



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

EFEITO DA CO-CULTURA DE FIBROBLASTOS NIH3T3 E MIOBLASTOS C2C12 NA EXPRESSÃO DA OSTEOLICINA E NA MIGRAÇÃO CELULAR

SARAH SANTILONI CURY

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" –
UNESP, Campus Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Co-orientador: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Departamento de Morfologia

Botucatu 2016

EFEITO DA CO-CULTURA DE FIBROBLASTOS NIH3T3 E MIOBLASTOS C2C12 NA EXPRESSÃO DA OSTEOTRIGLICINA E NA MIGRAÇÃO CELULAR

SARAH SANTILONI CURY

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, Campus Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Co-orientador: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Departamento de Morfologia

Botucatu 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cury, Sarah Santiloni.

Efeito da co-cultura de fibroblastos NIH3T3 e
mioblastos C2C12 na expressão da Osteoglicina e na
migração celular / Sarah Santiloni Cury. - Botucatu, 2016

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Robson Francisco Carvalho
Coorientador: Flávia Karina Delella
Capes: 20601000

1. Distrofia. 2. Sistema musculoesquelético. 3.
Fibroblastos. 4. Mioblastos esqueléticos. 5. Movimento
celular.

Palavras-chave: Crosstalk celular; Distrofia muscular;
Miogênese.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. Introdução	7
1.1. Eventos celulares e moleculares da miogênese	7
1.2. Secretoma	8
1.3. Osteoglicina	8
1.4. Papel dos Fibroblastos na Miogênese	10
1.5. Fibroblastos e Osteoglicina	11
2. Objetivo	12
3. Material e Métodos	13
3.1. Cultura Celular	13
3.1.1. C2C12 e NIH3T3	13
3.1.2. Co-cultura Celular	13
3.2. Ensaio de Migração - <i>Wound Healing</i>	14
3.3. Western Blot	15
3.3.1. Extração proteica	15
3.3.2. Eletroforese e <i>Immunoblotting</i>	15
3.4. Análise estatística dos dados	16
4. Resultados	17
4.1. Padronização da Co-cultura Celular	17
4.2. Co-cultura fibroblastos/mioblastos não altera a migração dos mioblastos	19
4.3. Co-cultura fibroblastos/mioblastos altera a expressão da Ogn	19
5. Discussão	21
6. Referências	23
7. Material Suplementar	28

RESUMO

Em mamíferos, o crescimento do músculo esquelético e sua regeneração são atribuídos ao processo denominado miogênese que, a nível molecular, é regulado pela interação de transdutores de sinais intra e extra-celulares. A miogênese é um processo altamente orquestrado em que células musculares precursoras mononucleadas, os mioblastos, proliferam e diferenciam-se para formação de fibras musculares adultas. Durante a diferenciação, os mioblastos encerram o seu ciclo celular, migram para regiões predeterminadas, alinham-se uns com os outros e, subsequentemente, fundem-se para finalmente se transformarem em miotubos multinucleados. Os fatores intracelulares que controlam esse processo já são bastante conhecidos, entretanto, trabalhos recentes demonstraram que o processo de miogênese é altamente sensível e regulado por moléculas presentes no meio extracelular, até mesmo por componentes secretados pelas células musculares (secretoma). Dados recentes de nosso laboratório demonstraram que, dentre os principais componentes do secretoma, a osteoglicina (Ogn) possui uma importante função na miogênese, pois o silenciamento pós transcricional da Ogn por pequenos RNAs de interferência (siRNA) altera a proliferação e a diferenciação dos mioblastos C2C12. Além disso, a Ogn foi descrita como importante proteína secretada por fibroblastos para a matriz extracelular e que apresenta função no envelhecimento de fibroblastos cardíacos. Embora já tenham sido descritas algumas funções da Ogn em fibroblastos ou em células musculares, ainda é desconhecido se a Ogn pode participar de uma via comunicação entre esses dois tipos celulares. Portanto, no presente trabalho, testamos a hipótese de que a co-cultura de fibroblastos NIH3T3 (FB) e mioblastos C2C12 (MB) altera os níveis proteicos da Ogn e, consequentemente a migração de mioblastos. Para isso, utilizamos as co-culturas FB/MB e MB/MB durante 0h, 12h e 24 h para avaliar, nos mioblastos, a migração celular e os níveis proteicos da Ogn. A co-cultura FB/MB não altera a taxa de migração de mioblastos, entretanto foi capaz de diminuir os níveis proteicos da Ogn após 12h e 24 h de co-cultura. Além disso, a co-cultura MB/MB não altera os níveis proteicos da Ogn, validando um efeito parácrino dos fibroblastos que diminui os níveis proteicos da Ogn em mioblastos. Esses dados revelam que a co-cultura celular FB/MB influencia na expressão proteica de Ogn sem alterar a migração celular.

Palavras-chave: miogênese; *cross-talk* celular; distrofia muscular.

ABSTRACT

In mammals, the skeletal muscle growth and regeneration are assigned to process called myogenesis that is regulated, at molecular level, by the interaction of intra and extra-cellular signal transducers. Skeletal muscle differentiation, or myogenesis, is a highly-orchestrated process in which mononucleated muscle precursor cells, the myoblasts, undergo proliferation. Upon differentiation, they withdraw from the cell cycle, migrate, align with each other, and subsequently fuse to form terminally differentiated multinucleated myotubes. Intracellular factors that control this process are already well known, however, recent studies have shown that the myogenic process is highly sensitive and regulated by molecules present in the extracellular medium, even for components secreted by muscle cells (secretome). Recent data from our laboratory demonstrate that among the main components of secretome, the osteoglycin (Ogn) has an important role in myogenesis because the post transcriptional silencing of Ogn by small interfering RNAs (siRNAs) alters the proliferation and differentiation of myoblasts C2C12. Furthermore, Ogn has been described as a major protein secreted by fibroblasts to the extracellular matrix and for presenting function in the aging of heart fibroblasts. Although it is already described certain features of Ogn in fibroblasts or muscle cells, it is still unknown whether the Ogn can participate in one way of communication between these two cell types. Therefore, in this study, we tested the hypothesis that co-culture of fibroblasts NIH3T3 (FB) and myoblasts C2C12 (MB) changes the protein levels of Ogn and consequently myoblast migration. For this, we used the co-cultures FB/MB and MB/MB for 0h, 12h and 24 h to evaluate, in myoblasts, cell migration and protein levels of Ogn. The co-culture FB/MB does not alter the myoblast migration rate; however, it decreased the Ogn protein levels after 12h and 24 h of co-culture. In addition, co-culture MB/MB does not change protein levels of Ogn, validating a paracrine effect of the fibroblasts that reduces the protein levels of Ogn in myoblasts. These data reveal that the co-culture FB/MB influences the protein expression of Ogn without changing cell migration.

Key words: myogenesis, cellular crosstalk, muscular dystrophy

1. Introdução

1.1. Eventos celulares e moleculares da miogênese

Em mamíferos, a miogênese é o processo de desenvolvimento embrionário do tecido muscular esquelético que, a nível molecular, é regulado pela interação de transdutores de sinais intracelulares e fatores de transcrição nucleares ¹. Durante o desenvolvimento do músculo esquelético, as células dos somitos comprometem-se à linhagem miogênica e progridem ao longo da via miogênica através de eventos celulares de proliferação e diferenciação terminal e, posteriormente, formam as miofibras multinucleadas ². Durante esses processos, há a ativação dos fatores de regulação miogênicos (MRFs), incluindo as famílias MyoD e MEF2, resultando numa reprogramação da expressão gênica responsável pelo orquestramento da miogênese esquelética ^{3,4}.

