Juliana Plat de Aguiar Gomes

Comparação do potencial terapêutico de células
mesenquimais e pericitos em modelo murino de
distrofia muscular

Versão revisada da dissertação
apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
BIOLOGIA/GENÉTICA.

Orientadora: Mayana Zatz

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Plat de Aguiar Gomes, Juliana

Comparação do potencial terapêutico de células mesenquimais e pericitos em modelo murino de distrofia muscular

Número de páginas:85

Versão revisada, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Distrofia Muscular
2. Células tronco mesenquimais
3. Pericitos

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Mayana Zatz

Orientadora

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, Marcelo e Raquel, por todo amor, carinho e apoio que sempre deram a mim e aos meus sonhos.

Epígrafe

“If anything is worth doing, do it with all your heart”

Buddha

Agradecimentos

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste projeto, seja no trabalho de bancada, seja nas discussões, seja simplesmente me dando o apoio psicológico. Cada um teve uma participação única e fundamental e gostaria de deixar o meu sincero obrigado.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Marcelo e Raquel, por terem me proporcionado tudo que eu sempre quis e precisei, sempre da melhor maneira possível, com muito amor e dedicação. Sem vocês, pouco eu teria conseguido. Vocês são meu exemplo de vida e meus melhores amigos. Amo vocês.

Ao Gui, meu namorado e porto-seguro. Obrigada pela paciência e compreensão ao longo desse mestrado. Você me incentiva a ir mais longe, me apoia quando eu preciso, me ajuda a tomar decisões e me torna uma pessoa melhor. Te amo.

Ao meu irmão e à minha cunhada, Re e Tita, por demonstrarem orgulho e carinho, seja qual for o caminho escolhido. E claro, pelas ideias ótimas de pesquisa de cientista maluco.

À minha família, por todo orgulho incondicional. Obrigada por todo o carinho que sempre tiveram, todos vocês, tios, tias, primos, primas e especialmente, vós e vós, que foram sempre tão amorosos e acreditaram em mim. Um agradecimento ainda mais especial aos meus avós, Abram e Sarah, por tudo que vocês fizeram por mim, principalmente ao me mudar para a graduação.

Aos meus amigos desde o tempo da escola ou da graduação: Lucila Teks, Diana, Ariane, Carol Perê, Maysa Vorti, Eric DS, Igor, Tati e Nati. Vocês tornam a vida mais leve e divertida. Obrigada!

Cada um de vocês, que eu conheci durante esta jornada científica, tiveram impactos enormes em mim, cada participação merece estar aqui devidamente agradecida. Vocês são muito mais do que colegas de trabalho, são uma família muito unida e especial, e fico muito feliz em dividir as alegrias de trabalho e também da vida pessoal com pessoas como vocês. Espero manter essas amizades por muitos e muitos anos. Com certeza este é o laboratório mais agradável e divertido que existe. Torço muito por todos vocês, que tenham muita alegria e sucesso, e que eu possa participar e ajudá-los, da mesma maneira que vocês têm feito por mim. Inúmeros momentos teriam sido bem mais difíceis sem a ajuda e o apoio de vocês.

Agradeço à Professora Mayana Zatz, pelas oportunidades e pela confiança que foi depositada em mim desde a iniciação científica. Obrigada por acreditar na minha dedicação e em meu trabalho e por ter permitido meu crescimento científico em seu laboratório.

À Nati, por ter sido a minha mãe adotiva. Obrigada por ter tido paciência ao me ensinar tantas coisas, pelas ideias, e, claro, pela diversão. Seu carinho e suas preocupações foram realmente de uma mãezona. Você faz falta aqui pertinho.

À Tati, pelos ensinamentos de vida. Obrigada por ter compartilhado suas experiências e por sempre dar boas orientações, profissionais e pessoais.

À Mari, por mostrar sempre o lado bom da vida e da ciência. Seu otimismo é contagiante e torna todos que estão à sua volta melhores. Obrigada também pelas discussões científicas, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em ajudar, sempre.

Ao Eder, por ser um exemplo de dedicação. Sua seriedade de trabalho e de estudo são excepcionais.

Ao Marcos, por ter sido um irmão mais velho. Você é uma das melhores pessoas que eu conheço. Obrigada por tudo, pelas discussões filosóficas, científicas e por ter dado a ideia fundamental deste projeto. Você é um exemplo a ser seguido.

À Mayra, por ter sido a irmã do meio. Eu me diverti com você até quando você não quis (caretas esquisitas à parte), e também vi que você está aí para o que der e vier. Obrigada pela ajuda braçal, pelas discussões e pelas ideias que você deu.

À Amanda, por ser uma amiga e tanto. Já está quase virando amizade de longa data e só tenho a agradecer. Obrigada por todas as conversas, discussões, ideias, perguntas, respostas e toda ajuda mais que você sempre me deu.

À Giu, por ser tão centrada. Momentos de desespero passam em segundos quando você está por perto. Obrigada por me ajudar a desenvolver este projeto e por me ajudar a pensar, principalmente quando eu não conseguia mais.

À Miriam, que em tão pouco tempo nos ensinou tanto. Obrigada por ser uma companhia tão boa e por todos os ensinamentos de bancada que você nos deu. Você é uma excelente pesquisadora e me acrescentou muito.

À Nane, pelas risadas e pelo conhecimento científico. Obrigada por sempre elevar o nível das discussões e estar sempre disposta a ensinar e ajudar.

À Naila, por ser tão carinhosa. Obrigada pela ajuda em experimentos e por todo apoio.

Ao Michel, por trazer tanto conhecimento às nossas reuniões. Obrigada pelas sugestões e também pelas piadas nerds.

À Memel, por sua inteligência e apoio. Obrigada por estar sempre disposta a discutir novas ideias, de todos os cunhos possíveis, e por ter sugestões sempre sensatas e bem pensadas.

À Lu Capelo e ao Roberto Fanga. Obrigada por toda a ajuda em outros projetos, em que eu precisei tanto da ajuda braçal quanto do conhecimento de vocês. Vocês são excelentes professores e, claro, excelentes psicólogos de plantão. Obrigada pelas conversas que tive com vocês em momentos muito decisivos e importantes.

À Gabi, Babi, Inês e ao Thiago, por terem participado de todo este processo.

À Toninha, Roberto e Lilian, por tornarem a organização do laboratório melhor e tornarem as nossas vidas mais fáceis.

Aos Professores Mariz, Maria Rita, Keith e seus alunos, por estarem sempre dispostos a ajudar, seja com o que for preciso.

À Vanessa, Meire, Kátia e Monize, por toda simpatia e ajuda.

Ao pessoal do HOVET, Hugo, Reginaldo, Dra Silvana e Professor Stefano, que permitiram que eu desenvolvesse parte das minhas análises no Hospital Veterinário e me ajudaram em quase todas as quartas-feiras deste último ano.

À Martinha, pelos cortes e pela alegria que anda sempre junto com você.

Ao IPEN, por toda a colaboração. Obrigada, especialmente à Neide, por todo o trabalho e dedicação aos nossos animais.

À Rosi e à Helô, por manterem o biotério sempre em boas condições e nos ajudarem a cuidar dos nossos animais.

À Vivian, à Thaís e a todo o pessoal do canil, por estarem sempre tão animados e dispostos a cuidar dos nossos cães. Vocês são sensacionais.

