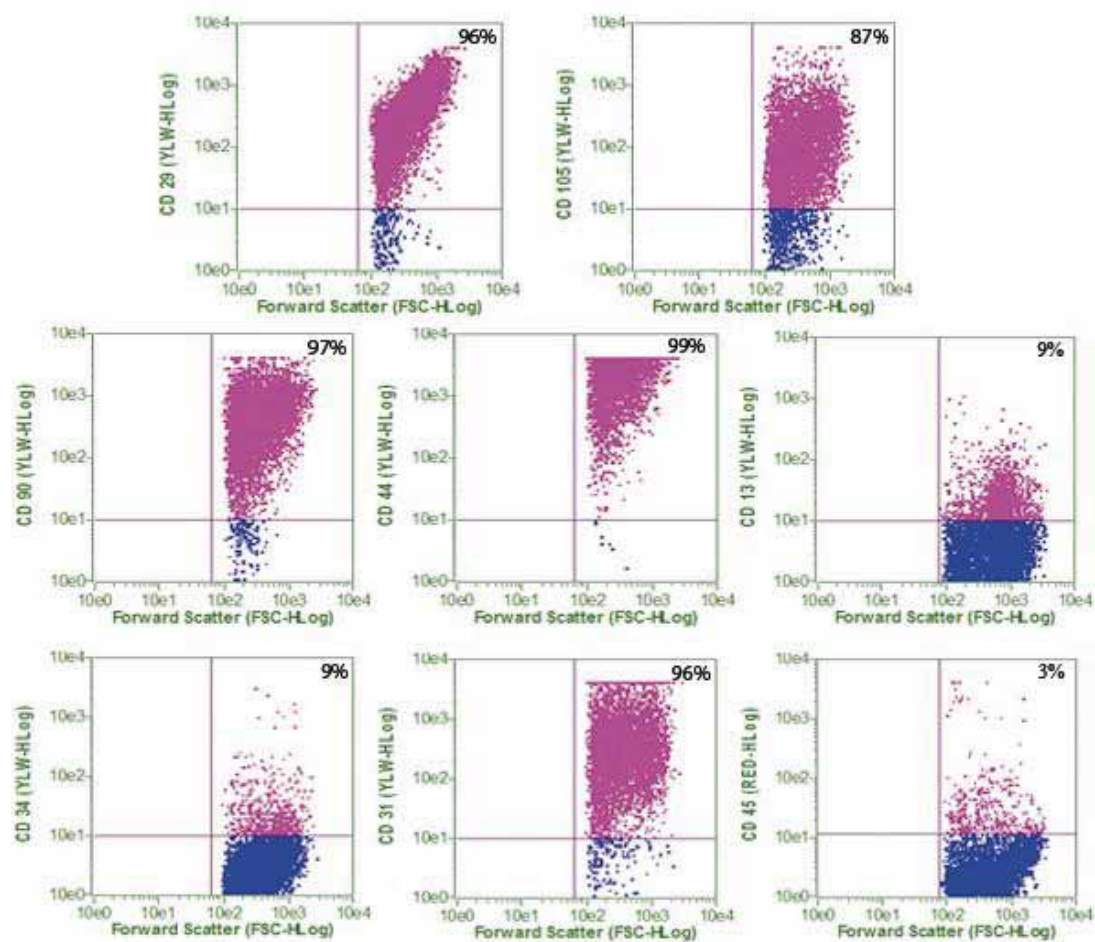


Figura 9: Citometria de fluxo para células tronco mesenquimais de tecido adiposo isoladas da linhagem *Lama2dy-2J/J*. O eixo x representa o tamanho da célula (forward scatter) e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

Tabela 2: Expressão dos marcadores de membrana das células tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e tecido adiposo.

Marcadores Moleculares	Esperado	MSCs de medula óssea		MSCs de tecido adiposo	
		<i>C57black</i>	<i>Lama2dy-2J/J</i>	<i>C57black</i>	<i>Lama2dy-2J/J</i>
CD29	+	+	+	+	+
CD105	+	-	+	+	+
CD90	+	-	+	+	+
CD44	+	+	+	+	+
CD13	+	+	+	+	-
CD31	-	-	-	+	+
CD34	-	-	-	-	-
CD45	-	-	-	-	-

O marcador CD31, também chamado de PECAM-1, é uma molécula de adesão de células endoteliais (Chamberlain *et al.*, 2007) e, de acordo com a literatura, as células tronco mesenquimais não expressam esta molécula. Sendo assim, decidimos estudar melhor a razão do isolamento destas células dentro do processo de implantação de células tronco mesenquimais do tecido adiposo.

Para investigar como essas células são selecionadas ao longo da cultura, optamos por analisar todas as passagens no citômetro de fluxo, inclusive o volume inicial de células implantadas e o sobrenadante (células que não aderiram na placa de cultura).

O tecido adiposo foi digerido com 0,075% de colagenase, centrifugado e as células do pellet foram ressuspensas com meio DMEM/F12. Metade dessas células foram plaqueadas e a outra metade foi analisada pela citometria de fluxo. Nesse volume inicial de células, 21% dessas eram positivas para CD29, 7% para CD105, 41% para CD90, 6% para CD44, 45% para CD13, 4% para CD34, 7% para CD31 e 22% para CD45 (Figura 10).

A outra metade do volume inicial de células foi plaqueada e as células que não aderiram na placa eram 40% positivas para CD29, 13% para CD105, 59% para CD90, 18% para CD44, 95% para CD13, 12% para CD34, 10% para CD31 e 46% para CD45 (Figura 11).

Na passagem zero, as células eram 99% positivas para CD29, 62% para CD105, 99% para CD90, 99% para CD44, 29% para CD13, 3% para CD34, 12% para CD31 e 20% para CD45 (Figura 12).

Na primeira passagem, as células eram 99% positivas para CD29, 21% para CD105, 72% para CD90, 99% para CD44, 56% para CD13, 3% para CD34, 1% para CD31 e 2% para CD45 (Figura 13).

E, finalmente, na segunda passagem, as células eram 86% positivas para CD29, 37% para CD105, 78% para CD90, 85% para CD44, 20% para CD13, 4% para CD34, 4% para CD31 e 8% para CD45 (Figura 14).

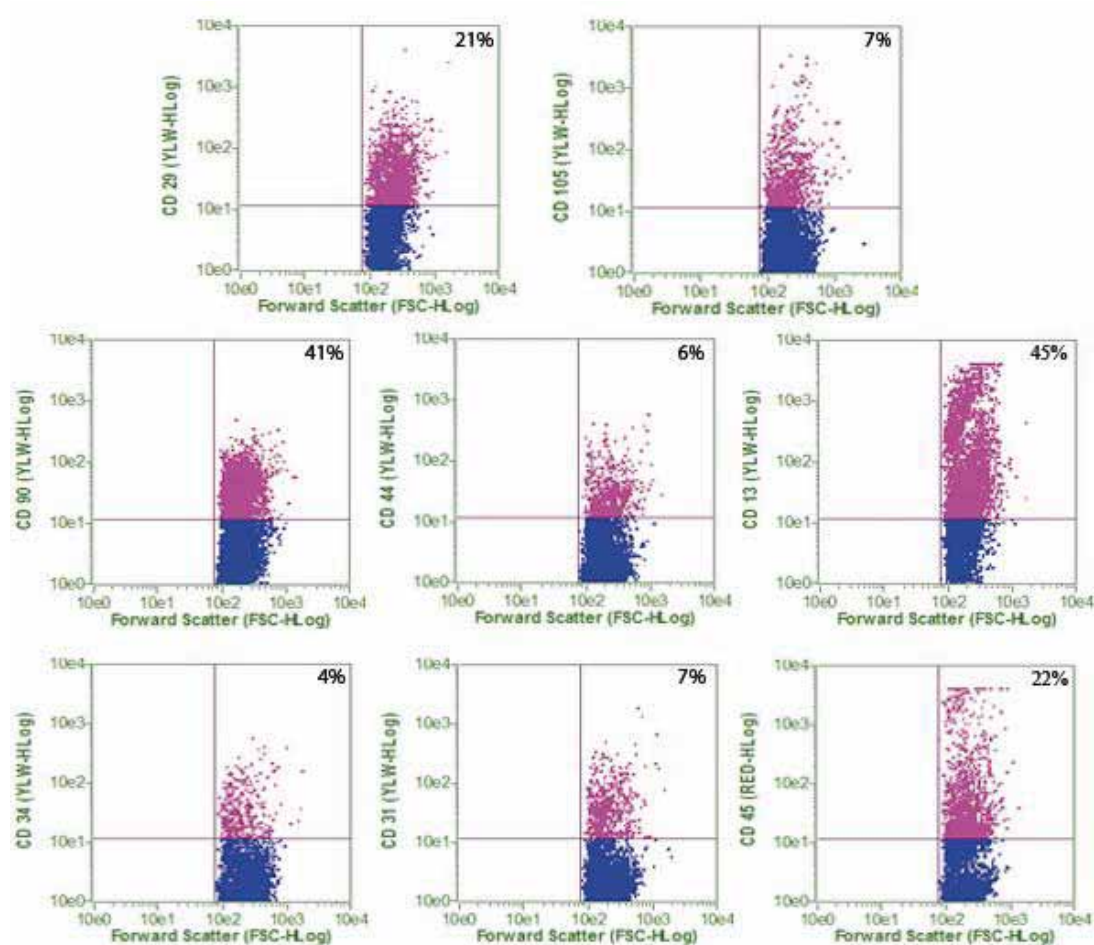


Figura 10: Citometria de fluxo do volume inicial de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo plaqueadas. O eixo x representa o tamanho da célula (forward scatter) e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