A determinação e a diferenciação terminal das células musculares ocorre a nível transcricional governadas pelas vias regulatórias de quatro MRFs: myogenic factor 5 (MYF5), muscle-specific regulatory factor 4 (MRF4; também conhecido como MYF6), myoblast determination protein (MyoD) e miogenina ⁵. Os MRFs possuem dois domínios principais, um envolvido na ligação com a molécula de DNA e outro envolvido na dimerização com proteínas E (E12 ou E47) ⁶. O heterodímero formado possui alta afinidade por uma sequência específica do DNA (5'-CANNTG-3'), conhecida como E-box ⁶. Essa sequência está presente na região promotora de genes músculo-específicos e a ligação é responsável pela ativação da transcrição desses genes ^{1,7}. Esses MRFs são os responsáveis pela indução de células precursoras musculares mononucleadas, os mioblastos, à proliferação e à diferenciação ^{1,8,9}.

No processo de diferenciação do músculo esquelético, o comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica é marcado pela expressão da MYF5 e MyoD; essas células da linhagem miogênica em proliferação são então denominadas de mioblastos ⁴. Embora a MyoD e o MYF5 definam a identidade dos mioblastos, as células precursoras somáticas devem ser pré-comprometidas com a linhagem miogênica antes da expressão dos MRFs. No embrião, esse pré-comprometimento é realizado pelo fator transcricional *paired-box 3* (PAX3), o qual é

expresso em células do mesoderma pré-somítico e dos primeiros somitos epiteliais ^{10,11}. Já no dermomiótomo, as células precursoras, que apresentam expressão de PAX3 induzida por sinais secretados pelo mesoderma da placa lateral e pelo ectoderma superficial, são mantidas como uma população não diferenciada e em proliferação; contribuindo assim para a expansão das células da linhagem miogênica ¹². Os mioblastos que saem do ciclo celular e que expressam MYF5 e MyoD, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão da miogenina e do MRF4, os quais regulam a diferenciação dessas células em fibras musculares ⁴.

1.2. Secretoma

Embora os fatores intracelulares que controlam a miogênese já estejam bem caracterizados, o conhecimento sobre dos fatores extracelulares secretados pelas células musculares que regulam o ciclo celular e induzem o processo de proliferação e diferenciação ainda é bastante escasso. No entanto, é evidente que a miogênese é extremamente sensível ao meio extracelular ^{13,14} e pode funcionar como órgão endócrino por secretar fatores extracelulares que regulam o desenvolvimento do músculo ^{15,16}. Tendo em vista essas importantes atuações dos componentes secretados pelas células musculares esqueléticas (secretoma), torna-se necessário uma melhor compreensão da regulação desses componentes para elucidar as interações entre mecanismos autócrinos e intracelulares de regulação envolvidos na miogênese e regeneração do tecido muscular esquelético.

Chan *et al* identificaram 34 proteínas como parte dos componentes do secretoma e, dentre elas, 30 são reguladas diferencialmente durante a miogênese ¹⁷. A osteoglicina (Ogn) foi a proteína que apresentou uma relevante alteração na sua expressão gênica (mais de seis vezes) durante o processo de miogênese ¹⁷.

1.3. Osteoglicina

A Osteoglicina originalmente chamada de fator osteoindutivo (OIF) e, mais tarde, renomeada de mimecan / osteoglicina ^{18,19,20}, é o sétimo membro pertencente à família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) que são secretados na

matriz extracelular (MEC) ²⁰. Sua estrutura protéica é composta por 6-11 de repetições ricas em leucina e possui um peso molecular entre 25 a 60 kDa ²¹. O gene da Ogn está localizado no cromossomo 9q22 humano ²², sua estrutura genômica é altamente conservada entre as espécies, e uma única cópia do gene dá origem a múltiplos transcritos de mRNA resultantes do *splincing* alternativo de poliadenilação diferencial ²³. No entanto, todos esses transcritos produzem uma proteína idêntica que é conservada entre as espécies, indicando a sua importância funcional ^{23,24}.

O website *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>) mostra que o transcrito e a proteína Ogn é encontrada em diferentes proporções na maioria dos tecidos do corpo humano, incluindo tecidos musculares (**Figura 1**). A principal função da Ogn já descrita está relacionada com a fibrilogênese do colágeno de tecidos conjuntivos e matrizes ósseas ^{21,24,25}. Podendo ser relacionada a diversos processos biológicos, tais como formação do osso ²⁵, desenvolvimento de tumores, transparência da córnea e integridade da pele ²⁶.

A Ogn foi identificada como parte do secretoma de células musculares, e foi avaliada a sua função nos processos de proliferação, migração e diferenciação de células musculares. Chan e colaboradores mostraram a existência de expressão diferencial da Ogn entre mioblastos e miotubos; e quando realizaram o *knockdown* da Ogn, verificaram uma diminuição de 1.6 vezes da atividade transcricional da quinase creatina muscular, acompanhada de diminuição na diferenciação dos mioblastos ¹⁷. Além disso, dados recentes de nosso laboratório demonstraram que a osteoglicina possui uma importante função na miogênese, pois seu silenciamento gênico pós transcricional, por pequenos RNAs de interferência (siRNA), altera a proliferação e a diferenciação dos mioblastos C2C12 ²⁷.

Esses dados indicam que a Ogn é uma importante proteína secretada pelo músculo que influencia os estágios iniciais da miogênese. Adicionalmente, Tanaka *et al* comprovaram que a Ogn apresenta uma importante função na regulação de mioblastos em co-cultura com osteoblastos. Os autores observaram que o tratamento de osteoblastos com meio de cultivo de mioblastos com ganho e perda de função da Ogn, aumenta e diminui, respectivamente, os níveis de expressão proteica da fosfatase alcalina, do colágeno do tipo 1 e da β -catenina nos osteoblastos. Esses resultados indicam que a Ogn, produzida no músculo, também atua como um importante fator humoral anabólico fundamental para o desenvolvimento dos osteoblastos ²⁸.