À Vanessa, Wagner, Luciana e Constância, por toda a paciência do mundo. Vocês são excelentes e indispensáveis.

Ao pessoal da limpeza, da segurança e da portaria, que garantem o nosso conforto e melhoram o nosso ambiente de trabalho.

À FAPESP e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Índice

Resumo	10
Abstract	12
1.Introdução	
1.I Distrofias Musculares Progressivas	13
1.II Desenvolvimento muscular e processos de degeneração e regeneração	18
1.III Modelos Animais	23
1.IV Abordagens terapêuticas para distrofias musculares	
a) Drogas e terapia gênica	25
b) Células-tronco e terapia celular	28
2.Objetivos	36
3.Material e Métodos	37
4.Resultados	
4.I Caracterização das linhagens celulares	50
4.II Padronização dos testes físicos	57
4.III Padronização dos experimentos de imunomodulação	59
4.IV Avaliação do potencial terapêutico de CTAs e pericitos	61
5.Discussão	67
6.Conclusões	71
7.Bibliografia	72
8.Biografia	85

Resumo

As distrofias musculares progressivas (DMP) são um grupo de doenças genéticas hereditárias caracterizadas pela degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum e mais grave de DMP, com prevalência de 1 a cada 3500 a 5000 meninos. Em geral, a perda da ambulação ocorre entre 9 a 12 anos e complicações respiratórias e cardíacas podem levar ao óbito a partir da segunda década. A pesquisa em terapia celular iniciou-se com o objetivo de reverter ou diminuir a progressão do processo distrófico através do repovoamento do músculo com células normais. Atualmente, acredita-se em um benefício terapêutico com base nas propriedades anti-inflamatórias, anti-fibróticas e imunomodulatórias das células tronco adultas (CTA). As CTAs mesenquimais são bastante heterogêneas quanto à sua composição celular o que ocasiona inconsistência de resultados. Por isso, a caracterização e separação de sub-populações através de marcadores específicos e o enriquecimento de culturas de CTA com um subtipo celular de interesse pode aumentar a robustez e o efeito das terapias. Uma dessas subpopulações é o pericito que, ao contrário das CTAs mesenquimais, foi bem descrito quanto à sua localização e função *in vivo*. Além disso, pericitos derivados de tecido adiposo humano aumentaram a sobrevida de camundongos duplo mutantes para distrofina e utrofina (*dko*). Dessa forma, este trabalho pretendeu comparar o potencial terapêutico de CTAs mesenquimais e pericitos de um mesmo tecido adiposo em camundongos *dko*. Conseguimos confirmar o resultado anterior, mostrando que os pericitos tendem a melhorar a sobrevida de animais tratados, sendo ainda melhores do que células mesenquimais, mas a melhora perdura somente durante o tratamento. A sobrevida é maior no começo do tratamento, sugerindo que o quanto antes o tratamento for iniciado, com animais mais jovens e sintomas mais leves, melhor poderá ser o resultado. Outras perguntas a serem pesquisadas na tentativa de melhorar o efeito terapêutico da terapia celular com pericitos são: número de

injeções, quantidade de células a serem injetadas, tempo de tratamento e idade das células “doadoras”.

Abstract

Progressive muscular dystrophies (PMD) are inherited genetic diseases characterized by progressive muscle loss and weakness. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common and aggressive form of PMD, with incidence of 1 in every 3500-5000 boys. In general, patients with DMD are confined to wheelchairs around 9-12 years of age and death occurs due to respiratory and heart dysfunction after the second decade. Cell therapy research at first aimed to recover or slow down the dystrophic process by repopulating the patient's muscle with normal cells. However, nowadays it is believed also that therapeutic benefits occur by the anti-inflammatory, anti-fibrotic and immunomodulation properties of mesenchymal stem cells (MSC). MSC are constituted by an heterogeneous cell population and therefore, cell sorting of the subpopulation cell of interest is being done routinely. By doing this enrichment, the effect can be more robust and powerful. One of the cell populations of interest for research is pericyte, which are cells well defined regarding their *in vivo* function and location, as opposed to MSC. Besides that, pericytes derived from adipose tissue were successful in increasing survival of double knockout mice for dystrophin and utrophin (*dko*). The present work aimed to compare the therapeutic potential of MSC and pericytes derived from the same adipose tissue sample in the *dko* mouse model. We confirmed our previous results, showing that pericytes tend to improve the survival of treated mice, and are even better than MSC from the same source but the trend was statistically significant only during the treatment period. Additionally, we also observed that the survival was better in the beginning of treatment, suggesting that earlier treatment may lead to a better therapeutic effect. In an attempt to increase the therapeutic effect of these procedure other questions to be asked are: the number of injections and number of cells per injection, the duration of the treatment and the "age" of the donor cells.

1. INTRODUÇÃO

I. As Distrofias Musculares Progressivas

As distrofias musculares progressivas (DMP) são um grupo de doenças genéticas hereditárias caracterizadas pela degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Apresentam grande variabilidade clínica quanto à progressão, severidade e idade de início dos sintomas e, além de serem tradicionalmente classificadas em diversos grupos de acordo com a distribuição dos músculos predominantemente afetados (Emery 2002b), hoje são classificadas também de acordo com a base genética causadora da doença.

Várias das DMPs são causadas por mutações no complexo de proteínas associadas à distrofina (DGC). O complexo DGC é considerado essencial para a manutenção da função muscular, pois promove a interação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular. A ausência ou deficiência de uma das proteínas desse complexo causa instabilidade da membrana da célula muscular e estresse mecânico associado à contração, resultando na degeneração progressiva das fibras musculares (Dalkilic & Kunkel 2003).

Serão aqui apresentadas alguns dos tipos mais estudados de distrofias, ilustrando suas variações e detalhando, ao final dessa primeira seção, a distrofia muscular de Duchenne.

As distrofias de cinturas (*Limb-Girdle Muscular Dystrophies – LGMD*) são caracterizadas por uma fraqueza proximal das cinturas dos membros e do tronco (Bansal & Campbell 2004). A sua prevalência estimada é de 1:14000 (Wicklund 2013) e dentre as distrofias são as que apresentam maior variabilidade clínica quanto ao início e a progressão da doença. Já foram mapeados diversos genes relacionados às LGMD, tendo sido identificados 31 loci gênicos até este ano (Nigro & Savarese 2014), algumas formas raras são de herança autossômica dominante, mas a maioria tem herança autossômica recessiva. Grande parte das proteínas codificadas pelos genes que causam LGMD está relacionada ao

complexo glicoprotéico associado à distrofina (Zatz et al. 2000), sendo os principais subgrupos de LGMD as sarcoglicanopatias, calpainopatias e disferlinopatias.

Fig.1: Esquema representativo das diferentes formas de distrofia e os principais grupos musculares envolvidos. A. Duchenne e Becker; B. Emery-Dreifuss; C. Distrofias de cinturas; D. Fascio-escápulo-humeral; E. Distal; F. Óculo-faríngeal. Retirado de Emery, 2002b.

