

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 05/03/2019.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O
PERFIL TRANSCRICIONAL DE RNAm EM MIOBLASTOS
C2C12**

JUAREZ HENRIQUE FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, como requisito para a defesa de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

**BOTUCATU – SP
2018**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O PERFIL
TRANSCRICIONAL DE RNAm EM MIOBLASTOS C2C12

ALUNO: JUAREZ HENRIQUE FERREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON FRANCISCO CARVALHO

CO-ORIENTADOR: DR. IVAN JOSÉ VECHETTI JÚNIOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, como requisito para a defesa de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

**BOTUCATU – SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ferreira, Juarez Henrique.

Efeito do laser de baixa intensidade sobre o perfil transcricional de RNAm em mioblastos C2C12 / Juarez Henrique Ferreira. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Robson Francisco Carvalho
Coorientador: Ivan José Vechetti-Júnior
Capes: 20600003

1. Ciclo celular. 2. Desenvolvimento muscular. 3. Músculo esquelético. 4. Terapia com luz de baixa intensidade. 5. Transcriptoma.

Palavras-chave: Ciclo celular; Desenvolvimento muscular; Músculo esquelético; Terapia com laser; Transcriptoma.

Dedicatória

“Dedico este trabalho a minha mãe Maria Consolação Ferreira e ao meu pai Joaquim Juarez Ferreira, por terem sempre me incentivado desde a infância, a buscar o caminho do conhecimento. Este título de doutor é para vocês!”

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado meu caminho e me dado sabedoria para conquistar mais esta etapa da vida.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Robson Francisco Carvalho por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho sob a sua orientação e por sempre ter sido solícito e dar apoio nesta jornada. Professor obrigado pela grande contribuição na minha formação acadêmica e também pelas palavras amigas ao longo desses anos. Minha eterna gratidão.

Agradeço ao meu co-orientador Doutor Ivan José Vechetti-Júnior por toda amizade e conhecimento compartilhado. Ivan, você muito além de um co-orientador e amigo, você se tornou um irmão e uma inspiração.

Agradeço a professora Dra. Maeli Dal Pai pela contribuição constante durante a execução deste projeto e por todo apoio prestado ao longo desses anos.

Agradeço a toda a equipe LBME: Ana Omoto, Bruna Zanella, Bruno Duran, Bruno Fantinatti, Carlos Augusto, Carlos Freitas, Edson Marreco, Geysson Fernandez, Grasieli Oliveira, Ivan Vechetti, Jéssica Valente, Leonardo Nazário, Paula Freire, Rafaela Nunes, Rodrigo Souza, Rondinele Salomão, Sarah Cury e Tassiana de Paula, que sempre contribuíram de uma forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, compartilhando seu conhecimento e amizade.

Agradeço de maneira especial a algumas pessoas que ao longo desta jornada tiveram um papel fundamental na realização deste trabalho e que sem elas não teria sido possível a sua realização. Obrigado Leonardo Nazário de Moraes, Geysson Javier Fernandez Garcia, Tassiana Gutierrez de Paula, Ana Carolina Mieko Omoto e Carlos Augusto Alves pela contribuição e amizade.

Agradeço a minha esposa Talita Mariana Morata Raposo Ferreira pelo seu apoio incondicional, por sempre ter me dado forças para seguir em frente, mesmo diante das adversidades que surgiam, pela paciência e compreensão dos meus momentos de ausência.

Agradeço ao meu cachorro Jack (em memória) por sempre ter me recebido com amor e carinho quando voltava para casa após o trabalho no laboratório.

Agradeço a toda minha família pelo apoio e por sempre terem acreditado que essa conquista seria possível.

Agradeço as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP por financiarem este trabalho e acreditar no nosso potencial.