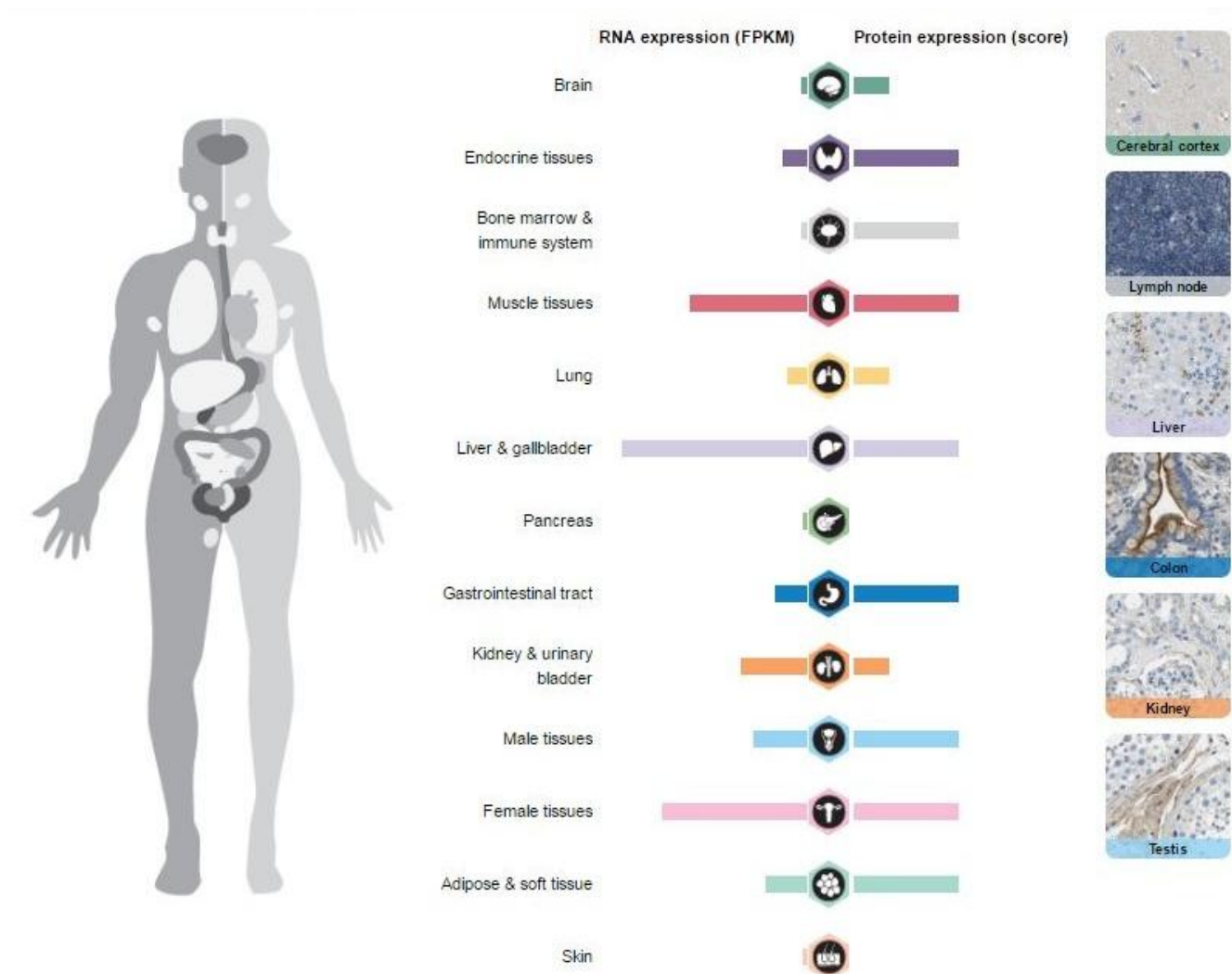


Figura 1. Expressão gênica e proteica da Ogn em diferentes tecidos do corpo humano esquematizada pelo portal *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>).

1.4. Papel dos Fibroblastos na Miogênese

Tendo em vista que o processo de miogênese responde à fatores extracelulares, torna-se necessário compreender o mecanismo pelo qual outras células podem influenciar nesse processo. Um importante tipo celular que é capaz de regular o desenvolvimento do músculo são os fibroblastos^{29,30}.

Os fibroblastos são os principais componentes do tecido conjuntivo. Essas células são responsáveis pela secreção de diversas substâncias que fazem parte da matriz extracelular, como colágeno, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido

hialurônico³¹. Os fibroblastos são importantes no processo de reparação de tecidos por sua capacidade de proliferarem, migrarem para a ferida e produzirem grandes quantidades de colágeno quando o tecido é lesionado³².

A capacidade de regeneração dos tecidos deve-se à atividade secretora dos fibroblastos, principalmente, pela produção de fatores de crescimento como o FGF (*fibroblast growth factor*). Os membros da família de FGFs foram identificados como moléculas sinalizadoras no desenvolvimento de diferentes tipos celulares, através da sua ação no controle da proliferação, diferenciação e morfogênese. Além disso, um desses membros, o FGF13, apresenta uma ação direta no tecido muscular pela inibição dos processos de proliferação e diferenciação “in vitro” de mioblastos C2C12³³.

Isto indica que existe uma forte interação entre o desenvolvimento dos fibroblastos com o desenvolvimento de tecidos/células adjacentes. De fato, os fibroblastos auxiliam na individualização da massa muscular durante a organogênese embrionária²⁹. Outro indício dessa interação é a existência de componentes da lâmina basal do músculo que são sintetizados em parte pelos fibroblastos deste mesmo tecido³⁰.

Além disso, estudo feito por Joffroy *et al*, 2000 demonstrou que se o desenvolvimento do músculo estiver comprometido, os fibroblastos apresentarão desenvolvimento deficiente. Mostrando que certas características dos fibroblastos são determinadas pelo ambiente celular circundante durante o desenvolvimento embrionário, sendo que esse processo compromete permanentemente a estrutura dos fibroblastos, prejudicando o desenvolvimento do músculo na idade adulta²⁹.

1.5. Fibroblastos e Osteoglicina

Diversos estudos tem demonstrado a importância da produção de Ogn por fibroblastos, como também a necessidade de Ogn para o desenvolvimento apropriado dos fibroblastos. Recentemente, um estudo realizado por Van Aelst *et al*, 2015 demonstrou que os fibroblastos cardíacos são capazes de expressar maiores quantidades de Ogn do que as células musculares cardíacas²⁶. Também foi encontrado que fibroblastos embrionários de camundongos secretam Ogn, sendo que sua forma madura é essencial para a construção adequada da MEC³⁴.

Em fibroblastos cardíacos o controle da expressão da Ogn pelo miR-22 está relacionado ao envelhecimento cardíaco, pois em indivíduos com idades avançadas os níveis desse microRNA aumentam, enquanto que, os níveis proteicos de Ogn diminuem ³⁵.

Embora já tenham sido descritas algumas importantes funções da Ogn em fibroblastos ou em células musculares, ainda é desconhecido se a Ogn pode participar de uma via comunicação entre esses dois tipos celulares para controle do desenvolvimento do músculo. Essa comunicação, denominada de “ativação cruzada” ou *crosstalk*, ocorre a partir de componentes liberados por cada uma dessas células, os quais podem ativar vias de transdução de sinais em fibroblastos e/ou em células musculares ³⁶.

Para demonstrar esse efeito do *crosstalk* entre diferentes tipos celulares, são comumente utilizados modelos de co-cultura, pois os modelos de co-cultura contribuem na compreensão das interações de dois tipos celulares, os quais refletem mais precisamente o ambiente “in vivo” ³⁷. Experimento realizado com co-cultura de células epiteliais e fibroblastos demonstrou que existe uma ação coordenada e colaborativa entre essas células para o crescimento e morte celular, através de expressão diferencial de alguns genes, quando comparados à culturas simples dos tipos celulares estudados ³⁸. Com isso, torna-se interessante analisar o efeito da co-cultura de fibroblastos com mioblastos para melhor compreensão da interação e influência dos fibroblastos no desenvolvimento do músculo esquelético.

Portanto, considerando que: 1) nosso grupo de pesquisa já descreveu um papel da Ogn na regulação da miogênese; 2) o ambiente para a manutenção, diferenciação e regeneração das células musculares envolve processos regulatórios influenciados pelos fibroblastos ³⁹, testaremos a hipótese de que a co-cultura de fibroblastos NIH3T3 e mioblastos C2C12 altera os níveis proteicos da Ogn e, conseqüentemente a migração de mioblastos.

2. Objetivo

Avaliar a influência da co-cultura celular de fibroblastos NIH3T3 e mioblastos C2C12 na migração celular e nos níveis proteicos da Ogn de mioblastos.