As distrofias congênitas (CMD) são miopatias com herança de caráter autossômico recessivo, causadas por alterações nos genes codificadores da laminina $\alpha 2$ ou integrina $\alpha 7$, proteínas associadas ou integrantes do sarcolema, respectivamente. Outras proteínas que quando defeituosas já foram associadas ao quadro clínico das distrofias congênitas são as glicosiltransferases, o colágeno 6 e a selenoproteína N. Pode ou não ocorrer o envolvimento da capacidade cognitiva. Os sintomas têm início na infância, incluindo a dificuldade na mobilidade devido a contraturas nas juntas e complicações quanto à alimentação e à respiração (Bertini et al. 2011).

A distrofia de Emery-Dreyfuss é um exemplo de DMP que não está associada ao complexo DGC. Esta doença tem início com contraturas dos tendões dos tornozelos, cotovelos e da musculatura cervical posterior. Em seguida observa-se a perda lenta, porém progressiva da musculatura proximal dos membros superiores e distal dos membros posteriores, culminando no comprometimento cardíaco. Essa distrofia é causada por mutações nos genes da emerina e da lamina, proteínas que participam da estrutura do envoltório nuclear (Emery 2002b).

A forma mais comum, e também a mais grave, de DMP é a distrofia muscular de Duchenne (DMD), com prevalência de 1 a cada 5000 meninos (Wicklund 2013). As musculaturas proximais são as predominantemente afetadas e os primeiros sinais clínicos da DMD surgem no começo da infância, como dificuldades para correr e posteriormente para subir escadas, a hipertrofia da panturrilha e problemas posturais. Em geral, a cadeira de rodas se torna necessária no início da adolescência e complicações respiratórias e cardíacas podem levar ao óbito por volta dos vinte anos de idade se não houver suporte ventilatório (Emery 2002b).

A distrofia muscular de Becker (DMB) é cerca de 10 vezes mais rara do que a DMD. Porém, pelo seu fenótipo mais leve e maior sobrevida, a prevalência nos adultos é de 60% a 90% entre os pacientes com DMD (Wicklund 2013). Na DMB os sinais clínicos geralmente iniciam-se após os 12 anos, sendo que alguns pacientes são assintomáticos até a vida adulta.

A localização gênica das alterações causadoras da distrofia muscular de Duchenne foi deduzida e logo em seguida foi confirmada através de estudos de *linkage*. Em seguida, foi feita a identificação do cDNA do gene da DMD (Monaco et al. 1986), a clonagem completa deste cDNA (Koenig et al. 1987) e, neste mesmo ano, Hoffman et al. foram capazes de identificar o defeito bioquímico associado às alterações gênicas e esta proteína encontrada foi chamada de distrofina (Hoffman, Brown, and Kunkel 1987). No início da década de 80 foram

encontrados camundongos com alterações de enzimas séricas, os camundongos *mdx*, modelo animal utilizado em estudos até os dias atuais.

Hoje sabemos, então, que a DMD e a DMB são alélicas e têm herança recessiva ligada ao cromossomo X. São causadas por mutações no gene que codifica a proteína citoesquelética distrofina, localizada em Xp21. O gene da DMD é o maior já descrito no genoma humano e possui algumas isoformas (Blake et al. 2002). A maior isoforma da distrofina codifica para uma proteína com 427 kDa e é expressa no músculo, cérebro e células de Purkinje.

No músculo, a distrofina é responsável por estabilizar o sarcolema (membrana da célula muscular), tendo o seu domínio amino-terminal ancorado na actina do citoesqueleto e o domínio carboxi-terminal no complexo de glicoproteínas do sarcolema. Dessa forma, a distrofina tem um papel central na estabilização de todo o complexo de proteínas da DGC.

Em 60% dos casos de DMD e DMB ocorrem deleções, entre 5-6% as mutações causadoras são duplicações e ocorrem mutações de ponto ou pequenos rearranjos no restante (Koenig et al. 1987). Na DMB a deleção é em fase, ou seja, o quadro de leitura do RNAm é mantido e a proteína é parcialmente funcional, enquanto na DMD a deleção é fora de fase, alterando o quadro de leitura do RNAm e gerando, devido a um códon de parada prematuro, uma proteína truncada que será destruída pela célula. Por isso, quando biópsias de pacientes de DMD são analisadas por *Western Blot* e por imunofluorescência, a distrofina é ausente e na DMB encontra-se em uma quantidade reduzida ou com peso molecular alterado.

Nature Reviews | Drug Discovery

Fig. 2: Representação do complexo de proteínas associadas à distrofina e dos tipos de distrofias relacionados às alterações de cada um dos seus componentes. Retirado de Khurana & Davies, 2003.

II. Desenvolvimento muscular e processos de degeneração e regeneração

A musculatura esquelética é responsável pela locomoção e participa também da sustentação do corpo. Quanto à histologia, em um músculo podem ser observados diversos feixes e nestes, por sua vez, podem ser observadas as fibras musculares. As fibras musculares são formadas por sincícios celulares, ou seja, são células cilíndricas multinucleadas, sendo que os núcleos se localizam na periferia do citoplasma. Em cada fibra são encontradas inúmeras miofibrilas capazes de se contrair (Junqueira & Carneiro, 2008).

Durante o desenvolvimento embrionário, a mesoderme paraxial se segmenta, formando os somitos. Por influência do gradiente de sinais moleculares, a região dorsal dos somitos irá formar o dermomiótomo, que por sua vez, dará origem a derme e ao músculo esquelético. A porção epaxial do miótomo participa da formação dos músculos dorsais do corpo, enquanto a porção hipaxial forma os músculos ventrais. Os músculos dos membros se originam a partir da migração dos progenitores musculares do dermomiótomo (Esner et al. 2006; Gros et al. 2005; Christ & Ordahl 1995). O músculo esquelético adulto é um tecido pós-mitótico, ou seja, depois de diferenciado não sofre mais divisões celulares. Porém, o músculo tem capacidade de regenerar suas fibras danificadas. A fase inicial da regeneração muscular é caracterizada por um processo inflamatório agudo, pela degeneração do tecido danificado, e em seguida pela ativação de novos precursores, as células satélites (Karalaki et al. 2009). As células satélites residem entre a lâmina basal e a membrana das fibras musculares e, além da sua localização anatômica, são tipificadas em humanos pela expressão dos marcadores Pax7 e CD56 (Péault et al. 2007). Normalmente as células satélite permanecem quiescentes e são ativadas em resposta a um trauma muscular. Após a ativação, as células descendentes geradas são chamadas de mioblastos que após alguns ciclos de divisão se fundem às fibras até a diferenciação terminal.

Fig. 3: Esquema representativo do ciclo de degeneração e regeneração sofrido pelas fibras musculares. Segundo Hawke & Garry, 2001.

A diferenciação miogênica é controlada por uma família de fatores regulatórios (MRFs; *myogenic regulatory factor*), que incluem MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 em um curso bem definido temporalmente. Durante o desenvolvimento embrionário, MyoD e Myf5 estão envolvidos no estabelecimento da linhagem muscular esquelética, enquanto miogenina é requerida para a diferenciação terminal dos mioblastos. Juntamente com a ativação do segundo grupo de MRFs (miogenina e MRF4), os genes de miosina de cadeia pesada (MHC) e creatina kinase muscular (MKC) também passam a estar ativos e em seguida, os mioblastos se fundem ao sincício de fibras musculares (Karalaki et al. 2009). Para que este processo ocorra de forma ordenada, é necessário um ambiente propício para promover o processo de miogênese (Zammit et al. 2006) e o balanço entre os fatores pró e anti inflamatórios é essencial para determinar a correta regeneração muscular ou a formação de cicatrizes.