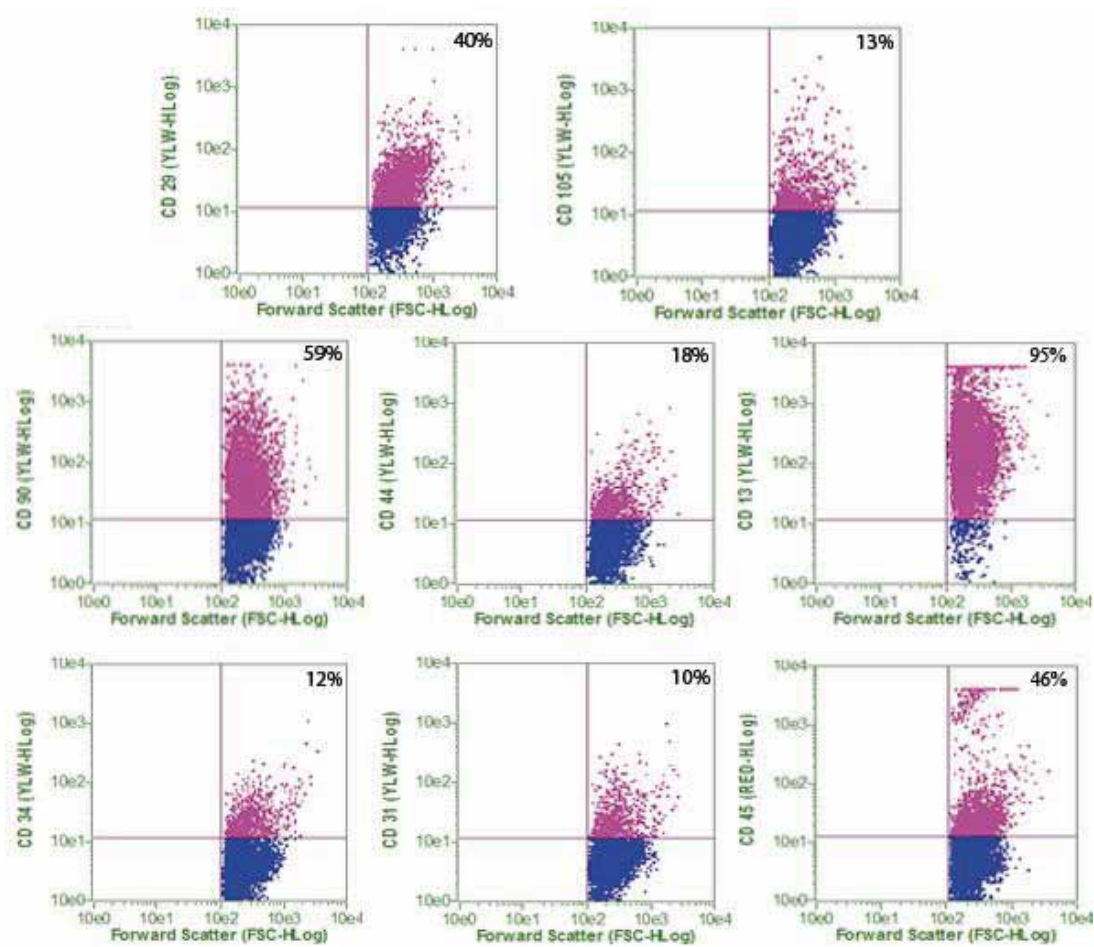


Figura 11: Citometria de fluxo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo não aderentes. O eixo x representa o tamanho da célula e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

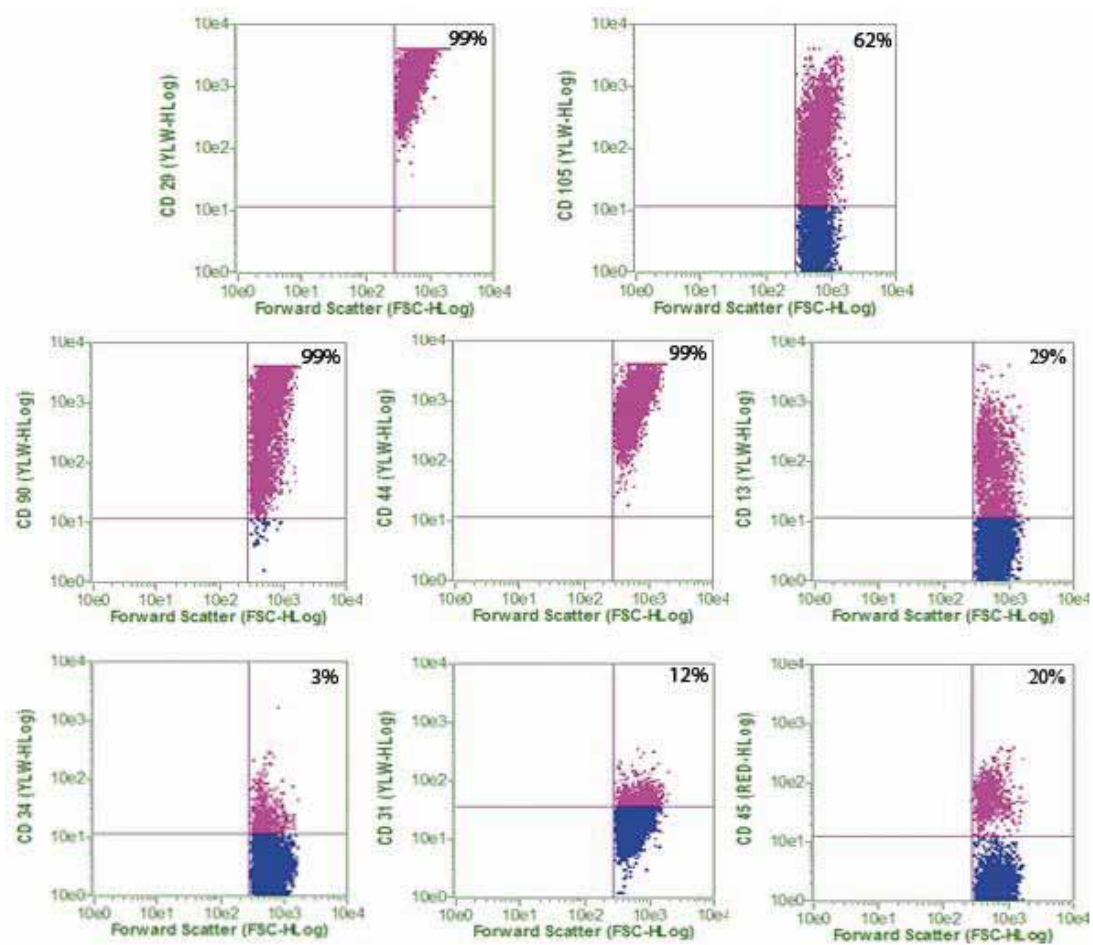


Figura 12: Citometria de fluxo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo da passagem zero. O eixo x representa o tamanho da célula e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

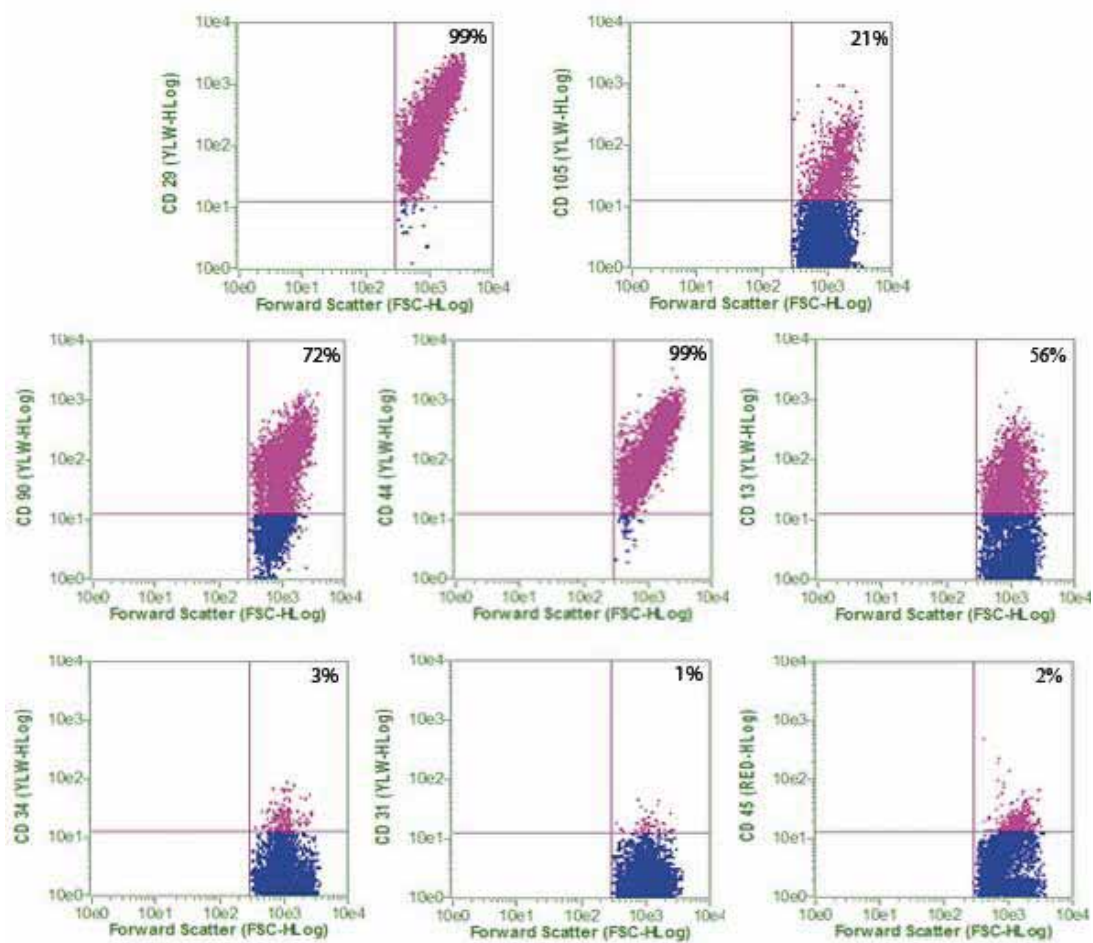


Figura 13: Citometria de fluxo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo da passagem um. O eixo x representa o tamanho da célula e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