RESUMO

A irradiação pelo laser de baixa intensidade (LBI) tem sido utilizada como um método não-invasivo para promover ou acelerar a capacidade de regeneração muscular. No entanto, os mecanismos moleculares regulatórios pelos quais o LBI exerce esses efeitos, permanecem em grande parte desconhecidos. Nosso objetivo foi realizar uma análise de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) em mioblastos C2C12 após LBI. Foram realizadas as taxas de viabilidade, migração, proliferação e os dados de RNA-Seq dos mioblastos C2C12, identificando 514 genes diferencialmente expressos após LBI. Em seguida, uma análise de ontologia genética e das vias dos genes diferencialmente expressos revelaram transcritos relacionadas ao ciclo celular, biogênese ribossômica, resposta ao estresse, migração celular, estrutura morfológica e proliferação de células musculares. Após, cruzamos nossos dados de RNA-Seq com dados de transcriptomas disponíveis em base de dados públicas, com dados de diferenciação miogênica que mostraram um total de 42 transcritos sobrepostos (mioblastos *vs* miotubos). Este conjunto de transcritos compartilhados mostrou que os mioblastos irradiados pelo LBI, possuem um perfil transcricional semelhante ao de miotubo, agrupando-se distante do perfil transcricional dos mioblastos. Concluindo, revelamos pela primeira vez que LBI, induz a uma expressão de um grande conjunto de RNAm, que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular que podem controlar a proliferação e diferenciação de mioblastos em miotubos. Importaneamente, esse conjunto de RNAm, revelou um perfil transcricional semelhante ao dos miotubos, fornecendo novos conhecimentos para a compreensão das alterações moleculares específicas subjacentes aos efeitos da irradiação por LBI em células do músculo esquelético.

Palavras-chave: transcriptoma, terapia com laser, desenvolvimento muscular, músculo esquelético, crescimento muscular, ciclo celular.

ABSTRACT

Low-level laser irradiation (LLLT) has been used as a non-invasive method to promote or accelerate muscular regeneration capability. However, the regulatory molecular mechanisms by which LLLT exerts these effects remain largely unknown. Our goal was to perform a RNA-sequencing (RNA-Seq) analysis in C2C12 myoblasts after LLLT. C2C12 myoblasts viability, migration, proliferation and RNA-Seq were performed, identifying 514 differentially expressed genes after LLLT. Next, gene ontology and pathway analysis of the differentially expressed genes revealed transcripts among categories related to cell cycle, ribosome biogenesis, response to stress, cell migration, morphological structure and muscle cell proliferation. After, we intersected our RNA-Seq data with transcriptomes publicly available myogenic differentiation data that showed a total of 42 overlapping transcripts (myoblasts vs myotube). This set of shared transcripts showed that the LLLT-myoblasts have a myotube-like profile, clustering away from the myoblast profile. In conclusion, we revealed for the first time that LLLT induces the expression a large set of mRNAs encoding for cell cycle regulatory proteins that may control myoblasts proliferation and differentiation into myotubes. Importantly, these set of mRNA revealed a myotube-like transcriptional profile and provided new insights to the understanding of the specific molecular changes underlying the effects of LLLT irradiation on skeletal muscle cells.

Key-words: Transcriptome, Laser treatment, Muscular development, Skeletal muscle, Muscle growth, Cell cycle.

Lista de Abreviações

AsGa – Arseneto de Gálio

AsGaAl – Arseneto de Gálio e Alumínio

ATP – Adenosina trifosfato

BrdU - 5-Bromo-2'-deoxyuridine

C2C12 – Linhagem celular imortalizada de mioblastos de camundongo

CT – Grupo controle

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEG – Differentially expressed genes

DMEM – Dubelcco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

GO – Gene Ontology

HCl – Ácido clorídrico

HeNe – Hélio/Neônio

IL-1 β – Interleucina 1 beta

INF- γ – Interferon gama

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Laser – Light amplification by stimulated emission radiation

LBI – Laser de baixa intensidade

Linc-YY1 - Long intervening noncoding RNA

LLLT – Low level laser irradiation

miRNA – Micro-RNAs

MRFs – Myogenic regulatory factors

mRNA – RNA mensageiro

MTT - brometo 3-(4,5-dimetilazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol

MyHC – Cadeia Pesada de Miosina (*do inglês: myosin heavy chain*)

MyoD – Myogenic differentiation

NF- κ B – Fator Nuclear-Kappa B (*do inglês: nuclear factor kappa b*)