Outras células residentes musculares que participam da regeneração, além das células satélites são as SP (*Side population*), as MDSC (*muscle-derived stem cell*), as PICs (células

intersticiais PW1⁺/Pax7⁻), as FAPs (progenitores fibro-adipogenicos), os mesoangioblastos e as células mio-endoteliais.

As SP foram primeiramente derivadas do músculo de camundongos seguindo o protocolo de derivação das SP de medula óssea (Gussoni et al. 1999). Essas células são marcadas fracamente com o corante Hoechst 33342 e sua capacidade miogênica foi confirmada pelo mesmo grupo quando injetaram células SP via sistêmica em camundongos *mdx*. As SP se localizam no interstício das fibras musculares e por isso são progenitores diferentes das células satélites. Outra evidência para a origem diferente dessas populações foi o sucesso na derivação de progenitores miogênicos a partir de músculos de camundongos *knockouts* para Pax7 (Asakura et al. 2002; Seale et al. 2000).

As MDSC foram selecionadas pela técnica de *pre-plate*, nas quais os progenitores musculares mais iniciais eram aquelas que possuíam uma adesão à placa de cultura mais tardia e eram capazes de ter um longo prazo de proliferação (Qu-Petersen et al. 2002); neste mesmo trabalho foram observadas as propriedades imuno-reativas, de auto-renovação e diferenciação dessas células *in vivo* e comparativamente, são melhores do que os mioblastos.

As PICs também são células derivadas de uma linhagem diferente das células satélites, e essas duas populações estão em números equivalentes no músculo murino. Porém, em camundongos *knockouts* para Pax7, essas células não são funcionais, mostrando que apesar de poderem ser separadas pela ausência deste marcador, ele é importante para a manutenção e diferenciação das PICs (Mitchell et al. 2010). Outro ponto a ser realçado é o fato de que estas células, juntamente com as células satélites, mioendoteliais e mesoangioblastos, além de terem sido estudadas quanto às suas propriedades, tiveram sua localização bem caracterizada por cortes histológicos.

As FAPs permanecem quiescentes no músculo, mas proliferam quando ocorrem danos às fibras. Apesar de não se diferenciarem diretamente, participam da regeneração liberando fatores que estimulam os verdadeiros progenitores (Joe et al. 2010). Através de transplantes heterotópicos foi verificado que o ambiente é capaz de influenciar essas células fortemente, e um ambiente distrófico com inflamação crônica pode ser prejudicial à medida que estimulam essas células para a formação de fibrose ao invés de regeneração tecidual.

As células mioendoteliais co-expressam marcadores miogênicos e endoteliais (CD56, CD34 e CD144). É uma população rara no músculo esquelético humano, representa cerca de 1,5%. Ao serem cultivadas e em seguida transplantadas em camundongos que sofreram lesão muscular, as células mioendoteliais são mais eficientes do que aquelas que possuem apenas marcadores endoteliais (CD56⁻, CD34⁺, CD144⁺) ou do que mioblastos (CD56⁺, CD34⁻, CD144⁻). Zheng et al., 2007, propuseram a existência de uma hierarquia, na qual as células miogênicas seriam derivadas das células endoteliais vasculares.

Os mesoangioblastos foram inicialmente retirados da aorta dorsal de embriões murinos (De Angelis et al. 1999). Essas células puderam se diferenciar em músculo *in vitro* e *in vivo*. Além disso, foi verificado que essas células apresentavam co-expressão de marcadores endoteliais e miogênicos, sugerindo então que os progenitores multipotentes poderiam residir associados aos vasos. Em seguida, este grupo verificou a participação natural das células da aorta dorsal na formação embrionária de tecidos mesodérmicos, como o músculo esquelético (Minasi et al. 2002).

Existem evidências também da participação de células-tronco de outras fontes, a partir da medula óssea e do sangue, para a regeneração do músculo esquelético (Ceafalan et al. 2014).

O músculo normal sofre danificações e remodelamentos após realização de atividades físicas. Porém, no caso do músculo distrófico, a degeneração é contínua e mais acentuada e faz com que a capacidade de proliferação e diferenciação das células precursoras seja gradativamente menor. Isso ocorre pelo extenso número de divisões que as células satélites realizam para tentar repovoar o músculo, o que causa diminuição telomérica e consequente senescência celular (Decary et al. 2000; Mourkioti et al. 2013).

Devido à inflamação crônica presente no músculo dos pacientes distróficos, bem como ao desgaste no reservatório de células precursoras, as alterações histopatológicas no músculo esquelético são graves, com grande presença de infiltrado inflamatório, formação dos tecidos adiposo e conjuntivo, variação grande no calibre das fibras e também, a ocorrência de muitas fibras centro-nucleadas. O rompimento do sarcolema leva à liberação de proteínas citoplasmáticas, e pacientes com DMD e DMB apresentam um aumento de até duas mil vezes nos níveis séricos da enzima creatino-quinase (CK), mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos. Esses valores, contudo, diminuem no sangue com a perda progressiva das fibras musculares (Zatz, 1991).

III. Modelos Animais

Modelos animais que manifestam fenótipos típicos de doenças genéticas humanas são importantes ferramentas para o entendimento de sua patogenicidade e, além disso, são valiosas formas de testar novas abordagens terapêuticas. Dentre as espécies disponíveis para se estudar as distrofias musculares estão o *C. elegans*, o zebrafish, o modelo canino Golden retriever (GRMD – do inglês Golden retriever muscular dystrophy), e os camundongos.

O *C. elegans* e o zebrafish são usados principalmente para validações funcionais de defeitos bioquímicos, enquanto o GRMD e os camundongos são comumente utilizados para testes terapêuticos. A mutação no modelo canino surgiu de forma natural, porém, como os cães não produzem uma prole grande e necessitam de muito espaço e de cuidados especializados, a manutenção é dispendiosa e há poucos grupos que fazem estudos com este modelo.

A utilização de camundongos é vantajosa por que eles proliferam rapidamente, geram um alto número de descendentes e não requerem muito espaço ou cuidados de alto nível de especialização.

A linhagem de camundongos *mdx* (do inglês *murine X-linked muscular dystrophy*) é o modelo animal de DMD mais comumente usado. Apesar de ser um bom modelo genético e bioquímico, este modelo não é muito informativo para testes pré-clínicos, pois são praticamente assintomáticos (Vainzof et al. 2008). Sabendo que os cromossomos murinos possuem sequências teloméricas muito mais longas que os cromossomos humanos (Kipling & Cooke 1990), e que por isso as células poderiam ser levadas a exaustão mais tardiamente, pesquisadores conseguiram agravar o fenótipo de camundongos *mdx* a partir da redução do tamanho telomérico desses camundongos – através de cruzamentos entre as linhagens *mdx* e

mTR^{KO} (linhagem deficiente de telomerase) – mimetizando, portanto, o esgotamento de células-tronco observado em pacientes distróficos (Mourkioti et al. 2013; Sacco et al. 2011).