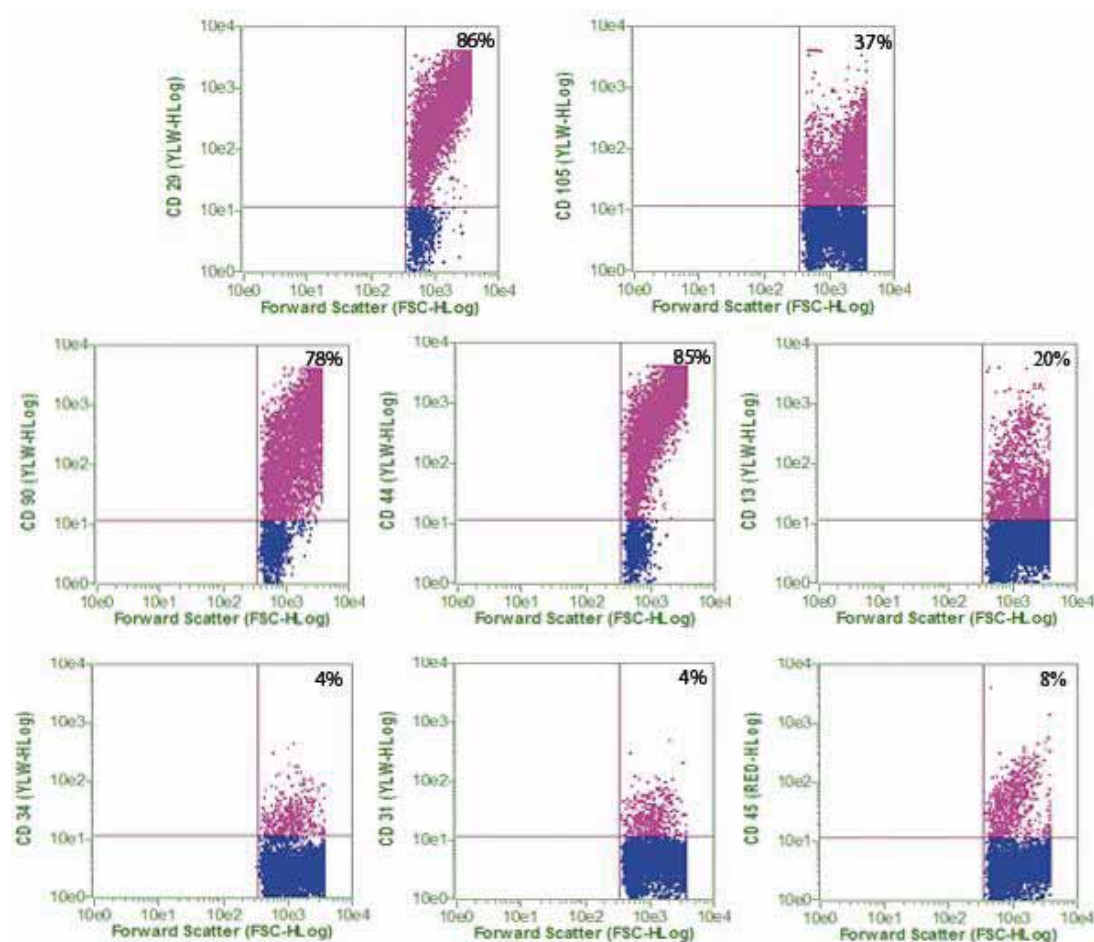


Figura 14: Citometria de fluxo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo da passagem dois. O eixo x representa o tamanho da célula e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

O marcador de membrana CD31 não foi expresso em nenhuma das passagens aderentes.

Em seguida, testamos a hipótese da alta confluência das células como causa da diferenciação e expressão do marcador CD31. Para isso, uma linhagem de células tronco mesenquimais do tecido adiposo, caracterizada previamente como negativa para CD31, foi deixada em uma confluência de 100% e então, as células foram caracterizadas por citometria de fluxo como sendo 99% positivas para CD29, 98% para CD105, 99% para CD90, 99% para CD44, 95% para CD13, 3% para CD34, 3% para CD31 e 2% para CD45 (Figura 15). Portanto, a confluência não é a causa do aumento da proporção de células CD31 positivas nestas linhagens.

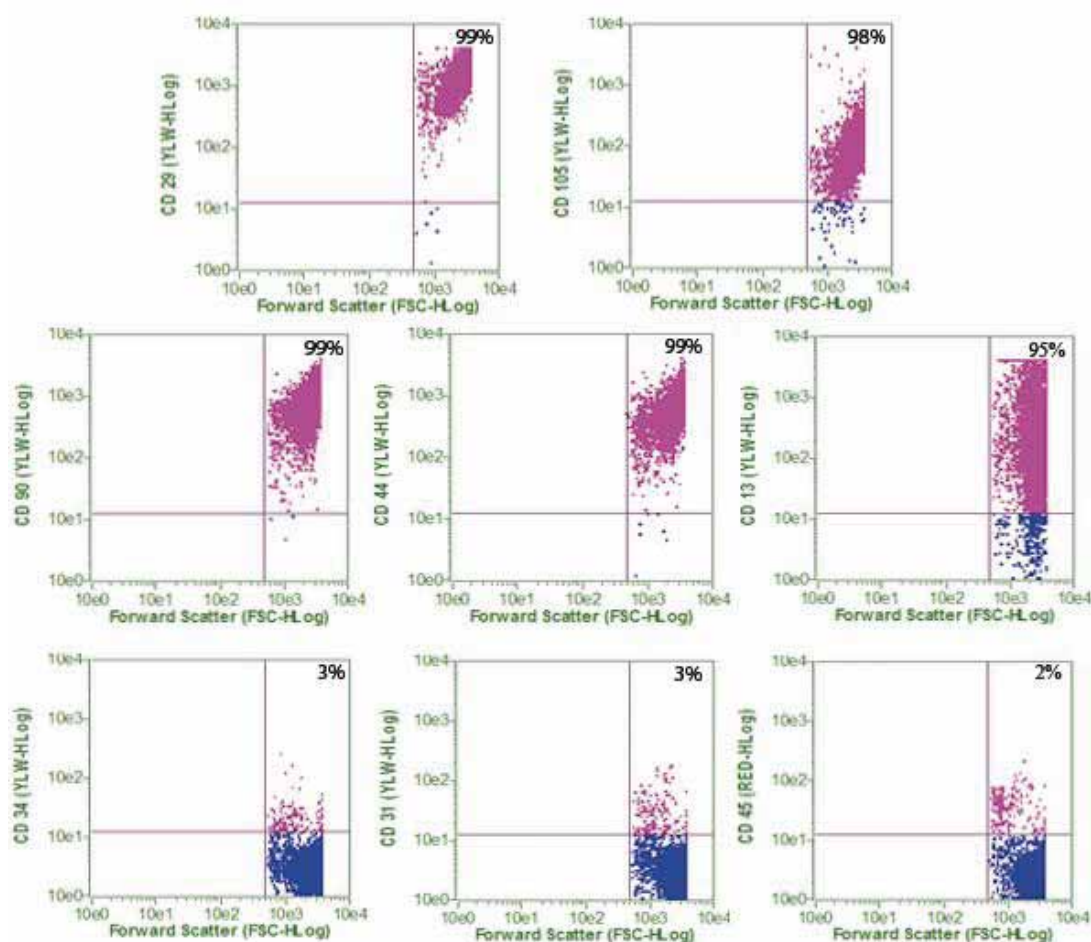


Figura 15: Citometria de fluxo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo com 100% de confluência. O eixo x representa o tamanho da célula e o eixo y a intensidade da respectiva fluorescência (GRN-verde, YLW-amarelo, RED-vermelho).

4.3 Avaliação do potencial de diferenciação

Para verificar se as células tronco mesenquimais de medula óssea mantiveram seu potencial de diferenciação, as células foram cultivadas em meios de indução adipogênica, osteogênica e condrogênica, descritos por Zuk *et al.* (2001). As células adquiriram características das células diferenciadas como esperado (Figuras 16 e 17).

As células expostas ao meio adipogênico atingiram morfologia de adipócitos após 10 dias de cultivo. A presença de lipídios no citoplasma foi confirmada pela coloração com Oil Red O (Figuras 16B e 17B). No cultivo com meio osteogênico, por 2 semanas, foi possível observar o acúmulo de cálcio pela coloração de von Kossa. (Figuras 16F e 17F). Nas células

expostas ao meio condrogênico, por 2 semanas, foi possível observar a presença de mucopolissacarídeos na matriz extracelular pela coloração azul de toluidina (Figuras 16D e 17D). As células cultivadas em α -MEM 10% SFB não apresentaram as características descritas acima (Figuras 16A/C/E e 17A/C/E).