3. Material e Métodos

3.1. Cultura Celular

3.1.1. C2C12 e NIH3T3

Esse estudo utilizou linhagem celular de camundongo C2C12 capaz de diferenciar-se em miotubos. Essa linhagem celular é uma importante ferramenta para o estudo da atrofia muscular e miogenese ^{40, 41}. Outra linhagem celular utilizada neste estudo foi a NIH3T3; essa linhagem imortalizada é constituída por fibroblastos embrionários de camundongos, a qual representa um importante modelo experimental para diferentes estudos, desde sua primeira descrição em 1963 ⁴². Células da linhagem C2C12 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ) e células NIH3T3, gentilmente doados pelo Prof. Dr. William Fernando Zambuzzi (Departamento de Química e Bioquímica, IBB – UNESP), foram utilizadas neste estudo. As células foram cultivadas, independentemente, em garrafas de 75 cm² com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Life Technologies, EUA*) suplementados com 10% soro fetal bovino (SFB – *Life Technologies, EUA*) e 1% de antibiótico (*Penicillin-streptomycin solution stabilized – Life Technologies, EUA*) até atingirem uma confluência de 80% (dentre um período de ~ 3-4 dias). Posteriormente, as células foram tripsinizadas: metade das células foi transferida para outra garrafa para serem expandidas; a outra metade foi ajustada para uma diluição de 1:10 e divididas em placas de 6 poços para que os experimentos de co-cultura pudessem ser realizados.

3.1.2. Co-cultura Celular

Nos experimentos de co-cultura os mioblastos C2C12 foram semeados em placas 6 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço em 2 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Life Technologies, EUA*) suplementado com 10% de SFB e 1% antibiótico. Os mioblastos foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida até atingirem 100% de confluência. Posteriormente, os fibroblastos foram semeados na densidade de 1×10^5 células/poço em 2 mL do mesmo meio de cultura, sobre o inserto móvel que se encaixa em cada poço e contém membrana microporosa com poros de 0,4

um revestindo o seu fundo (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA). Após atingirem 50% de confluência, cada inserto contendo os fibroblastos foi cuidadosamente encaixado sobre o poço contendo mioblastos, permitindo a comunicação entre as duas populações celulares através da difusão de fatores secretados por elas, sem que houvesse contato direto entre os diferentes tipos celulares. Nesse momento o meio DMEM com 10% de SFB foi trocado por meio DMEM com 1% de SFB e a co-cultura entre os dois tipos celulares ocorreu em 0, 12 e 24 horas de exposição. Cada grupo experimental foi composto por triplicatas biológicas para melhor avaliação dos resultados do tratamento aplicado. Além disso, para manter as mesmas condições do grupo co-cultura, os mioblastos do grupo controle foram colocados em contato com insertos que continham mioblastos (**Figura 2**).

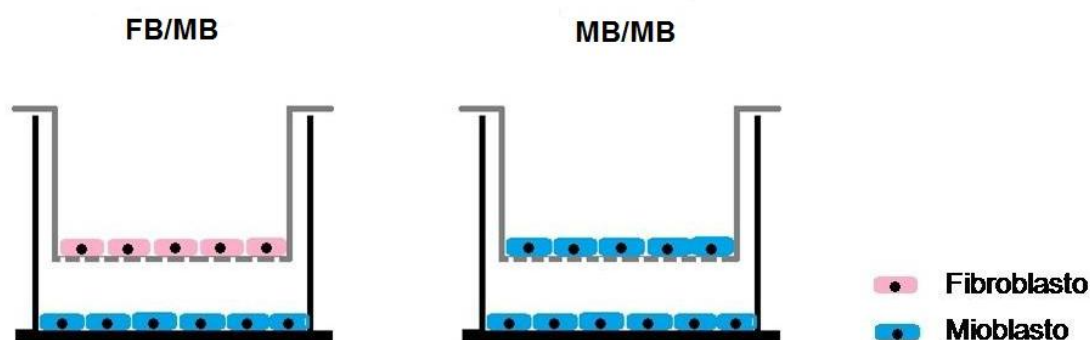


Figura 2. Representação do experimento de co-cultura FB/MB, o qual continha mioblastos cultivados em co-cultura com fibroblastos; e MB/MB, o qual continha mioblastos cultivados em co-cultura com mioblastos (controle). FB: fibroblastos; MB: mioblastos.

3.2. Ensaio de Migração - *Wound Healing*

O ensaio *Wound Healing* foi realizado para a análise qualitativa *in vitro* da migração celular ⁴³. Para a elaboração desse ensaio, os mioblastos C2C12 em co-cultura foram analisados quanto ao seu potencial de migração nos tempos de 0h, 6h, 12h, 18h e 24h. Os mioblastos foram cultivados em placas de 6 poços na concentração de 1×10^5 células/cm², até a confluência de 100%, quando os insertos, contendo mioblastos ou fibroblastos na mesma concentração, foram colocados nas placas. As monocamadas foram lesadas (riscadas, mimetizando a criação de uma ferida) em linha reta no centro de cada poço com o uso de uma ponteira estéril de 200 μ L, utilizando como apoio a tampa estéril da placa de 6 poços para a obtenção de um risco regular. A área lesada na placa foi

inspecionada nos tempos 0, 6h, 12h, 18h e 24h em microscópio invertido de contraste de fase e as imagens foram capturadas nesses intervalos com a utilização de câmera digital acoplada *AxioCam ICc5* (*Carl Zeiss Microscopy*, Alemanha). A área de fechamento da lesão foi calculada comparando a porcentagem da área da ferida no primeiro momento até o fechamento total da ferida, nos diferentes pontos de tempo, utilizando o programa ImageJ[®] (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

3.3. Western Blot

3.3.1. Extração proteica

Os mioblastos de 0, 12 e 24 horas em co-cultura, presentes em placas de 6 poços, foram lavados 2 vezes com PBS (*Phosphate-buffered saline*, *Thermo Fisher*, EUA) e, em cada poço, foram adicionados 250 µL de tampão de lise RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*; *Sigma-Aldrich*, EUA). Após incubação por 24 horas a -20°C, os poços foram raspados para completa lise celular, o homogeneizado resultante foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado a 8000 g, por 10 minutos a 4°C. A concentração proteica total do sobrenadante foi analisada pelo método de *Bradford*⁴⁴ *Protein Assay* (*Bio-Rad Laboratories*, EUA), utilizando as curvas de *BSA Protein Standard* (*Bio-Rad Laboratories*, EUA) como padrão.

3.3.2. Eletroforese e Immunoblotting

As amostras das proteínas extraídas foram diluídas em tampão *Laemmli* (*Sample Buffer Laemmli 2x Concentrate*, *Sigma-Aldrich*, EUA) 20 µg de proteínas foram separadas por eletroforese utilizando sistema *Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell* (*Bio-Rad*, EUA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico de empilhamento (Tris-HCL 240 mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 10%. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (*Bio-Rad*, EUA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120 V (*Power Pac HC 3.0A*, *Bio-Rad*, EUA), por aproximadamente 2 horas, com tampão

de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema *Mini-Trans Blot* (Bio-Rad, EUA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM e detergente Tween 20 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário às membranas foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T, por 120 minutos, à temperatura ambiente, sob constante agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (**Tabela 1**) diluído na solução bloqueadora, sob agitação *overnight*. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência, de acordo com as instruções do fabricante (*Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, EUA*) para visualização das bandas. As membranas de nitrocelulose foram expostas ao Fotodocumentador *ImageQuant™ LAS 4000* (GE Healthcare, EUA) para obtenção das bandas de proteínas. A quantificação das bandas foi feita por densitometria utilizando o software *Image J* versão 1.49j (<http://imagej.nih.gov/ij>). Os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos pelo corante *Ponceau 10x* (0.5% Ponceau Red; 1% Ácido Acético).

Tabela 1. Anticorpo primário utilizado na imunodeteção por *Western Blot*.