Já os camundongos duplo-mutantes para utrofina e distrofina, apresentam degeneração do músculo esquelético, necrose e fibrose intersticial, replicando o fenótipo humano da distrofia muscular de Duchenne (Vainzof et al. 2008). Essa linhagem de camundongos foi gerada por dois grupos, de forma independente, com o intuito de verificar a hipótese de que a compensação da distrofina pela utrofina nos camundongos *mdx* poderia ser a responsável por proporcionar o fenótipo mais leve da doença nestes animais (Deconinck et al. 1997; Grady et al. 1997). Observaram que esses camundongos duplo-*knockouts* (serão aqui referenciados sempre como *dko*) quando comparados aos seus irmãos apenas *mdx*, apresentavam alterações histopatológicas graves, deformações esqueléticas, menor peso e tamanho, e ainda, uma expectativa de vida curta. Dessa forma, além de mostrar que a utrofina compensa a falta de distrofina nos *mdx*, geraram uma linhagem de camundongos com um fenótipo interessante para se trabalhar como modelo de DMD.

Estudos recentes confirmaram o rápido esgotamento do reservatório de células-tronco musculares nos animais *dko* (Lu et al. 2014) e também aprofundaram o conhecimento sobre a gravidade das deformações nos tecidos musculoesqueléticos, como osso e cartilagem (Isaac et al. 2013), observações consistentes com as alterações em pacientes com DMD.

IV. Abordagens terapêuticas para o tratamento de distrofias

Apesar de inúmeras alterações genéticas causadoras dos fenótipos distróficos já terem sido identificadas, ainda não existe um tratamento efetivo para esses pacientes. Assim, visando à diminuição da progressão da degeneração muscular, o aumento da expectativa e também da qualidade de vida dos pacientes portadores de distrofias, diversas abordagens terapêuticas vêm sendo estudadas (Nowak & Davies 2004).

a) Drogas e terapia gênica

O benefício do uso de corticoides (anti-inflamatórios derivados de esteroides) para o tratamento da distrofia muscular foi confirmado em 1989 ao observar a melhora da força muscular e do tempo de ambulação de pacientes que receberam a administração dessas drogas (Mendell, 1989). Entre eles estão a prednisona e o deflazacorte, como o único tratamento aprovado e disponível atualmente para os pacientes distróficos (Merlini et al. 2003). Porém, o uso contínuo e prolongado de corticoides traz inúmeros efeitos colaterais como osteoporose, ganho de peso, catarata e, inclusive, fraqueza muscular (Urso 2013). Inúmeras pesquisas vêm tentando encontrar doses que melhorem a relação dos benefícios *versus* efeitos colaterais do uso dos corticoides (Hoffman et al. 2012).

Outro exemplo de uso de drogas sistêmicas que foram pesquisadas como possível terapia para a DMD são os antibióticos aminoglicosídeos, como a gentamicina e a neomicina. A hipótese é que essas drogas poderiam atuar nos ribossomos “ultrapassando” os códons de paradas prematuros. Assim a proteína traduzida, apesar de diminuída, ainda teria alguma funcionalidade, assim como é observado na DMB, dado que as extremidades N e C terminal estarão presentes. Porém, a eficiência da gentamicina é baixa e variável (1 a 10%), pois depende da localização do códon de parada prematuro (Howard et al. 2004). Além disso, a

proporção dos casos de DMD em que existe um códon de parada prematuro no RNAm é bem pequena e alguns dos aminoglicosídeos causam grande toxicidade aos rins e ouvidos (Emery 2002a). Os resultados com este tratamento têm sido inconsistentes e nos estudos com aminoglicosídeos, poucos pacientes com DMD passam a expressar distrofina, em pequena quantidade, e isto não está correlacionado com a melhora clínica (Konieczny et al. 2013; Berardi et al. 2014).

A terapia gênica busca a correção ou a supressão de mutações, utilizando, para isso, técnicas de biologia molecular. As tentativas de expressar uma forma correta do gene da distrofina utilizam vetores virais contendo este gene e em seguida são injetados no músculo. A eficiência e a segurança a longo prazo na utilização de vetores virais adeno-associados (AAV) é bem conhecida (Xiao et al. 1996), porém uma das grandes dificuldades desta técnica é o tamanho do gene da distrofina. Para contornar isso foram usadas mini-distrofinas funcionais, ou seja, formas menores do gene da distrofina que pudessem caber no vetor adeno-associado (Wang et al. 2000). Watchko et al. (2002) obtiveram sucesso ao verificar melhoras funcionais e clínicas de camundongos distróficos ao utilizarem como tratamento AAV carregando o gene da mini-distrofina. Houve também a melhora de parâmetros respiratórios em camundongos *dko* que receberam a distrofina completa por vetores virais injetados intraperitonealmente (Ishizaki et al. 2011). A dificuldade ainda encontrada para utilizar essa forma de tratamento nos pacientes é que não se têm uma forma de administração sistêmica, e o número de injeções requeridas por músculo tornariam essa terapia inviável. Um estudo bem sucedido a partir de mesoangioblastos derivados de iPS de pacientes com LGMD2D, corrigiram essas células geneticamente utilizando vetores virais e posteriormente as transplantaram em modelo murino para distrofia de cinturas, obtendo sucesso na restauração da proteína ausente, bem como da funcionalidade muscular (Tedesco et al. 2012).

A tentativa de super expressar outras proteínas, como a utrofina, proteína homóloga à distrofina, como uma forma de prevenir o processo distrófico (Tinsley et al. 1996) também foi realizada. Entretanto, infelizmente, apesar de serem homólogas, a utrofina não tem a região N terminal tão similar à da distrofina, o que faz com que não se prenda corretamente à actina (Khurana & Davies 2003).

O exon *skipping* também é uma terapia gênica e utiliza oligonucleotídeos antisense desenhados especificamente para a região contendo a mutação. Os oligonucleotídeos se ligam diretamente a esta região no RNA mensageiro imaturo e proporcionam uma excisão da região durante o *splicing* (Lostal et al. 2010; Chamberlain & Chamberlain 2010). A combinação de duas abordagens, gênica e celular, foi realizada com células-tronco de pacientes DMD, que quando corrigidas por exon *skipping* foram capazes de se diferenciar corretamente e expressar distrofina no músculo de camundongos distróficos (Benchouir et al. 2007). Outra droga que vem sendo estudada com o mesmo princípio dos aminoglicosídeos é o Ataluren (ou PTC 124), e alguns testes clínicos envolvendo a sua segurança e eficácia estão em andamento.

MicroRNAs são pequenos RNAs com 21–24 nucleotídeos que regulam a expressão gênica degradando o RNAm alvo ou interferindo na habilidade do ribossomo em traduzir o RNAm alvo. O perfil de miRNAs no músculo poderia ser utilizado não só para o diagnóstico de doenças musculares (Endo et al. 2013), mas também como alvos para terapia. Um recente estudo verificou que o miRNA-486 está enriquecido no músculo normal e deficiente no músculo distrófico. Com diferentes experimentos, Alexander et al. (2014) mostraram que a super expressão do miRNA-486 é capaz de melhorar a estrutura e a funcionalidade em vários grupos musculares, prevenindo a degradação das miofibras e a progressão da doença.