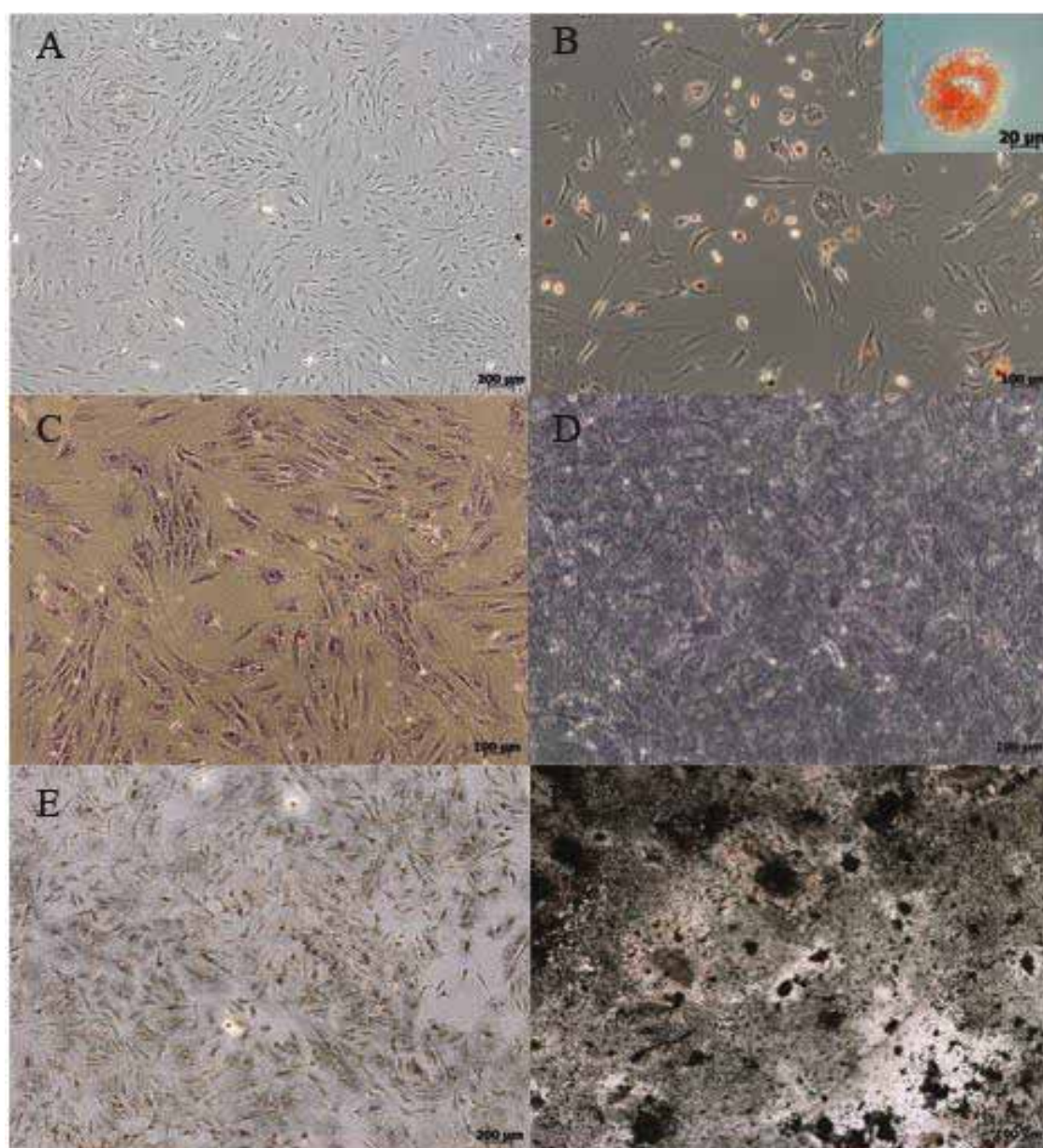


Figura 16: Avaliação do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais de medula óssea da linhagem *C57black*. A/C/E- coloração Oil Red, Azul de toluidina e Von Kossa, respectivamente em células cultivadas em α -MEM 10% SFB, B- células cultivadas

em meios de indução adipogênico, D- células cultivadas em meios de indução condrogênico, F- células cultivadas em meios de indução osteogênico.

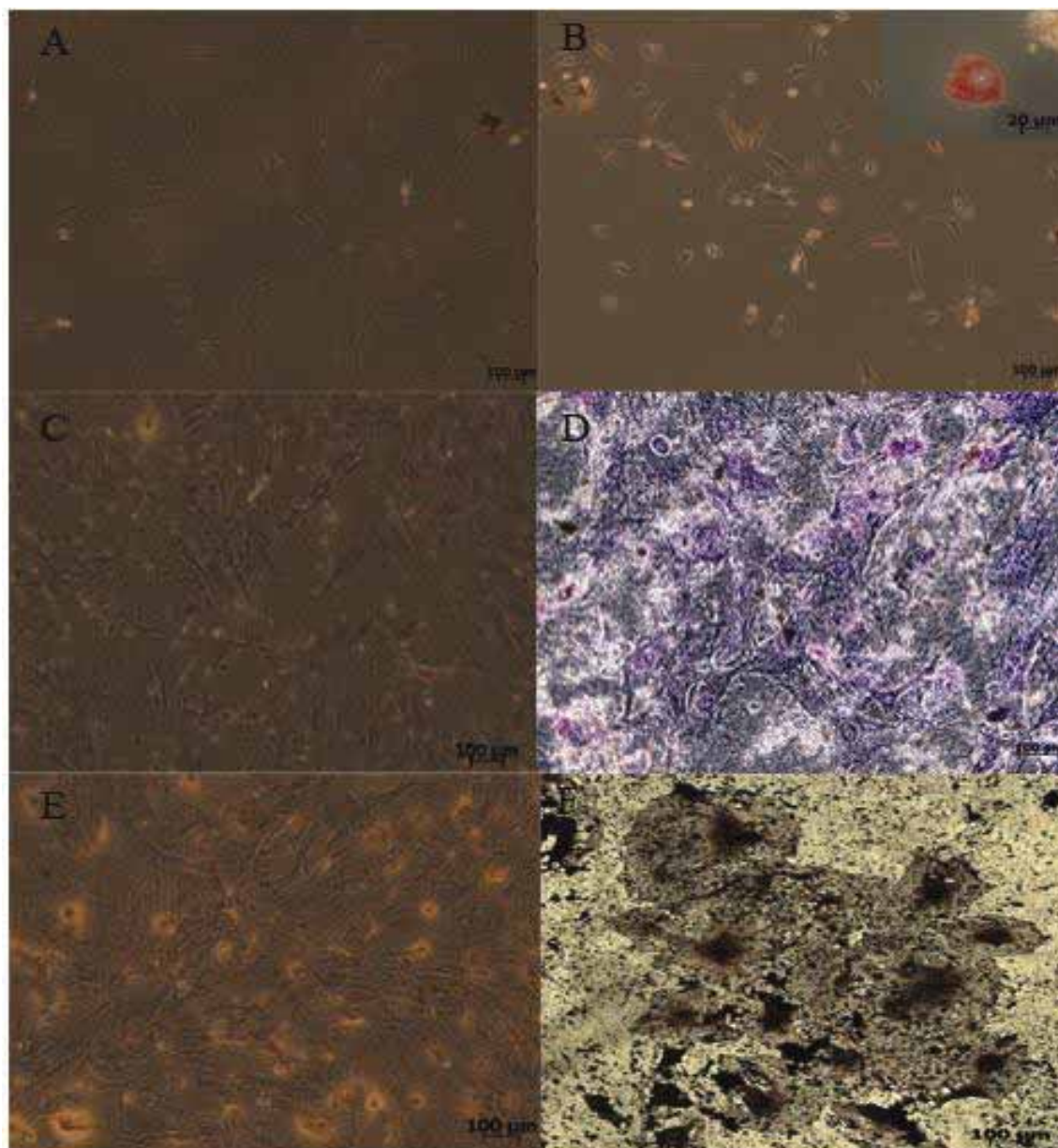


Figura 17: Avaliação do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais de medula óssea da linhagem *Lama2dy-2J/J*. A/C/E- coloração Oil Red, Azul de toluidina e Von Kossa, respectivamente em células cultivadas em α -MEM 10% SFB, B- células cultivadas em meios de indução adipogênico, D- células cultivadas em meios de indução condrogênico, F- células cultivadas em meios de indução osteogênico.

4.4 Padronização e análise da expressão dos genes MyoD e Miogenina por RT-qPCR

Foi analisado o perfil da curva de amplificação da RT-qPCR para cDNA de uma amostra de células da linhagem C₂C₁₂ diferenciada em músculo utilizada na padronização. Cada curva de amplificação representa o aumento da fluorescência do SYBR[®] Green (ΔR_n), no eixo y, versus o número de ciclos da PCR, no eixo x (Figura 18).

A especificidade dos primers foi analisada através da curva de dissociação dos produtos amplificados durante a reação. A curva de dissociação permite identificar o produto específico, pela presença de um único pico, e fazer a distinção entre o DNA alvo e a formação de dímeros de primers. A análise da curva de dissociação para os produtos resultantes da amplificação de segmento dos genes MyoD, Miogenina e GAPDH resultou em um único pico de dissociação, indicando que a amplificação de cada produto foi específica (Figura 19). As temperaturas de dissociação para os produtos da amplificação dos genes MyoD, Miogenina e GAPDH foram de 85.9°C, 87°C e 82.4°C, respectivamente.