Anticorpo	Concentração	Peso Molecular
Osteoglycin*	1:1000	34 kDa

*Santa Cruz Biotechnology, EUA

3.4. Análise estatística dos dados

A ferramenta *GraphPad Prism®* (GraphPad Software, EUA) foi utilizada para análises estatísticas dos dados obtidos. Os valores dos ensaios de migração foram submetidos ao teste “t” de *Student* para amostras independentes. E os valores de níveis protéicos foram examinados por meio de análise de variância (ANOVA) para modelo de

medidas repetidas em grupos independentes e complementados com teste de Tukey. Todos os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (SD). O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5% ($\alpha=0.05$).

4. Resultados

4.1. Padronização da Co-cultura Celular

Para determinar o tempo de co-cultura nos poços da placa de 6 poços, mioblastos C2C12 (MB) e fibroblastos NIH3T3 (FB) foram colocadas em co-cultura FB/MB, quando os mioblastos atingiram 100% de confluência, e deixados em contato por 60 horas através do ensaio de migração celular (*Wound healing*). Esses resultados foram comparados com a cultura controle contendo apenas MB. Com isso, pudemos observar que, após 48h, a co-cultura FB/MB induziu um desprendimento dos mioblastos aderidos na placa, com consequente alteração na migração dos mioblastos após 60h de co-cultura, quando comparados com MB. Assim, foi determinado que o tempo ideal para as posteriores análises seria de até 24 horas em co-cultura (**Figura 3**). Além disso, os inserts de placas de cultura com poros de 0,4 μm não são translúcidos e desta forma não foi possível a observação direta das células por meio do microscópio invertido (Zeiss Axiovert[®], Alemanha). Para observação da confluência de FB e MB após 24h, estas células foram coradas com o corante H.E. e observadas em microscópio óptico (Leica Microsystems[®], Alemanha) (**Figura 4**). Portanto, avaliamos o efeito da co-cultura FB/MB na migração celular e dos níveis proteicos da Ogn em mioblastos, nos tempos 0h, 12h e 24h.

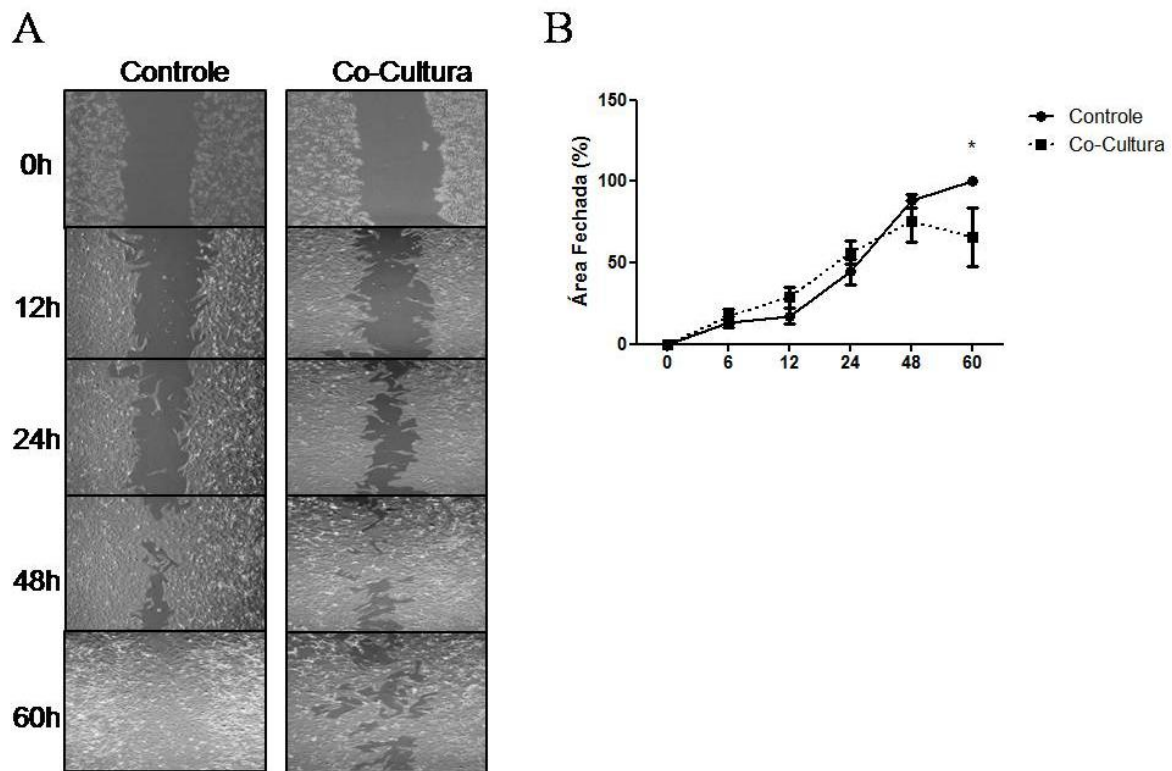


Figura 3. Padronização do tempo de co-cultura celular através do ensaio de migração celular. **(A)** Fotos representativas dos mioblastos em co-cultura com fibroblastos e seu respectivo controle, obtidas nos tempos de 0 h, 12 h, 24 h, 48 h e 60 h após o corte. **(B)** Análise da migração celular das células C2C12 mensurada pelo método de *Wound-Healing*. O fechamento do corte foi quantificado nos tempos 0 h, 12 h, 24 h, 48 h e 60 h após o corte, pela medida das áreas não cicatrizadas, utilizando o software *ImageJ*. Dados expressos em porcentagem relativa (%) $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle.

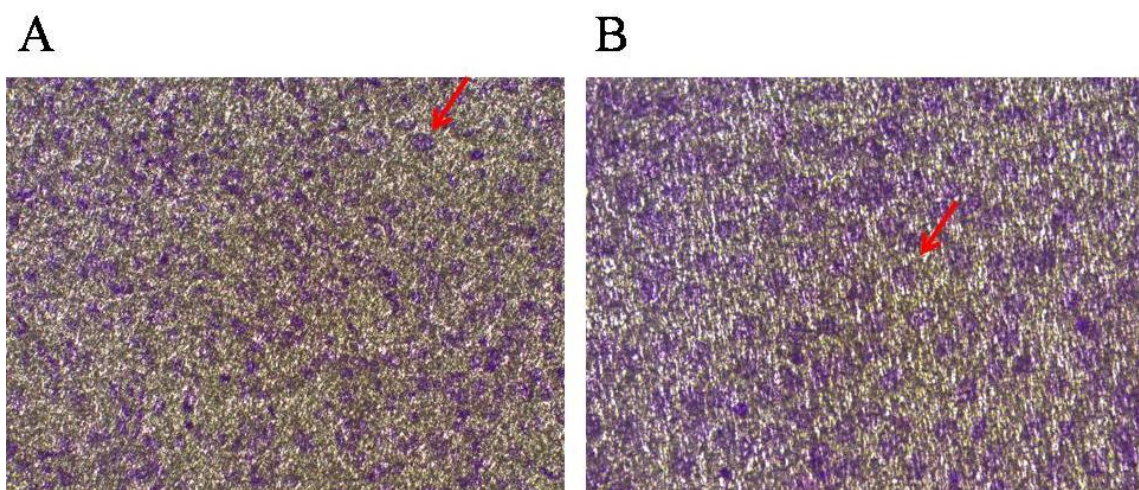


Figura 4. Insertos corados com HE indicando a confluência celular. **(A)** Fibroblastos NIH3T3 **(B)** Mioblastos C2C12. Setas vermelhas indicam os núcleos em objetiva de 10x/20x respectivamente.

4.2. Co-cultura fibroblasto/mioblasto não altera a migração de mioblastos

A migração dos mioblastos foi avaliada pelo ensaio *Wound Healing*, como descrito em Grzelkowska-Kowalczyk et al., 2015⁴³. As células em co-cultura FB/MB não apresentaram diferença significativa na migração celular nos períodos analisados quando comparadas com MB/MB (**Figura 5**).