NGS – Next generation sequencing

PBS – Tampão fosfato-salina

RNA-Seq – Sequenciamento de RNA

RPM – Rotações por minuto

RT – Transcrição Reversa

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa

Setdb1 – Histona

SFB – Soro fetal bovino

TEAD – Fator transcricional

TGF- β – Fator de Crescimento Transformante Beta (*do inglês: Transforming growth factor beta*)

TGF- β 1 – Transforming growth factor beta 1

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α (*do inglês: Tumor necrosis factor alpha*)

TWEAK - TNF-like weak inducer of apoptosis

Lista de Figuras

Figura 1. Processo de regeneração Muscular. Fibra muscular normal com célula satélite quiescente e mionúcleo (A). Após um mio-trauma (B), as células satélites quiescentes são ativadas, proliferam-se (C) e se diferenciam em mioblastos (E). No mio-trauma adaptativo do exercício físico, os mioblastos migram para a região danificada e fundem-se à fibra muscular pré-existente para reparar o local da microlesão e/ou adicionar núcleos para ampliar a taxa síntese protéica (hipertrofia) (F). Porém, em situações de mio-traumas severos que ocorra necrose das fibras (ação de toxinas e distrofia), os mioblastos poderão se alinhar e fundir-se entre si, para formar uma nova miofibra (G), e reparar o dano da fibra muscular (H). Durante o processo de regeneração, alguns mioblastos retornam ao estado quiescente e restabelecem a população de células satélites (D) (Adaptado de Chargé and Rudnick 2004).

Figura 2. Representação esquemática das células satélites no crescimento muscular (adaptado de Zammit, Partridge, and Yablonka-Reuveni 2006).

Figura 3. Esquema de grade utilizado para a irradiação do laser de baixa intensidade nas placas de 6-poços.

Figura 4. Ensaio de migração/proliferação - Wound Healing.

SUMÁRIO

Resumo	v
Abstract	vi
Lista de Abreviações	vii
Lista de Figuras	ix
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Aspectos gerais da composição e emissão dos lasers.....	11
1.2 Uso da irradiação laser em tecidos biológicos	12
1.3 Células C2C12.....	13
1.4 Perfil genômico global de mRNAs de células C2C12	15
2. OBJETIVO GERAL	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Cultura celular	19
3.2 Irradiação pelo LBI.....	19
3.3 Migração celular.....	20
3.4 Proliferação celular.....	20
3.5 Viabilidade celular.....	21
3.6 Extração do RNA total	21
3.7 Sequenciamento do RNA	22
3.8 Análise de enriquecimento funcional de vias moleculares.....	22
3.9 Análises estatísticas	22
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
5. REFERÊNCIAS	25
6. MANUSCRITO	31
Anexo I - Table Supplementary 1 Genes differentially expressed after low-level laser irradiation	56
Anexo II - Table S2 - Enrichment analysis of differentially expressed genes in C2C12 myoblasts after LLLT.....	75

References

1. Vatansever F, Rodrigues NC, Assis LL, et al (2012) Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. *Photonics Lasers Med* 1:287–297 . doi: 10.1515/plm-2012-0035
2. Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, et al (2013) Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci* 28:947–955 . doi: 10.1007/s10103-012-1183-3
3. de Freitas CEA, Bertaglia RS, Vechetti Júnior IJ, et al (2015) High Final Energy of Low-Level Gallium Arsenide Laser Therapy Enhances Skeletal Muscle Recovery without a Positive Effect on Collagen Remodeling. *Photochem Photobiol* 91:n/a-n/a . doi: 10.1111/php.12446
4. Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF (2001) Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. *Lasers Med Sci* 16:44–51
5. Weiss N, Oron U (1992) Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl)* 186:497–503
6. Buckingham M (2006) Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 16:525–32 . doi: 10.1016/j.gde.2006.08.008
7. Wang YX, Rudnicki MA (2011) Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:127–133 . doi: 10.1038/nrm3265
8. Teuschl A, Balmayor ER, Redl H, et al (2015) Phototherapy With LED Light Modulates Healing Processes in an In Vitro Scratch-Wound Model Using 3 Different Cell Types. *Dermatologic Surg* 41:261–268 . doi: 10.1097/DSS.0000000000000266
9. Shefer G, Partridge TA, Heslop L, et al (2002) Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 115:1461–9
10. Monici M, Cialdai F, Ranaldi F, et al (2013) Effect of IR laser on myoblasts: a proteomic study. *Mol Biosyst* 9:1147–61 . doi: 10.1039/c2mb25398d
11. Shefer G, Ben-Dov N, Halevy O, Oron U (2008) Primary myogenic cells see the light: improved survival of transplanted myogenic cells following low energy laser irradiation. *Lasers Surg Med* 40:38–45 . doi: 10.1002/lsm.20588
12. Ben-Dov N, Shefer G, Irinitchev A, et al (1999) Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1448:372–380 . doi: 10.1016/S0167-4889(98)00147-5
13. Wu Y, Wang J, Gong D, et al (2012) Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Lasers Med Sci* 27:509–519 . doi: 10.1007/s10103-011-0995-x
14. Zhang Y, Song S, Fong C-C, et al (2003) cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol* 120:849–857 . doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12133.x
15. Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7:562–78 . doi: 10.1038/nprot.2012.016
16. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498–504 . doi: 10.1101/gr.1239303

17. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al (2009) ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25:1091–3 . doi: 10.1093/bioinformatics/btp101
18. Aranda B, Blankenburg H, Kerrien S, et al (2011) PSICQUIC and PSIScore: accessing and scoring molecular interactions. *Nat Methods* 8:528–9 . doi: 10.1038/nmeth.1637
19. Bindea G, Galon J, Mlecnik B (2013) CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29:661–663 . doi: 10.1093/bioinformatics/btt019
20. Chen EY, Tan CM, Kou Y, et al (2013) Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14:128 . doi: 10.1186/1471-2105-14-128
21. Kuleshov M V, Jones MR, Rouillard AD, et al (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44:W90–7 . doi: 10.1093/nar/gkw377
22. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al (2013) NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 41:D991–5 . doi: 10.1093/nar/gks1193
23. Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30:207–10
24. Tomczak KK, Marinescu VD, Ramoni MF, et al (2003) Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *FASEB J* 17: . doi: 10.1096/fj.03-0568fje
25. Yan Z, Choi S, Liu X, et al (2003) Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem* 278:8826–36 . doi: 10.1074/jbc.M209879200
26. Silva LMG, Da Silva CAA, Da Silva A, et al (2016) Photobiomodulation protects and promotes differentiation of C2C12 myoblast cells exposed to Snake venom. *PLoS One* 11:1–16 . doi: 10.1371/journal.pone.0152890
27. Albin S, Coutinho Toto P, Dall’Agnese A, et al (2015) Brahma is required for cell cycle arrest and late muscle gene expression during skeletal myogenesis. *EMBO Rep* 16:1037–50 . doi: 10.15252/embr.201540159
28. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, et al (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19:5785–99
29. Panda AC, Abdelmohsen K, Martindale JL, et al (2016) Novel RNA-binding activity of MYF5 enhances *Ccnd1/Cyclin D1* mRNA translation during myogenesis. *Nucleic Acids Res* gkw023 . doi: 10.1093/nar/gkw023
30. Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB (1995) Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 267:1022–4
31. Skapek SX, Rhee J, Kim PS, et al (1996) Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation. *Mol Cell Biol* 16:7043–53
32. Zhang JM, Zhao X, Wei Q, Paterson BM (1999) Direct inhibition of G(1) cdk kinase activity by MyoD promotes myoblast cell cycle withdrawal and terminal differentiation. *EMBO J* 18:6983–93 . doi: 10.1093/emboj/18.24.6983
33. Li Z, Gilbert JA, Zhang Y, et al (2012) An HMGA2-IGF2BP2 Axis Regulates Myoblast Proliferation and Myogenesis. *Dev Cell* 23:1176–1188 . doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.019

34. Figeac N, Serralbo O, Marcelle C, Zammit PS (2014) ErbB3 binding protein-1 (Ebp1) controls proliferation and myogenic differentiation of muscle stem cells. *Dev Biol* 386:135–151 . doi: 10.1016/j.ydbio.2013.11.017
35. Tomczak KK, Marinescu VD, Ramoni MF, et al (2004) Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *Faseb J* 18:403–405 . doi: 10.1096/fj.03-0568fje\03-0568fje [pii]