Para a validação do método $\Delta\Delta C_t$, os gráficos construídos com os valores do ΔC_t no eixo y [$\Delta C_t = C_t \text{ alvo (MyoD ou Miogenina) - } C_t \text{ endógeno}$] pelos valores respectivos do log da diluição do cDNA, de cada ponto da curva-padrão, no eixo x, apresentaram valores de slope menores que 0.1 (Figura 20), mostrando que a eficiência de amplificação dos genes alvo (MyoD e Miogenina) e endógeno (GAPDH), numa mesma placa de reação, foram iguais e, assim, a expressão relativa desses genes pode ser determinada pelo Método do $\Delta\Delta C_t$. Dessa forma, a expressão relativa dos genes alvos é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ alvo normalizado - } \Delta C_t \text{ do calibrador}$.

Para a análise da expressão da MyoD e da Miogenina em cada grupo experimental foi construída uma placa contendo as amostras individuais de cDNA. Em uma mesma placa, foram analisados os genes alvo e o gene GAPDH. Nesse trabalho, fibroblastos da linhagem *Lama2dy-2J/J* foram escolhidas como calibrador, de forma que os resultados de expressão gênica apresentados em todos os grupos são relativos a esse tipo celular (*User Bulletin #2*, Applied Biosystems, 2001). O calibrador é definido como uma amostra utilizada como base de comparação de resultados, podendo representar um animal não tratado ou um estágio particular de desenvolvimento animal (*User Bulletin #2*, Applied Biosystems, 2001).

Os valores obtidos para a expressão relativa da MyoD e da Miogenina estão apresentados na Figura 21. Esses não foram comparados estatisticamente devido ao pequeno tamanho do n

dos grupos experimentais, de modo que a análise qualitativa foi suficiente para a interpretação dos nossos resultados.

Nas células tronco mesenquimais de medula óssea e de tecido adiposo indiferenciadas não houve expressão de MyoD e Miogenina, bem como nos fibroblastos de ambas as linhagens. Já nas MSC de medula óssea expostas ao meio miogênico, houve expressão de MyoD e Miogenina somente na linhagem *C57black*.

Nos mioblastos indiferenciados e diferenciados em músculo, bem como nas células tronco mesenquimais de tecido adiposo expostas ao meio miogênico, houve uma expressão basal dos fatores de miogênese em ambas as linhagens.

Nas células da linhagem C_2C_{12} selvagem indiferenciadas, a expressão de MyoD foi maior (3x) que a expressão de Miogenina (1x). Nas células dessa mesma linhagem diferenciadas em músculo houve 4,5x expressão de Miogenina e 3,8x expressão de MyoD, sendo que as células diferenciadas em músculo teve maior expressão de Miogenina se comparado com as células indiferenciadas. Já nas células da linhagem transfectadas com a proteína eGFP, os níveis de expressão de MyoD nas células indiferenciadas e diferenciadas em músculo foi semelhante (3x), sendo que não houve expressão de Miogenina nessas células.

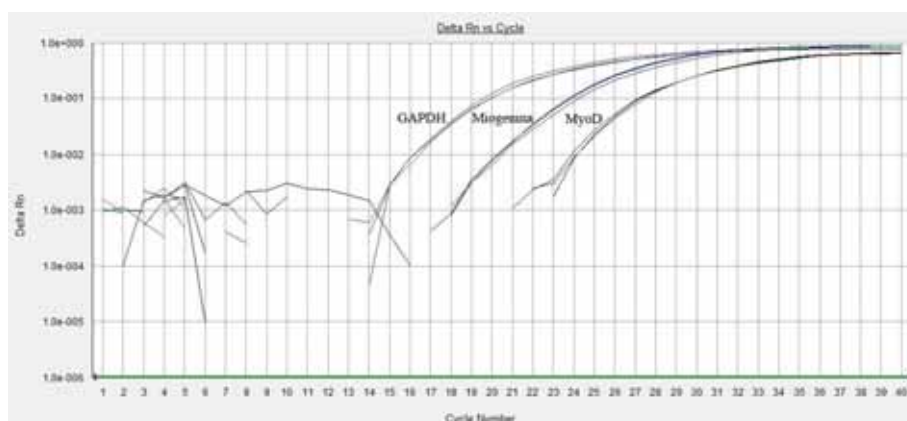


Figura 18: Curva de amplificação do produto referente aos genes Miogenina, MyoD e GAPDH na reação de RT-PCR em Tempo Real.

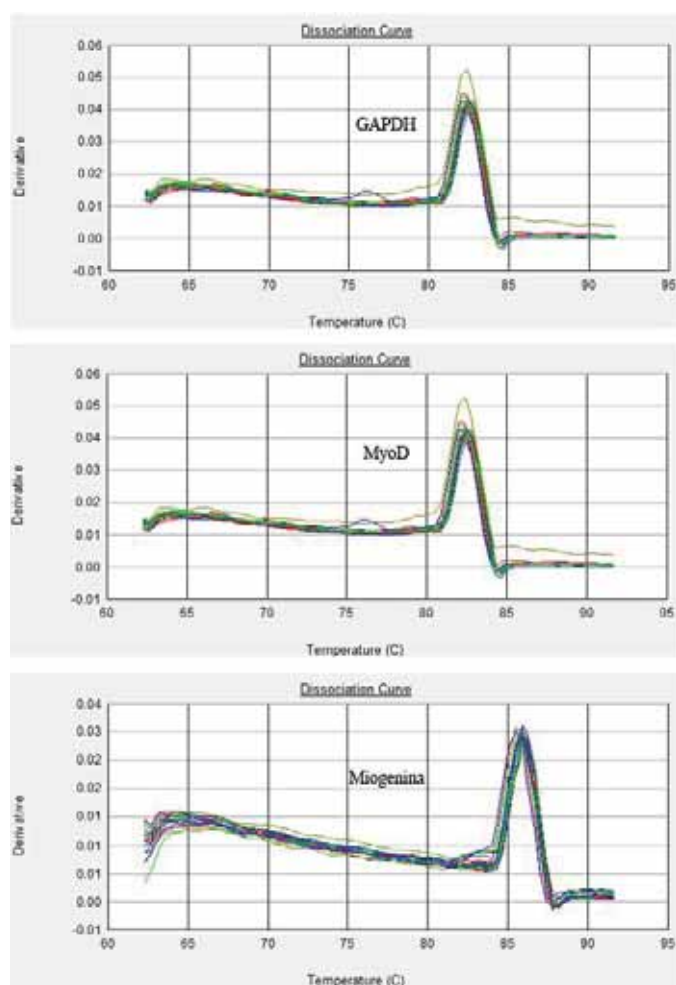


Figura 19: Curvas de dissociação do produto referente aos genes Miogenina, MyoD e GAPDH na reação de RT-PCR em Tempo Real

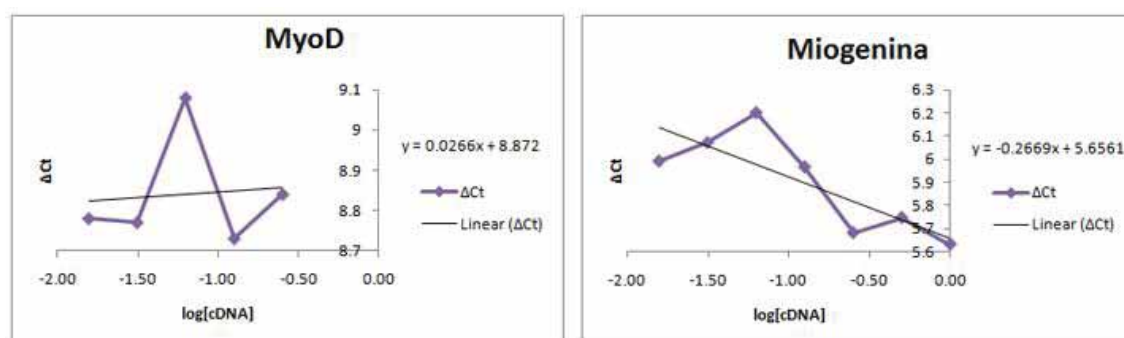


Figura 20: Gráfico obtido através da validação do Método $\Delta\Delta C_t$ para os genes MyoD e Miogenina. O valor de slope encontrado foi menor que 0,1.