A pesquisa em terapia celular iniciou-se com o objetivo de reverter, ou ao menos estagnar, o processo distrófico com o repovoamento do músculo com células normais (Davies

& Grounds 2006). Esta abordagem terapêutica, bem como as células-tronco, que são as células com as melhores perspectivas dentro desta abordagem para DMD, serão apresentadas no tópico a seguir.

b) Células-tronco e terapia celular

O conceito teórico das células-tronco (CT) surgiu no século 19, quando foram observadas as capacidades de auto-renovação de alguns órgãos (Bianco et al. 2008). O conceito utilizado atualmente foi criado por Caplan em 1991, ao definir essas células como entidades discretas. Caplan e colaboradores obtiveram células capazes de se auto-renovar, isto é, geravam CFU (do inglês *colony forming units*) e tinham potencial de dar origem a outros tipos celulares por diferenciação ao serem transplantados heterotopicamente. Essas características são fundamentais para a renovação tecidual ao longo da vida (Caplan 1991).

Infelizmente, hoje em dia esse conceito é usado de maneira simplista, de forma que são caracterizadas experimentalmente como células-tronco aquelas que ao serem cultivados com meios de indução se diferenciam *in vitro* em adipócitos, osteoblastos e condroblastos.

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com o seu potencial de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes, respectivamente do maior para o menor potencial de diferenciação. Vale reafirmar novamente que são poucos os estudos que fazem essa avaliação por meio de experimentos heterotópicos *in vivo*.

Quanto à origem, existem dois tipos principais de células-tronco: as embrionárias e as adultas. As células-tronco embrionárias são pluripotentes e no Brasil podem ser utilizadas para a pesquisa, de acordo com a lei de Biossegurança, quando retiradas a partir da massa celular interna de blastocistos de óvulos fertilizados em clínicas de reprodução assistida, congelados há mais de 3 anos. Porém, apesar de serem obtidas a partir de embriões que

seriam inviabilizados ainda existem discussões éticas a respeito de sua utilização. As células-tronco pluripotentes induzidas (*induced Pluripotent Stem cells - iPS*) foram criadas na tentativa de se obterem células com maior potencialidade a partir de células adultas (Takahashi & Yamanaka 2006), evitando assim o problema ético das embrionárias. Porém, a segurança de seu uso para a terapia celular ainda é duvidosa visto que para serem obtidas são utilizados vírus e pró-oncogenes durante a transformação da célula adulta, e apesar de alguns estudos procurarem formas de capacitar o uso dessas células para a terapia (Suzuki et al. 2014), elas são em geral usadas como modelos *in vitro* para estudos de doenças que têm difícil acesso ao tecido de interesse, como as doenças neurológicas (Robinton & Daley 2013). A pluripotencialidade das embrionárias e das iPS são comprovadas por ensaios de formação de teratomas em camundongos imunossuprimidos.

As células-tronco adultas (CTAs) são reservatórios naturais de células que têm as funções de manutenção e recuperação tecidual, conservando assim a homeostase do corpo. Já foram encontrados CTAs em diversos tecidos do corpo e dentre os tipos encontrados estão as hematopoéticas, mesenquimais, epiteliais, musculares e neuronais. O transplante de medula óssea é um procedimento extremamente bem consolidado e seu sucesso está fundamentado principalmente no fato do transplante levar ao repovoamento da medula óssea do paciente com células-tronco hematopoéticas. Devido à facilidade de obtenção, inexistência de discussões éticas e potencialidade para um uso futuro em terapia celular, atualmente são mais utilizadas para a pesquisa terapêutica as CTAs hematopoéticas e mesenquimais.

As CTAs hematopoéticas são encontradas na medula óssea, sangue periférico e no sangue do cordão umbilical. Elas não apresentam uma morfologia típica e são cultivadas em suspensão. As CTAs mesenquimais são cultivadas aderidas às placas de cultura, possuem um grande potencial de proliferação e diferenciação e são encontradas na medula óssea, sangue periférico, sangue do cordão umbilical, tecido do cordão umbilical, polpa de dente, músculo,

tecido adiposo, trompa de falópio, entre outros (Secco et al. 2008; Gronthos et al. 2002; Montarras et al. 2005; Zuk et al. 2001; Jazedje et al. 2009).

Por motivos bastante intuitivos em relação à sua capacidade de diferenciação miogênica, as primeiras células transplantadas em modelos distróficos foram os mioblastos, com êxito na restauração da distrofina tanto com mioblastos murinos quanto humanos (Partridge et al. 1989; Moisset et al. 1998; Deasy, Li, and Huard 2004). O entusiasmo com os resultados em camundongos foram suficientes para dar início aos testes clínicos em humanos. Porém, o sucesso não foi repetido e inúmeras explicações surgiram: por se tratar de um tipo celular diferenciado, houve resposta imune do receptor contra os mioblastos transplantados; e ainda, os mioblastos não são capazes de migrar para os sítios de dano muscular, por isso, a administração sistêmica não foi a melhor escolha para o teste (Tremblay & Guerette 1997).

Sacco et al. (2008) mostraram não só que as células satélites são mais eficientes do que mioblastos, como também destacaram a sua grande capacidade proliferativa e regenerativa. Esses pesquisadores injetaram apenas uma célula localmente em um músculo murino e posteriormente, ao rastreá-la por luciferase, encontraram a marcação em um grande número de fibras e também na lâmina basal, local onde residem as células progenitoras de músculo. Entretanto, após a primeira fase de teste clínico, observou-se baixa capacidade de migração dessas células, com pouca restauração de distrofina restrita aos locais de injeção e ainda, que não houve melhora funcional ou clínica nos pacientes (Berardi et al. 2014; Meregalli et al. 2012).

As células CD133⁺ são circulantes do sangue periférico e chamaram a atenção do grupo de pesquisadores que as isolou ao conseguirem restaurar a expressão de distrofina quando injetaram essas células em músculos de camundongos *mdx* (Torrente et al. 2004). Este grupo foi citado acima, a respeito do seu trabalho subsequente, no qual as células CD133⁺ de pacientes distróficos foram corrigidas por terapia gênica e em seguida

transplantadas em camundongos *mdx* imunossuprimidos (Benchouir et al. 2007). A primeira fase de testes clínicos confirmou a segurança dessas células e a segunda fase, com o objetivo de verificar o benefício dessas células está em andamento (Meregalli et al. 2012).

A presença de células-tronco no tecido adiposo (ADSC) já foi bem caracterizada (Zuk et al. 2002) e o potencial miogênico dessas células já foi verificado *in vitro* (Vieira et al. 2008) e *in vivo* (Rodriguez et al. 2005; Vieira et al. 2008; Vieira et al. 2012). A obtenção da gordura subcutânea é uma prática comum em cirurgias plásticas de lipoaspiração. Visto que o tecido adiposo subcutâneo encontra-se em grande quantidade no corpo humano e sua obtenção é fácil e não invasiva o seu uso torna-se interessante para isolamento de células-tronco para a terapia regenerativa (Yarak 2010; Wilson et al. 2011). O tecido adiposo subcutâneo pode ser obtido em menores quantidades a partir de pequenas biópsias, ou mesmo em cirurgias que simplesmente têm acesso a este tecido. Utilizando este material, nosso grupo demonstrou que células-tronco humanas de tecido adiposo (*human Adipose-derived Stromal Cells* - hASCs) quando injetadas em camundongos *SJL* (outro modelo para distrofias tipo cinturas, disferlinopatias), sem imunossupressão, são capazes de atingir o músculo dos animais injetados, expressar proteínas musculares humanas e melhorar o desempenho funcional dos animais (Vieira et al. 2008).