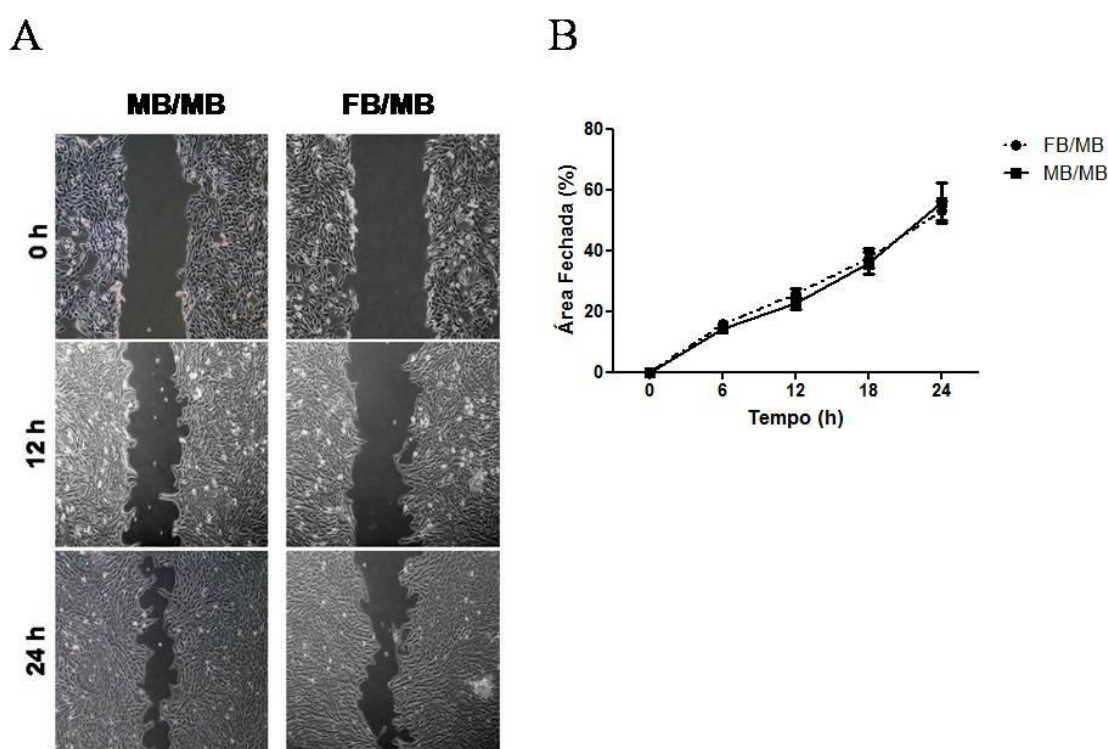
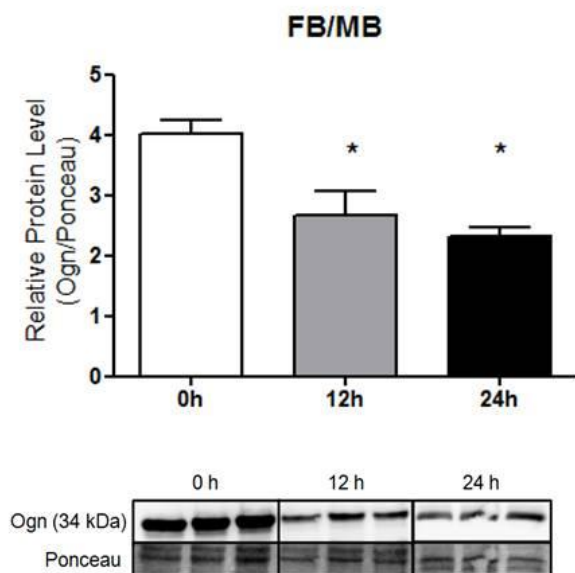


Figura 5. (A) Fotos representativas dos mioblastos nas co-culturas fibroblastos (FB) / mioblastos (MB), obtidas nos tempos de 0 h, 12 h e 24 h após o corte. (B) Análise da migração celular dos MB mensurada pelo método de *Wound-Healing*. O fechamento do corte foi quantificado nos tempos 0h, 6h, 12h, 18h e 24h após o corte, pela medida das áreas não cicatrizadas, utilizando o software *ImageJ*. Dados expressos em porcentagem relativa (%) $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle.

4.3. Co-cultura fibroblasto/mioblasto altera a expressão da Ogn

Os resultados obtidos por *Western Blot* mostraram que os níveis proteicos de Ogn diminuíram, em 12 e 24 horas, nos mioblastos em co-cultura FB/MB quando comparado ao mioblasto em 0 h de co-cultura (**Figura 6A**). Entretanto, a co-cultura controle MB/MB não apresentou a mesma tendência (**Figura 6B**).

A



B

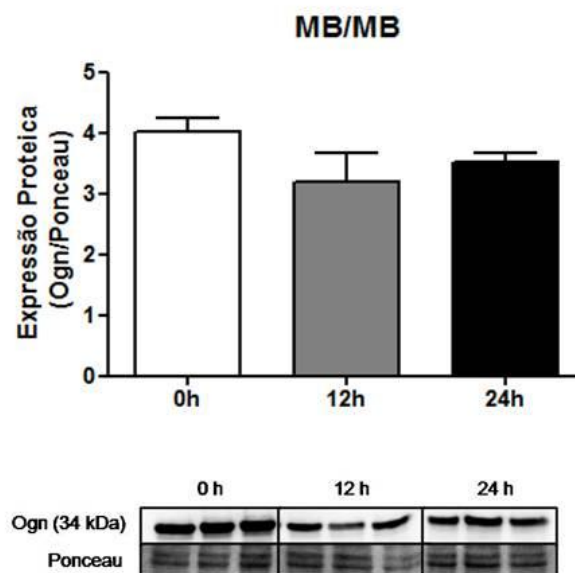


Figura 6. (A) Níveis proteicos da Ogn nos mioblastos em co-cultura FB/MB durante 0, 12 e 24 horas utilizando *Western Blot* normalizada por *Ponceau*, e blots representativos. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e grupos independentes. * $p < 0,05$ vs. 0h. **(B)** Níveis proteicos da Ogn nos mioblastos em co-cultura MB/MB durante 0, 12 e 24 horas utilizando *Western Blot* normalizada por *Ponceau*, e blots representativos. Análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e grupos independentes. * $p < 0,05$ vs. 0h. Ogn: osteoglicina; kDa: kilodalton.

5. Discussão

No presente estudo, foi avaliada a influência da co-cultura celular entre mioblastos C2C12 (MB) e fibroblastos NIH3T3 (FB) na expressão proteica de osteoglicina (Ogn) e na migração das células musculares esqueléticas. Avaliamos se a co-cultura FB/MB seria capaz de alterar a expressão da Ogn e a migração de células C2C12. Embora a co-cultura FB/MB não altere a migração de mioblastos, regula negativamente os níveis proteicos de Ogn nos mioblastos.

Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia o efeito da co-cultura FB/MB na migração de mioblastos. Os resultados obtidos a partir do *Wound Healing* mostraram que não houve modificação no processo de migração dos mioblastos em co-cultura com os fibroblastos. O ensaio de migração tem sido amplamente utilizado em cultura de C2C12 para estudo funcional de proteínas relacionadas com a miogênese^{45, 46}, mostrando que é um modelo bem estabelecido e eficaz para análise de moléculas que participam do processo de migração celular nesse tipo celular. Como a Ogn é um importante componente para organização da matriz extracelular, ela apresenta grande potencial para regular o processo de migração. Entretanto, estudo recente desenvolvido em nosso laboratório demonstrou que o silenciamento gênico pós-transcricional da Ogn por siRNA não altera a migração de mioblastos C2C12²⁷. Também já foi demonstrado que o silenciamento da Ogn não altera a migração celular de fibroblastos cardíacos³⁵. Portanto, esses resultados indicam que a Ogn não é essencial para a eficiência do processo de migração para nesses tipos celulares, e em co-cultura FB/MB.

Apesar de não apresentar efeito no processo da migração, a Ogn é, de fato, extremamente importante para a manutenção do músculo esquelético²⁷. Desta forma, os dados de expressão proteica demonstraram que a co-cultura FB/MB foi capaz de diminuir os níveis proteicos da Ogn após 12h e 24 h de co-cultura. Além disso, a co-cultura MB/MB não alterou os níveis proteicos da Ogn, validando um efeito parácrino dos fibroblastos, o qual diminui os níveis proteicos da Ogn em mioblastos.

Dados do *GEO Profiles* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>) mostram que o músculo esquelético de pacientes com distrofia muscular de Duchenne apresenta aumento da expressão gênica de Ogn quando comparados à indivíduos saudáveis⁴⁸ e o mesmo padrão de expressão é encontrado no camundongo MDX - modelo experimental de distrofia muscular⁴⁹ (**Figura Suplementar 1**). Além dos mioblastos, a Ogn parece ter um importante papel em fibroblastos. Recentemente, uma análise global do transcriptoma de

fibroblastos de pacientes com distrofia muscular congênita demonstrou um aumento da expressão de genes relacionados à matriz extracelular e a Ogn encontrava-se entre os 10 genes com maior aumento dos níveis de expressão diferencial ⁴⁷. Além disso, o tratamento de fibroblastos de pacientes distróficos com ácido ascórbico é capaz de reverter a expressão de diversos genes da matriz, incluindo a Ogn, e consequentemente, esse tratamento fez com que essas células se assemelhassem mais a fibroblastos normais ⁴⁷. Esses dados evidenciam que a Ogn é importante em doenças primárias do músculo (distrofias), no qual há desenvolvimento progressivo de fibrose, ou seja, deposição aberrante de componentes da matriz extracelular, com consequente perda da arquitetura e função do tecido ⁵⁰.

Sendo assim, provavelmente, a menor quantidade de Ogn nos mioblastos em co-cultura com os fibroblastos é uma consequência de mecanismos parácrinos, em resposta à presença de fibroblastos no mesmo ambiente. Portanto, é importante compreender esse mecanismo de comunicação entre esses dois tipos celulares, para desenvolver terapias que possam trazer maior homeostase para as proteínas da MEC dos pacientes com distrofias, visto que este tipo de tratamento apresenta eficiência em alguns tipos de distrofias ⁵¹.

Por ser uma proteína importante para a fibrillogênese do colágeno ²⁴ e estar presente no secretoma de células musculares ¹⁷, acreditamos que a Ogn é essencial para a organização da matriz extracelular durante a miogênese. Além disso, é uma importante proteína em doenças musculares onde existe quantidade grande de fibrose, mostrando que, possivelmente, atua no *crosstalk* celular nos tecidos afetados. Nossas perspectivas futuras envolvem experimentos que possam nos ajudar entender a participação da Ogn na comunicação com fibroblastos, avaliando os níveis de Ogn no meio de co-cultura para confirmar a maior secreção dessa proteína para a matriz extracelular e, também, entender avaliar sua expressão em modelos experimentais de distrofias musculares.

A avaliação do efeito da co-cultura de mioblastos e fibroblastos indicou que a Ogn pode participar na via de comunicação entre esses dois tipos celulares, pois quando em contato, houve diminuição nos níveis proteicos de Ogn nos mioblastos. Portanto, nossos dados demonstram que a co-cultura celular FB/MB influencia na expressão proteica de Ogn sem alterar a migração celular.

6. Referências

1. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2). doi:10.1101/cshperspect.a008342.
2. Naya FJ, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(6):683-688. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600704>. Accessed November 1, 2014.
3. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993;75(7):1241-1244. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8269506>. Accessed November 1, 2014.
4. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 73(9-10):723-732. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8714693>. Accessed November 1, 2014.
5. Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(6):349-361. doi:10.1038/nrm3118.
6. Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 2000;20(2):429-440. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=85097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed October 12, 2014.
7. Buckingham M, Rigby PWJ. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev Cell.* 2014;28(3):225-238. doi:10.1016/j.devcel.2013.12.020.
8. Capers CR. Multinucleation of skeletal muscle in vitro. *J Biophys Biochem Cytol.* 1960;7:559-566. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2224832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 1, 2014.
9. Stockdale FE, Holtzer H. DNA synthesis and myogenesis. *Exp Cell Res.* 1961;24:508-520. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13917284>. Accessed November 1, 2014.
10. Goulding M, Lumsden A, Paquette AJ. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development.* 1994;120(4):957-971. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600971>. Accessed

November 1, 2014.

11. Williams BA, Ordahl CP. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development*. 1994;120(4):785-796. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600957>. Accessed November 1, 2014.
12. Amthor H, Christ B, Patel K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development*. 1999;126(5):1041-1053. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927604>. Accessed November 1, 2014.
13. Bischoff R. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *J Cell Biol*. 1990;111(1):201-207. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2116175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 1, 2014.
14. Bischoff R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Development*. 1990;109(4):943-952. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2226207>. Accessed November 1, 2014.
15. Engler D. Hypothesis: Musculin is a hormone secreted by skeletal muscle, the body's largest endocrine organ. Evidence for actions on the endocrine pancreas to restrain the beta-cell mass and to inhibit insulin secretion and on the hypothalamus to co-ordinate the ne. *Acta Biomed*. 2007;78 Suppl 1:156-206. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17465332>. Accessed November 1, 2014.
16. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1379-1406. doi:10.1152/physrev.90100.2007.
17. Chan CYX, Masui O, Krakovska O, et al. Identification of differentially regulated secretome components during skeletal myogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(5):M110.004804. doi:10.1074/mcp.M110.004804.
18. Bentz H, Nathan RM, Rosen DM, et al. Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem*. 1989;264(34):20805-20810. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2584240>. Accessed November 1, 2014.
19. Hu S-M, Li F, Yu H-M, et al. The mimecan gene expressed in human pituitary and regulated by pituitary transcription factor-1 as a marker for diagnosing pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6657-6664. doi:10.1210/jc.2005-0322.

20. Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW. Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem.* 1997;272(44):28089-28095. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9346963>. Accessed November 1, 2014.
21. Tasheva ES, Pettenati M, Von Kap-Her C, Conrad GW. Assignment of mimecan gene (OGN) to human chromosome band 9q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;88(3-4):326-327. doi:15521.
22. Tasheva ES, Corpuz LM, Funderburgh JL, Conrad GW. Differential splicing and alternative polyadenylation generate multiple mimecan mRNA transcripts. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32551-32556. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405469>. Accessed November 1, 2014.
23. Madisen L, Neubauer M, Plowman G, et al. Molecular cloning of a novel bone-forming compound: osteoinductive factor. *DNA Cell Biol.* 1990;9(5):303-309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2372374>. Accessed November 1, 2014.
24. Tasheva ES, Koester A, Paulsen AQ, et al. Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Mol Vis.* 2002;8:407-415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432342>. Accessed November 1, 2014.
25. Kaji H. Interaction between Muscle and Bone. 2014:29-40.
26. Van Aelst LNL, Voss S, Carai P, et al. Osteoglycin prevents cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction through infarct collagen strengthening. *Circ Res.* 2015;116(3):425-436. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304599.
27. Freire PP. Regulação da osteoglicina pelo microRNA miR-155 durante a miogênese. Dissertação para obtenção do título de Mestre pelo programa de Biologia Geral e Aplicada, Unesp - Botucatu, 2016.
28. Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki Y, et al. Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. *J Biol Chem.* 2012;287(15):11616-11628. doi:10.1074/jbc.M111.292193.
29. Joffroy S, Letellier T, Rossignol R, et al. Modification of mitochondrial metabolism in fibroblasts from mice with a skeletal muscle mutation (muscular dysgenesis). Evidence of embryonic communication between myoblasts and fibroblasts. *Differentiation.* 2000;65(5):261-270. doi:10.1046/j.1432-0436.2000.6550261.x.
30. Sanderson RD, Fitch JM, Linsenmayer TR, Mayne R. Fibroblasts promote the formation of a continuous basal lamina during myogenesis in vitro. *J Cell Biol.* 1986;102(3):740-747.

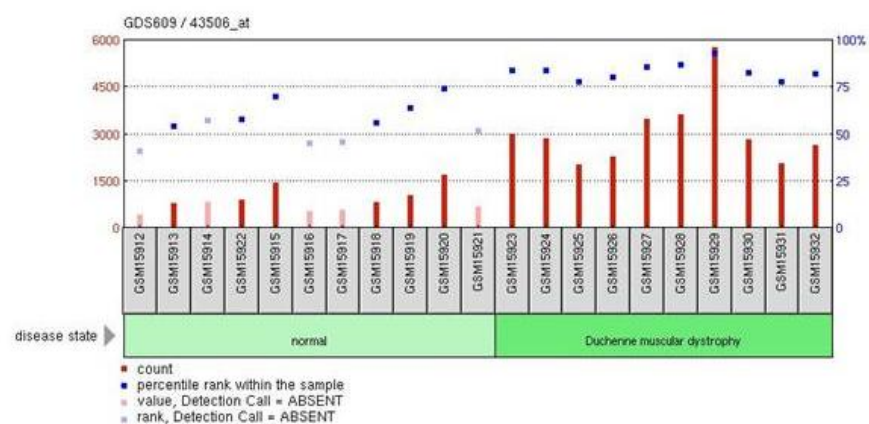
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2114123&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 23, 2015.

31. Bordoni B, Zanier E. Understanding Fibroblasts in Order to Comprehend the Osteopathic Treatment of the Fascia. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2015;2015:1-7. doi:10.1155/2015/860934.
32. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and PW. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition.; 2002. doi:NBK26889.
33. Lu H, Shi X, Wu G, et al. FGF13 regulates proliferation and differentiation of skeletal muscle by down-regulating Spry1. *Cell Prolif*. 2015;48(5):550-560. doi:10.1111/cpr.12200.
34. Ge G, Seo N-S, Liang X, Hopkins DR, Höök M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1/tolloid-related metalloproteinases process osteoglycin and enhance its ability to regulate collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41626-41633. doi:10.1074/jbc.M406630200.
35. Jazbutyte V, Fiedler J, Kneitz S, et al. MicroRNA-22 increases senescence and activates cardiac fibroblasts in the aging heart. *Age (Dordr)*. 2013;35(3):747-762. doi:10.1007/s11357-012-9407-9.
36. Rother J, Richter C, Turco L, et al. Crosstalk of cardiomyocytes and fibroblasts in co-cultures. *Open Biol*. 2015;5(6):150038. doi:10.1098/rsob.150038.
37. Bayne CW, Donnelly F, Chapman K, Bollina P, Buck C, Habib F. A novel coculture model for benign prostatic hyperplasia expressing both isoforms of 5 alpha-reductase. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(1):206-213. doi:10.1210/jcem.83.1.4486.
38. Yang X, Xuan Q, Mo L, et al. Differential expression of genes in co-cultured versus separately cultured fibroblasts and epithelial cells from human benign hyperplastic prostate tissues. 1888:17-25. doi:10.3892/ijmm.
39. Ceafalan LC, Popescu BO, Hinescu ME. Cellular Players in Skeletal Muscle Regeneration.
40. Panguluri SK, Bhatnagar S, Kumar A, et al. Genomic profiling of messenger RNAs and microRNAs reveals potential mechanisms of TWEAK-induced skeletal muscle wasting in mice. *PLoS One*. 2010;5(1):e8760. doi:10.1371/journal.pone.0008760.
41. Stevenson EJ, Koncarevic A, Giresi PG, Jackman RW, Kandarian SC. Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy. *J Appl Physiol*. 2005;98(4):1396-1406. doi:10.1152/jappphysiol.01055.2004.

42. Leibiger C, Kosyakova N, Mkrtchyan H, Glei M, Trifonov V, Liehr T. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(4):306-312. doi:10.1369/0022155413476868.
43. Grzelkowska-Kowalczyk K, Wicik Z, Majewska A, et al. Transcriptional regulation of important cellular processes in skeletal myogenesis through interferon- γ . *J Interferon Cytokine Res.* 2015;35(2):89-99. doi:10.1089/jir.2014.0018.
44. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>. Accessed July 9, 2014.
45. Nguyen NUN, Liang VR, Wang H-V. Actin-associated protein palladin is required for migration behavior and differentiation potential of C2C12 myoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452(3):728-733. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.143.
46. Nishimura T, Nakamura K, Kishioka Y, Kato-Mori Y, Wakamatsu J, Hattori A. Inhibition of matrix metalloproteinases suppresses the migration of skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008;29(1):37-44. doi:10.1007/s10974-008-9140-2.
47. Paco S, Casserras T, Rodríguez MA, Jou C. Transcriptome Analysis of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts Reveals a Disease Extracellular Matrix Signature and Key Molecular Regulators. 2015:1-21. doi:10.1371/journal.pone.0145107.
48. Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT, et al. Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. 2003:163-171. doi:10.1007/s10048-003-0148-x.
49. Tseng BS, Zhao P, Pattison JS, et al. Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression. 2002:537-545.
50. Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-cánoves P. Understanding the Process of Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. 2014;2014. doi:10.1155/2014/965631.
51. Mehuron T, Kumar A, Duarte L, Yamauchi J, Accorsi A, Girgenrath M. Dysregulation of matricellular proteins is an early signature of pathology in laminin-deficient muscular dystrophy. 2014:1-18.

7. Material Suplementar

Profile GDS609 / 43506_at
Title Duchenne muscular dystrophy (II) (HG-U95B)
Organism Homo sapiens



Profile GDS236 / 160877_at
Title Dystrophin-deficient mdx muscle regeneration
Organism Mus musculus

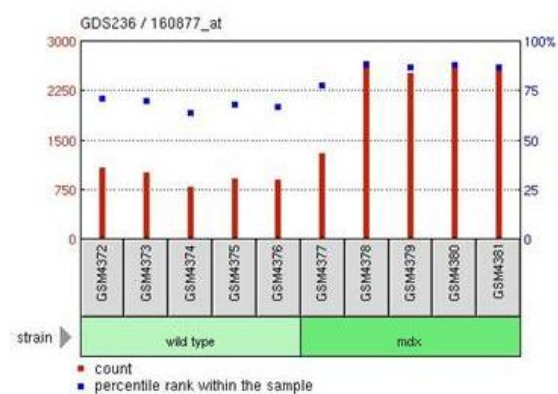


Figura Suplementar 1. Dados de expressão gênica de Ogn em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne e em modelo experimental de distrofia muscular (camundongo MDX) disponíveis na plataforma GEO Profiles.