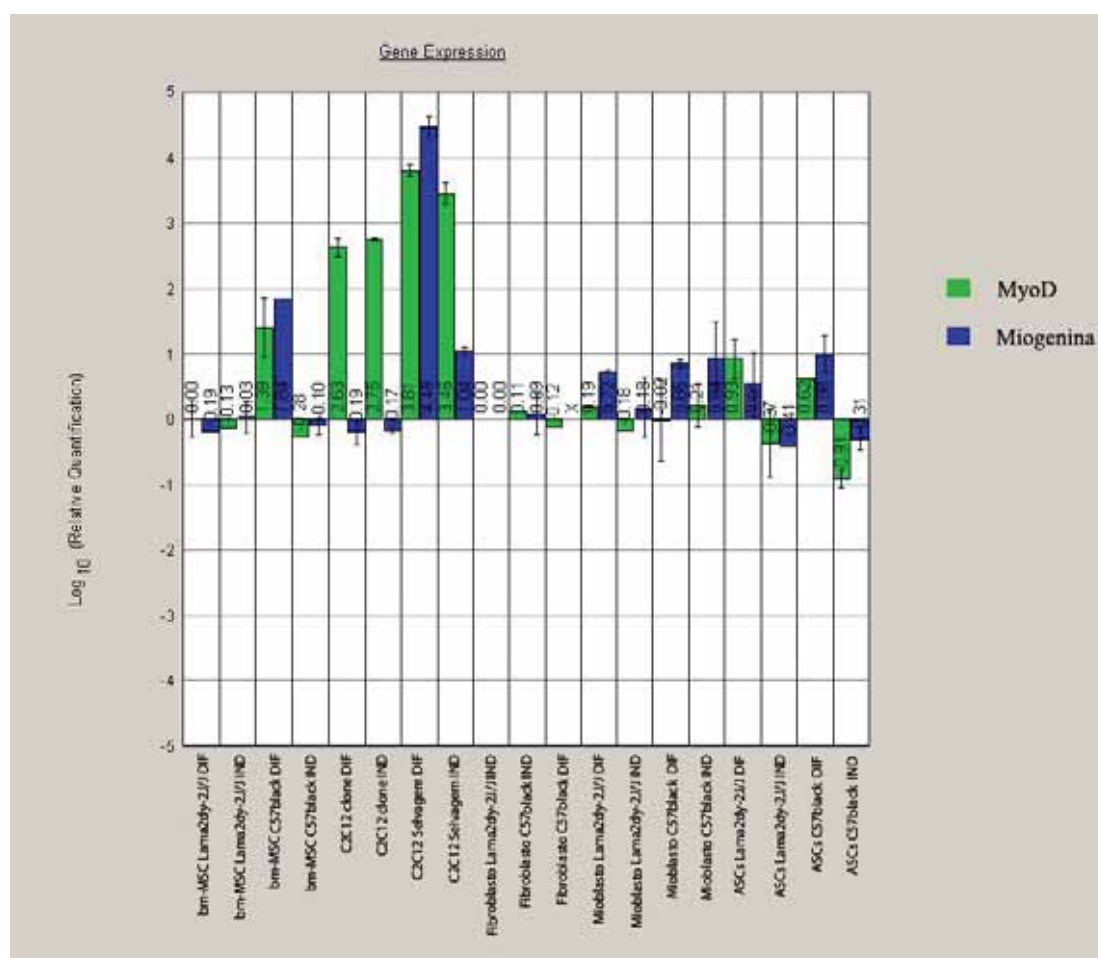


Figura 21: Expressão relativa, em unidades arbitrárias, dos genes MyoD e Miogenina expressos em vários tipos celulares indiferenciados (IND) e diferenciados (DIF) na linhagem muscular das linhagens de camundongos *Lama2dy-2J/J* e *C57black*. Bm-MSC: célula tronco mesenquimal derivada da medula óssea; ASCs: célula tronco mesenquimal derivada do tecido adiposo.

4.5 Estudo de proteínas por Western Blotting

Foi realizado a técnica de Western Blotting dos extratos de células de fibroblastos, mioblastos, MSCs de medula óssea e de tecido adiposo.

De acordo com a Figura 22, somente os mioblastos diferenciados e indiferenciados da linhagem C57black apresentaram uma banda fraca de distrofina (427 KDa). Provavelmente os mioblastos indiferenciados estavam em uma confluência alta, o que permitiu diferenciação por contato. Para os outros tipos celulares diferenciados não foi possível identificar quantidade de distrofina significativa. Já a proteína α -actinina (100KDa) foi encontrada em todas as amostras, bem como a proteína miosina (200KDa) mostrada abaixo do blot corada com Ponceau, um corante de proteína, que permite checar a transferência do gel para a membrana de nitrocelulose, também funcionando como um controle positivo da presença de proteínas musculares nos extratos.

Nas células derivadas do tecido adiposo foi encontrado uma pequena quantidade de distrofina (427KDa) nos tipos celulares expostos e não expostos ao meio miogênico. A proteína miosina (200KDa) esquelética também foi encontrada nesses extratos, também confirmada pela banda de miosina corada pelo Ponceau (Figura 23).

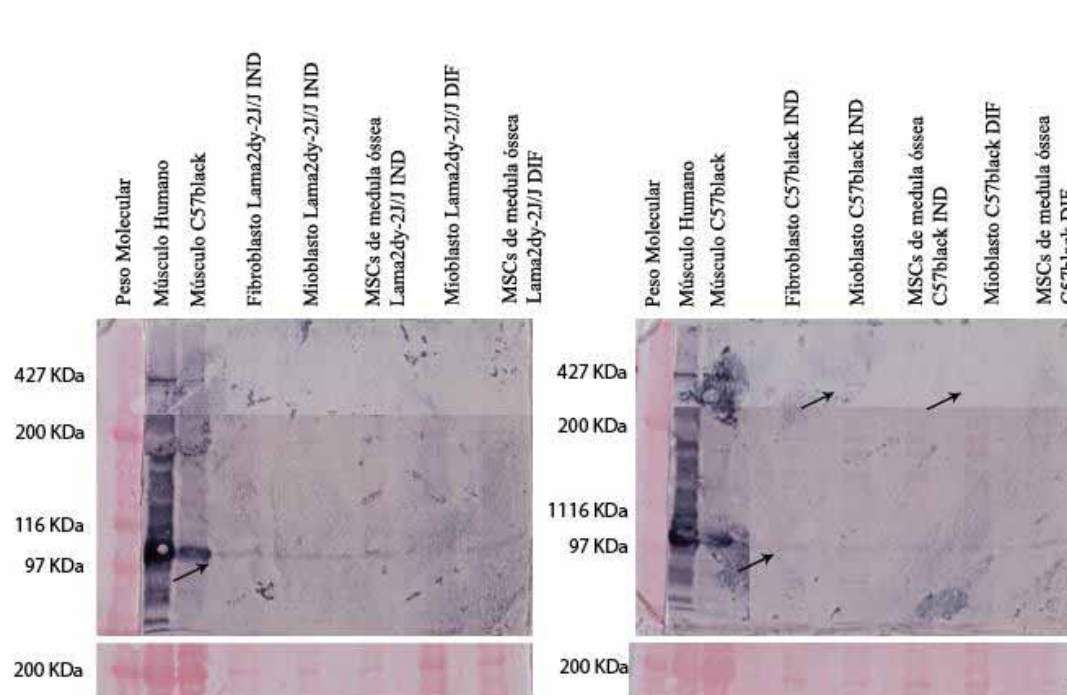


Figura 22: Western Blotting para a proteína distrofina (427KDa) e α -actinina (100KDa) das células indicadas na figura. IND: célula indiferenciada, DIF: célula diferenciada em músculo.

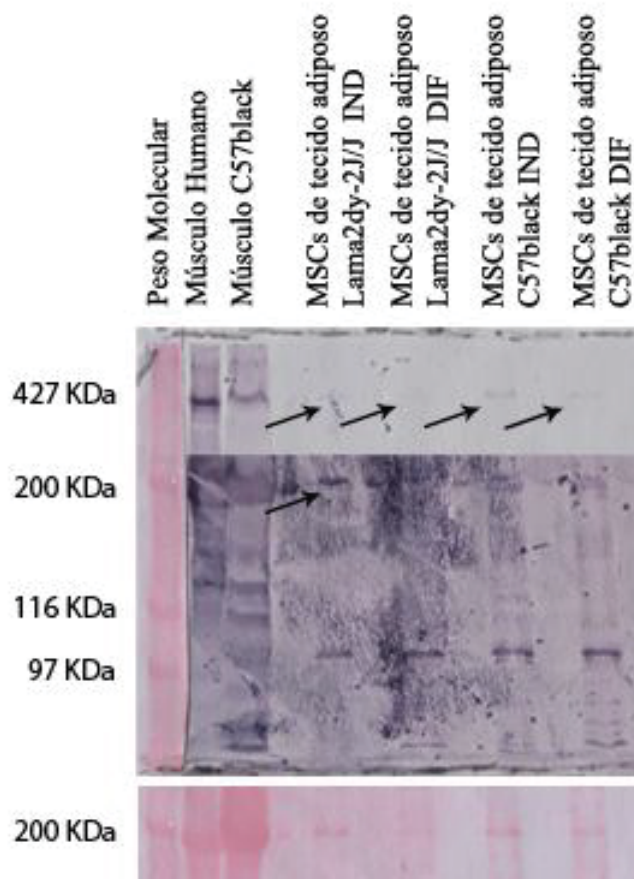


Figura 23: Western Blotting para a proteína distrofina (427KDa) e miosina esquelética (200KDa) das células indicadas na figura. IND: célula indiferenciada, DIF: célula diferenciada em músculo.

5. Discussão

Um dos objetivos desse estudo é investigar o potencial miogênico “in vitro” de células tronco mesenquimais isoladas de medula óssea e de tecido adiposo de diferentes linhagens de camundongos.

As células tronco mesenquimais foram caracterizadas analisando a expressão de 8 proteínas de membrana (CD29, CD105, CD90, CD44, CD13, CD34, CD31 e CD45) por citometria de fluxo. As MSCs de medula óssea expressaram os marcadores CD29, CD44 e CD13. Os marcadores CD105 e CD90 mostraram uma marcação positiva na linhagem *Lama2dy-2J/J*, mas negativa na linhagem *C57black*. Outros, como os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 e o marcador de adesão de células endoteliais CD31 estavam ausentes. A maioria desses resultados foi semelhante aos encontrados por outros grupos (Haynesworth *et al.*, 1992; Galmiche *et al.*, 1993; Pittenger *et al.*, 1999; Conget *et al.*, 1999; Sordi *et al.*, 2005; Le Blanc *et al.*, 2003).