As células-tronco mesenquimais são uma população bastante heterogênea quando não fracionadas a partir da porção estromal. Apesar das CTAs mesenquimais serem bastante usadas, essa característica pode levar a resultados também heterogêneos. Dado que muitos perfis imunofenotípicos celulares são conhecidos, o enriquecimento de determinadas tipos celulares aumenta a homogeneidade da população celular a ser pesquisada e também, ao excluir células indesejadas, pode melhorar a resposta a ser observada nos experimentos. Os métodos tradicionais de separação, como centrifugação por gradiente de densidade, utilizam-se de características físicas das células e por isso não têm uma resolução alta. Atualmente, a

separação celular é principalmente feita por MACS (*magnetic-activated cell sorting*) ou FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) e baseia-se na marcação de antígenos de superfície por anticorpos conjugados com *beads* magnéticos ou *beads* fluorescentes, respectivamente. A técnica de MACS utiliza colunas magnéticas para realizar a separação das células que foram marcadas positivamente, enquanto o FACS é feito por citometria de fluxo. A citometria de fluxo tem maior sensibilidade e especificidade (Zhu & Murthy 2014), porém, causa maior estresse mecânico às células, diminuindo a eficiência na obtenção de células.

Baseado em características das células-tronco, que aderem à placa de cultura, é realizada a técnica de *pre-plate*, de forma a enriquecer determinados tipos de células-tronco dependendo do seu tempo de adesão. Outra forma para selecionar um tipo celular é utilizar um meio de cultura específico, que induz o seu crescimento mais rapidamente do que outros tipos celulares (Zhu & Murthy 2014).

Apesar de inicialmente ter-se acreditado que a diferenciação tecidual das células injetadas era essencial para a recuperação dos animais, hoje acredita-se que as propriedades imunomodulatórias das células-tronco mesenquimais possam ser benéficas. Essa hipótese vem ganhando força a medida que poucos estudos observaram diferenciação final das células injetadas e que por isso, a restauração da distrofina era pequena ou nula. Apesar disso, observou-se um efeito benéfico nos parâmetros fisiológicos dos animais tratados, sugerindo que as células estariam participando da manutenção ou regeneração muscular através da liberação de fatores solúveis, o que é chamado de efeito parácrino (Gharaibeh et al. 2011; English et al. 2010; Singer & Caplan 2011; Kean et al. 2013), e sugere que existam outros mecanismos *in vivo* de ação das células-tronco mesenquimais, como propriedades anti-inflamatórias, anti-fibróticas e imunomodulatórias (Ichim et al. 2010; Jorgensen 2010; Gharaibeh et al. 2011; Pinheiro et al. 2012; Griffin et al. 2013). Outra hipótese sugere que fatores liberados pelas células injetadas estimulariam a angiogênese, o que aumentaria a

disponibilidade de progenitores associados aos vasos, já que acredita-se que as CTA são derivadas destes (Crisan, Huard, et al. 2008; Crisan, Yap, et al. 2008; Dellavalle et al. 2011; Murphy et al. 2013).

Além de terem propriedades imunomodulatórias, as CTA mesenquimais não expressam o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II e têm baixos níveis de expressão de MHC classe I, o que as torna imuno-privilegiadas, pois ao serem transplantadas, podem passar pelo sistema imune sem serem reconhecidas (Le Blanc 2006; English 2013). Mesmo sem possuírem o potencial para diferenciação terminal, o conjunto das outras propriedades as torna úteis para terapia de doenças relacionadas à inflamação. Alguns testes clínicos em reações doador-*versus*-hospedeiro, quando há rejeição de um órgão transplantado, estão em andamento (English & Wood 2013). Nesse sentido, a DMD, sendo uma doença que gera inflamação crônica devido à constante degeneração muscular, permanece sendo um alvo interessante.

Os pericitos são células residentes dos vasos que ficam em torno das células endoteliais, sendo responsáveis pela contratilidade dos vasos e pela regulação da proliferação das células endoteliais. Dentre outros tipos celulares já citados, os pericitos constituem uma população de células de bastante interesse para a sua utilização em terapias devido a sua extensa lista de propriedades (Crisan et al. 2009; Armulik et al. 2011). Os pericitos expressam marcadores endoteliais (CD146, NG2, PDGFR β) de células mesenquimais (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e fosfatase alcalina) e apresentam ausência de marcadores CD31, CD34, CD45, CD144 e fator de von Willebrand (Murray et al. 2014).

Hierarquicamente, supõe-se que os pericitos no organismo adulto sejam derivados dos mesoangioblastos embrionários. E, por sua vez, os pericitos seriam as células que dão origem às CTAs (Cossu & Bianco 2003). Por vezes os termos se confundem, pois o grupo que descreveu os mesoangioblastos embrionários continuam se referindo às células perivasculares

adultas como mesoangioblastos, ao invés de chamá-las de pericitos. Além dos pericitos, residentes de vasos de pequeno calibre, as células da túnica adventícia de vasos maiores também podem ser as precursoras das células mesenquimais (Corselli et al. 2012).

Em 2008, Crisan e colaboradores conseguiram definir uma série de marcadores para os pericitos a partir da imuno-localização em cortes histológicos de diferentes tecidos, como placenta, pâncreas, músculo e tecido adiposo. Isso permitiu separar essas células perivasculares por FACS de acordo com os marcadores CD146+, CD45-, CD34- e CD56- e em seguida caracterizá-las *in vitro*. Sua localização, bem como potencial proliferativo e de diferenciação *in vitro* foram validados por diferentes pesquisadores (Crisan, Yap, et al. 2008; Schugar et al. 2009; Zimmerlin et al. 2010; Park et al. 2011). Em seguida, outro grupo conseguiu observar a participação dessas células na regeneração muscular *in vivo* (Dellavalle et al. 2007), bem como o papel natural dessas células na formação do tecido muscular ao longo do desenvolvimento (Dellavalle et al. 2011). Porém, este grupo se utilizou de outros marcadores (fosfatase alcalina positivo e CD56-), também previamente definidos por imunohistoquímica.

Além do alto potencial de proliferação e diferenciação dos pericitos, também foram observadas as propriedades de imunomodulação. O imuno-privilégio de mesoangioblastos foi verificado *in vitro* através de ensaio de proliferação de linfócitos. Apesar do transplante alogeneico em camundongos ter sido bem sucedido, observou-se que as fibras musculares derivadas dos mesoangioblastos eram mais imunogênicas (Guttinger et al. 2006). A via ativada durante a supressão da proliferação de linfócitos T já foi descrita (English et al. 2013); Da mesma forma, mesoangioblastos de pacientes LGMD que foram reprogramados para células iPS, expandidos, re-diferenciados em mesoangioblastos e corrigidos por terapia gênica ainda foram capazes de manter as propriedades imunomodulatórias (Tedesco et al. 2012).