As MSCs derivadas de medula óssea são capazes de diferenciar-se em várias linhagens celulares, incluindo osso, gordura, cartilagem e tecido conjuntivo (Darabi *et al.*, 2008). Ambas as linhagens celulares isoladas do estroma da medula óssea mantiveram o seu potencial de diferenciação em gordura, osso e cartilagem, sugerindo que a mutação no gene LAMA2 das MSCs de medula óssea isoladas do modelo animal *Lama2dy-2J/J* não altera o potencial de diferenciação dessas células em gordura, osso e cartilagem.

Na diferenciação miogênica utilizando o protocolo descrito por Zuk *et al.* (2002), as MSCs de medula óssea isoladas da linhagem *C57black* expressaram 2x os genes MyoD e Miogenina. Esses genes, também chamados de fatores musculares regulatórios (MRF) pertencem à família protéica *helix-loop-helix* (HLH) e têm um papel fundamental na miogênese e na regeneração: as células onde eles não são expressos não se diferenciam em

músculo (Seale & Rudnicki, 2000). Dessa forma, foi induzido a diferenciação miogênica nessas células, embora elas não tenham passado pela diferenciação terminal já que não foi observado a presença de distrofina. Já as MSCs de medula óssea da linhagem *Lama2dy-2J/J* não teve expressão de nenhum gene, bem como não foi observado em western blotting a presença de distrofina, sugerindo que a mutação LAMA2 presente nessa linhagem celular de alguma forma possa ter influenciado o potencial dessas células em se diferenciar em músculo. A proteína α -actinina é uma proteína ligadora de actina com várias funções em diferentes tipos celulares. As isoformas do músculo liso, cardíaco e esquelético estão localizadas no disco Z, onde elas ajudam a ancorar os filamentos de actina miofibrilar. Em contrapartida, nas células não musculares, as isoformas do citoesqueleto são encontradas ao longo dos microfilamentos e das junções do tipo aderente, onde ela está envolvida na ligação da actina com a membrana (Youssoufian *et al.*, 1990). Sendo assim, a presença da proteína α -actinina observada em todos os tipos celulares provavelmente foi oriunda do citoesqueleto, o que não pode ser considerado como um marcador muscular.

As MSCs derivadas do tecido adiposo de ambas as linhagens expressaram os marcadores CD29, CD105, CD90, CD44, CD13 e CD31 e, os marcadores CD34 e CD45 estavam ausentes. Na diferenciação miogênica desse tipo celular houve uma expressão basal dos fatores de miogênese em ambas as linhagens, ao contrário das células indiferenciadas, onde não houve expressão desses. Já no estudo de proteínas por western blotting observou-se a presença de distrofina nas células expostas e não expostas ao meio miogênico, bem como a presença da proteína miosina esquelética. O marcador CD31, também chamado de PECAM-1, é uma molécula de adesão de células endoteliais vasculares (Chamberlain *et al.*, 2007) e, de acordo com a literatura, as células tronco mesenquimais não expressam esta molécula, desse modo optamos por acompanhar a seleção dessas ao longo das passagens. Sendo assim, após analisar por citometria de fluxo a seleção dessas células ao longo das passagens em uma

outra linhagem, foi observado que não houve alteração do marcador CD31, que permaneceu negativo. Posteriormente, foi testado se a alta confluência de uma linhagem de células previamente negativas para CD31 alterava a expressão desse marcador, que também permaneceu ausente.

O isolamento de MSCs em camundongos é geralmente mais difícil do que em outras espécies (Eslaminejad *et al.*, 2006). Somente uma pequena quantidade de medula óssea e tecido adiposo está disponível por camundongo e a coleta desses tecidos pode algumas vezes ser problemática. Com frequência, há o crescimento de células não mesenquimais indesejáveis, que podem dominar a cultura (Ripoll & Bunnell, 2009). Portanto, o isolamento de MSCs derivadas do tecido adiposo está sujeito a contaminação com células endoteliais provenientes do endotélio de vasos sanguíneos presentes na gordura subcutânea, que podem apresentar uma maior vantagem em relação às MSCs. Assim, é de fundamental importância o cuidado com a extração do tecido adiposo, para que esses vasos não contaminem o material isolado.

O outro objetivo desse trabalho é avaliar o potencial de diferenciação miogênica de células da linhagem C₂C₁₂ expressando a proteína eGFP. Nas células da linhagem C₂C₁₂ selvagem diferenciadas em músculo, houve uma alta expressão de Miogenina se comparado com as células dessa mesma linhagem indiferenciada. Já nas células C₂C₁₂ expressando a proteína eGFP não houve em momento algum expressão de Miogenina. Esse fator de transcrição é 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, Brown *et al.*, 2002). Assim, as células C₂C₁₂ selvagem foram

diferenciadas rapidamente em músculo, formando miotubos como evidenciado pela figura 3. Por outro lado, as células C₂C₁₂ expressando a proteína eGFP não apresentaram evidências de fusão como mostrado pela figura 4, sugerindo que essas células têm uma menor capacidade de diferenciação.

A proteína fluorescente verde (eGFP) é um excelente repórter uma vez que pode ser visualizada em células vivas em cultura e têm sido útil no monitoramento da expressão gênica, interações proteína-proteína, e tráfego e localização *in vivo* (Kisseberth *et al.*, 1999; Grebenok *et al.*, 1997; Kohler *et al.*, 1997; Leffel *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 2001). Porém a proteína eGFP é acreditada como indutora da morte celular (Taghizadeh *et al.*, 2008). A excitação intensa da proteína *in vitro* durante longos períodos de tempo pode gerar radicais livres tóxicos e a presença da proteína eGFP também pode levar ao aumento da metilação do DNA (Liu *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2001). A proteína eGFP também é expressa no citosol da célula, o que pode levar à efeitos tóxicos se presente em altas concentrações (Ikawa *et al.*, 1998). Tendo em vista todas essas alterações, a proteína eGFP pode de alguma forma dificultar a diferenciação de células C₂C₁₂ expressando essa proteína, embora mais estudos sejam necessários para a comprovação dessa hipótese.

6. Conclusões

MSCs derivadas de medula óssea

- As MSCs de camundongos *C57black* e *Lama2dy-2J/J* foram capazes de diferenciar-se em osso, gordura, e cartilagem, demonstrando a sua pluripotência.
- Houve diferenças na indução da diferenciação muscular, onde a linhagem *C57black* expressou os genes MyoD e Miogenina, enquanto a linhagem *Lama2dy-2J/J* não expressou, sugerindo que a mutação LAMA2 poderia de alguma forma ter interferido em sua capacidade de diferenciar em músculo.
- Esta indução à diferenciação muscular não foi completa, uma vez que não foi identificada a proteína distrofina.

MSCs derivadas de tecido adiposo

- Ambas linhagens expressaram o marcador CD31, que é um marcador endotelial, sugerindo a contaminação destas linhagens com células de outras origens.
- Na diferenciação miogênica desse tipo celular houve uma expressão basal dos fatores de miogênese em ambas as linhagens.
- Identificou-se expressão de distrofina e miosina, sugerindo ser esta oriunda do citoesqueleto, ou das células contaminantes, uma vez que a diferenciação muscular não foi induzida.

Diferenciação da linhagem C_2C_{12} selvagem e eGFP transformada

- Nas células da linhagem C_2C_{12} selvagem diferenciadas em músculo, houve uma alta expressão de Miogenina se comparado com as células dessa mesma linhagem indiferenciada. Já nas células C_2C_{12} expressando a proteína eGFP não houve em momento algum expressão de Miogenina.
- As células C_2C_{12} selvagem foram diferenciadas rapidamente em músculo, formando miotubos. Por outro lado, as células C_2C_{12} expressando a proteína eGFP não apresentaram evidências de fusão; sugerindo que essas células têm uma menor capacidade de diferenciação.
- a proteína eGFP pode de alguma forma dificultar a diferenciação de células C_2C_{12} expressando essa proteína, embora mais estudos sejam necessários para a comprovação dessa hipótese.

7. Referências

BADDOO, M.; HILL, K.; WILKINSON, R. ET AL. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*; 89:1235–1249, 2003.

BI, Y.; EHIRCHIOU, D.; KILTS, T.M.; INKSON, C.A.; EMBREE, M.C.; SONOYAMA, W.; LI, L.; LEET, A.I.; SEO, B.M.; ZHANG, L.; SHI, S.; YOUNG, M.F. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 13:1219–1227, 2007.

BITTNER, R. E.; ANDERSON, V. B.; BURKHARD, E.; BASHIR, R.; VAFIADAKI, E.; IVANOVA, S.; RAFFELSBERG, T.; MAERK, I.; HOGER, H.; JUNG, M.; KARBASIYAN, M.; STORCH, M.; LASSMANN, H.; MASS, J.A.; DAVISON, K.; HARRISON, R.; BUSHBY, K. M. D.; REIS, A. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nature Genetics*, v.23, p.141-142, 1999.

BRAND-SABERI, B. E CHRIST, B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res* 296(1): 199-212, 1999.

BRAUN, T. E ARNOLD, H. H. Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *Embo J* 15(2): 310-18, 1996.

BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; *ET AL.* The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202(1): 59-68, 2003.

BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A. L.; MOORE, K. J. X-Chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1189-1192, 1984.

CAMPION, D. R. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 87: 225-51, 1984.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells*, doi: 10.1634/stem cells.2007-0197, 2007.

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

CHEN, J. C. E GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 101, 2003.

CHOI, J.; COSTA, M. L.; *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* 87(20): 7988-92, 1990.

CONGET, P.A.; MINGUELL, J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*; 181:67–73, 1999.

DARABI, R.; SANTOS, F. N. C.; PERLINGEIRO, R. C. R. The therapeutic potential of embryonic and adult stem cells for skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Rev*, 4: 217-225, 2008.

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, p.809-823, 1993.

ESLAMINEJAD, M. B.; NIKMAHZAR, A.; TAGHIYAR, L.; NADRI, S.; MASSUMI, M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 48(6): 361-370, 2006.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; *ET. AL.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279, 1528-1530, 1998.

FISCHBACH, G. D. & FISCHBACH, R. L. Stem cells: science, policy and ethics. *J Clin Invest*, 114: 1364-1370, 2004.

GALMICHE, M.C.; KOTELIANSKY, V.E.; BRIERE, J. *ET AL.* Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*; 82:66 –76, 1993.

GARCIA, S.; GARCÍA, C. *Embriologia*. Porto Alegre, Artmed, 2001.

GREBENOK, R. J.; PIERSON, E.; LAMBERT, G. M.; GONG, F. C.; AFONSO, C. L.; HALDEMAN-CAHILL, R.; CARRINGTON, J. C.; GALBRAITH, D. W. Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant J.* 11:573–586, 1997.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13625–13630, 2000.

GUO, L. T.; ZHANG, X. U.; KUANG, W.; XU, H.; LIU, L. A.; VILQUIN, T. J.; MYAGOE-SUZUKI, Y.; TAKEDA, S.; RUEGG, M. A.; WEWER, U. M.; ENGVALL, E. Laminin alpha 2 deficiency and muscular dystrophy: genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscul. Disord.*, v.13, p.207-215, 2002.

HACK, A. A.; GROH, M.E. & MCNALLY, E.M. Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microscopy Research and Technique*, 48: 167-180, 2000.

HAWKE, T. J. E GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." *J Appl Physiol* 91(2): 534-51, 2001.

HAYNESWORTH, S.E.; BABER, M.A.; CAPLAN, A.I. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*; 13:69–80, 1992.

HEWITT, J. E.; GREWAL, P. K. Glycosylation Defects in inherited muscle disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60:001-08, 2003.

HOFFMAN, E. P.; BROWN, R. H. J. R.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51,919-928, 1987.

HONG, K.; SHERLEY, J.; LAUFFENBURGER, D.A. Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. *Biomol Eng.* 18:185–192, 2001.

IKAWA, M.; YAMADA, S.; NAKANISHI, T.; OKABE, M. 'Green mice' and their potential usage in biological research. *FEBS Lett.* 430:83–87, 1998.

JAVAZON, E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Hematol*; 32:414–425, 2004.

KISSEBERTH, W. C.; BRETTINGEN, N. T.; LOHSE, J. K.; SANDGREN, E. P. Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev Biol.* 214:128–138, 1999.

KOHLER, R. H.; ZIPFEL, W. R.; WEBB, W. W.; HANSON, M. R. The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo. *Plant J.* 11:613–621, 1997.

LE BLANC, K.; TAMMIK, C.; ROSENDAHL, K. ET AL. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*; 31:890–896, 2003.

LEFFEL, S.M.; MABON, S. A.; STEWART, C. N. Jr Applications of green fluorescent protein in plants. *Biotechniques.* 23:912–918, 1997.

LINDON, C.; MONTARRAS, D.; ET AL. Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *J Cell Biol* 140(1): 111-8, 1998.

LIU, H. S.; JAN, M. S.; CHOU, C. K.; CHEN, P. H.; KE, N. J. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun.* 260:712–717, 1999.

MEDHURST, A. D.; HARRISON, D. C.; READ, S. J.; CAMPBELL, C. A.; ROBBINS, M. J.; PANGALOS, M. N. The use of TaqMan RT-PCR assays for

semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J Neurosci Methods* 98: 9-20, 2000.

MUNTONI, F.; BROWN, S.; *ET AL.* Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 12(5): 438-46, 2002.

MUNTONI, F.; VOIT, T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord.*, v.10, p.635-649, 2004.

NAKAHARA, H.; BRUDER, S.P.; HAYNESWORTH, S.E.; HOLECEK, J.J.; BABER, M.A.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11:181-188, 1990.

PEISTER, A.; MELLAD, J.A.; LARSON, B.L. *ET AL.* Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*; 103:1662-1668, 2004.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. *ET AL.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284:143-147, 1999.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 36:S8-S12, 2005.

RANDO, T. A.; BLAU, H. M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol.* Jun;125(6):1275-87, 1994.

RIPOLL, C. B. & BUNNELL B. A. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from eGFP transgenic and non-transgenic mice. *BMC Cell Biology* 10:3, 2009.

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 21:105-110, 2003.

RUDNICKI, M. A.; BRAUN, T.; *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* 71(3): 383-90, 1992.

RUDNICKI, M. A.; SCHNEGELSBURG, P. N.; *ET AL.* MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75(7): 1351-9, 1993.

SCHAEFER, B. C.; SCHAEFER, M. L.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P.; KEDL, R. M. Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/dendritic cell interactions in vivo. *Cell Immunol.* 214:110-122, 2001.

SEALE, P. E RUDNICKI, M. A. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218(2): 115-24, 2000.

SEO, B.M.; MIURA, M.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P.M.; BATOULI, S.; BRAHIM, J.; YOUNG, M.; ROBEY, P.G.; WANG, C.Y.; SHI, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149–155, 2004.

SORDI, V.; MALOSIO, M.L.; MARCHESI, F. ET AL. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*; 106:419–427, 2005.

STRAUB, V.; RAFAEL, J. A.; CHAMBERLAIN, J. S.; CAMPBELL, K. P. Animal Models for Muscular Dystrophy Show Different Patterns of Sarcolemmal Disruption. *J. Cell. Biol.*, v.139, p.3758-385, 1997.

STRAUB, V.; DUCLOS, F.; VENZKE, D. P.; LEE, J. C.; CUTSHALL, S.; LEVEILLE, C. J.; CAMPBELL, K. P. Molecular pathogenesis of muscle degeneration in the delta-sarcoglycan-deficient hamster. *Am. J. Pathol.* 153, 1623-1630, 1998.

SUMADA, Y.; BERNIER, S. M.; UTANI, A.; YAMADA, Y.; CAMPBELL, K. P. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in *dy^{2J}* mice. *Hum. Mol. Genet.*, v.4, p.1055-1061, 1995.

TAGHIZADEH, R. R.; SHERLEY, J. L. CFP and YFP, but not GFP, provide stable fluorescent marking of rat hepatic adult stem cells. *J Biomed Biotechnol.*, 2008.

TOMÉ, F. M.; EVANGELISTA, T.; LECLERC, A.; SUNADA, Y.; MANOLE, E.; ESTOURNET, B.; BAROIS, A.; CAMPBELL, K. P.; FARDEAU, M. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C. R. Acad. Sci. III.* 317,351-357, 1994.

TURK, R.; STERRENBURG, E.; VAN DE WEES, C. G. C.; MEIJER, E. J.; MENESES, R. X.; GROH, S.; CAMPBELL, K. P.; NOGUCHI, S.; VAN OMMEN, G. J. B.; DEN DUNNEN, J. T.; HOEN, P. A. C'T. Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies. *FASEB*, 2005.

VAINZOF, M. & ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res.*, 36 (5): 543-55, 2003.

VAINZOF, M. AND ZATZ M. Muscular Dystrophies and Protein Mutations, in: Uversky VN and Fink AL. Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases. Part B: Molecular Mechanisms of Conformational Diseases. Serie Protein Reviews, Ed. Zouhair Atassi, Volume 6, Springer Sciences and Business Media LLC, USA. Pp 391-403, 2007

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C. G.; MARTINS, P. C. M.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal Models for genetic neuromuscular diseases. *Journal of molecular neuroscience*, 34(3):241-8, 2008.

VOET, D. V. J.; PRATT, C. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre, Artes Médicas, 2000.

WANG, Y.; SCHNEGELSBERG, P. N.; *ET AL*. Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature* 379(6568): 823-5, 1996.

WEINTRAUB, H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75(7): 1241-4, 1993.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-Time for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 1-11, 2005.

YABLONKA-REUVENI, Z.; RUDNICKI, M. A.; *ET AL*. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol* 210(2): 440-55, 1999.

YABLONKA-REUVENI, Z.; DAY, K.; *ET AL*. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J Anim Sci* 86(14 Suppl): E207-16, 2008.

YOUSSOUFIAN, H.; MCAFEE, M.; KWIATKOWSKI, D. J. Cloning and chromosomal localization of the human cytoskeletal alpha-actinin gene reveals linkage to the beta-spectrin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 62-72, 1990.

ZANNETTINO, A.C.; PATON, S.; ARTHUR, A.; KHOR, F.; ITESCU, S.; GIMBLE, J.M.; GRONTHOS, S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 214:413-421, 2008.

ZATZ, M. *Genômica das Doenças Neuromusculares e Neurodegenerativas*. Luis Mir, *Genômica. Ed. Atheneu, São Paulo*, 2004.

ZUBRZYCKA-GAARN, E. E., BULMAN, D. E., *ET AL*. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333(6172): 466-9, 1988.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, V. 13, 4279-4295, 2002.