Recentemente nosso grupo comparou o potencial miogênico de pericitos de diferentes fontes (trompa, endométrio, tecido adiposo e músculo) derivados de uma mesma doadora (Valadares et al. 2014). Apesar de não ter confirmado o potencial miogênico *in vitro* ou *in vivo* dessas células, quando injetadas intraperitonealmente no modelo *dko*, observou-se um aumento significativo na sobrevivência dos animais transplantados apenas nos grupos injetados com pericitos de endométrio ou tecido adiposo. Como não foram encontradas células humanas no tecido destes animais especulou-se que os efeitos poderiam ser decorrentes de fatores imunomodulatórios liberados pelos pericitos. Os experimentos de *microarray* de expressão realizados com essas células sugerem que a via do interferon esteja envolvida, o que confirmaria o efeito parácrino dos pericitos no modelo *dko*.

Os resultados do nosso grupo e os descritos na literatura levantam novos questionamentos, descritos abaixo:

- Células mesenquimais (da porção não fracionada) e pericitos, derivados de um mesmo doador(a), têm o mesmo efeito terapêutico?
- O efeito dos pericitos de tecido adiposo dependem do doador(a), como já foi observado para as células mesenquimais?
- Como as células injetadas estão atuando? Diferenciação tecidual ou imunomodulação?

2. Objetivos

- Caracterizar as células mesenquimais e os pericitos, provenientes de um mesmo tecido, de uma mesma doadora.
- Padronizar os testes físicos adequados ao modelo animal.
- Comparar o potencial terapêutico de células mesenquimais e de pericitos *in vivo* no modelo murino *dko*.
- Avaliar se as células atuam por diferenciação final ou imunomodulação.

3. Material e Métodos

I. Cultura de células

O tecido adiposo foi obtido a partir de cirurgia de histerectomia total abdominal, doado com termo de consentimento autorizado. O isolamento das frações celulares foi realizado de acordo com o protocolo descrito em Valadares et al., 2014, pelo Doutor Marcos Valadares e gentilmente doadas para a realização deste projeto.

O protocolo seguido para a separação por FACS está brevemente descrito a seguir: os tecidos são lavados com PBS com 4% de antibiótico/antimicótico (Gibco) para retirada de sangue e impurezas, depois cortados em pequenos fragmentos com o auxílio de estiletes. Cada grama de tecido é incubado com 3 mL de collagenase tipo IA (Sigma Aldrich) a 1 mg/mL diluída em HBSS (solução estoque) e meio de cultura com 10% de soro fetal bovino (solução de digestão). O processo de digestão dura 40 min e é feito em um agitador à 37°C e 250 RPM. Posteriormente, as amostras são centrifugadas a 688xG por 10 minutos para precipitar as células.

Em seguida, deve-se ressuspender o *pellet* em PBS com 5mM de EDTA até toda a solução estar homogênea. Passar pelo filtro de 70 μ M ou, se necessário, antes passar no de 100 μ M. Centrifugar a 500xG por 5 minutos e ressuspender o precipitado em solução de lise de hemácia (NH_4Cl 1550mM, KHCO_3 100mM, EDTA 10mM, pH 7,4) por 5-10 minutos. Após, adicionar 2X o volume de PBS e passar pelo filtro de 40 μ M. Centrifugar mais uma vez a 500xG por 5 minutos e ressuspender em PBS para fazer a contagem das células. Após a determinação do número de células, ressuspender as células numa concentração máxima de 10^7 células/ml de PBS com 5mM de EDTA e 2% de soro fetal bovino (SFB). Após esta etapa, as células foram divididas em duas partes. A população diretamente colocada em placas de cultura foi chamada de mesenquimal, enquanto a outra metade, referente aos pericitos, ainda foi submetida às seguintes etapas: Incubar por 30 minutos com a quantidade

titulada de cada anticorpo conjugado (CD34, CD45, CD56 e CD146). Lavar novamente as células e colocar no tubo de citometria passando pelo filtro de 35 μ M. Imediatamente antes de passar as amostras no citômetro, incubar com DAPI (5 μ g/mL) para exclusão de células mortas. As células com a marcação de interesse foram separadas da população total e adicionadas na placa de cultura em uma concentração de 2×10^4 células por cm^2 .

A linhagem mesenquimal foi cultivada com meio DMEM-F12 com Glutamax (Gibco) com 20% de SFB (Gibco), 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA - Gibco) e 1% de antibióticos/antimicóticos (Gibco). As linhagens de pericito foram cultivadas em meio propício ao crescimento de células endoteliais, EBM-2 suplementado com SFB, hidrocortisona, hFGF, VEGF, IGF-1, ácido ascórbico, hEGF, CA-1000 e heparina (Lonza). As células são mantidas na placa até atingirem a confluência de 80% e depois transferidas e expandidas em uma nova placa.

II. Caracterização Celular

As células foram caracterizadas de acordo com marcadores específicos de superfície celular, pela multipotencialidade *in vitro*, pela capacidade de formação e sustentação de vasos *in vitro* e pela taxa de crescimento.

Análise cromossômica

A comprovação da ausência de alterações cromossômicas das linhagens celulares foi verificada por MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*), utilizando kits comerciais para a análise das regiões subteloméricas.

Imunofenotipagem

A análise da expressão de proteínas de membrana foi realizada por citometria de fluxo pelo sistema *Guava ExpressPlus*, de acordo com o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*. Assim, foi seguida uma lista usada recorrentemente pelos trabalhos que envolvem células-tronco, como HLA ABC, HLA DR, CD90, CD105, CD34, CD45, CD73. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da BD biosciences.

Taxa de crescimento

A proliferação das linhagens celulares foi medida de acordo com o tempo de *population doubling* das mesmas. A partir de um cultivo inicial de 5000 células por cm², os poços foram contados por 5 dias consecutivos com intervalos de 24 horas. As contagens foram feitas de maneira automática no sistema COUNTESS (Invitrogen) com a utilização do corante tripan blue.

Teste de Senescência

O kit de senescência celular utilizado foi o teste de beta galactosidase (Cell Signaling), no qual as células aderidas à placa de cultura são lavadas com PBS e em seguida são fixadas, lavadas novamente e coradas com solução de coloração de beta-galactosidase. A placa é incubada *overnight* em uma estufa a 37°C e analisadas em microscópio no dia seguinte. A atividade de beta-galactosidase em pH 6 é uma característica reconhecida de células senescentes, que ficam marcadas em azul.

Potencial de diferenciação

A multipotencialidade das linhagens celulares foi confirmada *in vitro* utilizando meios comerciais de indução osteogênica, condrogênica e adipogênica por 21 dias (Invitrogen). As linhagens foram induzidas à diferenciação simultaneamente, todas em duplicatas técnicas. O meio de cultura usado nos poços dos controles experimentais é o meio de proliferação celular já descrito.

O potencial de diferenciação miogênica *in vitro* foi observado cultivando as células em meio DMEM *High Glucose* (Invitrogen) com 2% de *Horse Serum* (Gibco) por 15 dias. A avaliação foi realizada de acordo com os seguintes aspectos: presença de fusão celular e imunofluorescência para a verificação de expressão de distrofina e miosina de cadeia pesada. A imunofluorescência foi realizada conforme descrito em Valadares et al. (2014), nas quais as células são fixadas por 5 minutos em metanol gelado, bloqueadas por 1 hora com solução de bloqueio (10% SFB e 5%BSA diluídos em PBS) e em seguida incubados por 1 hora com os anticorpos primários anti- myosin heavy chain^{2x} feito em camundongo (DHSB - MF20/1:500) e anti- dystrophin feito em coelho (Abcam 15277/1:200). Após 3 lavagens com PBS, as células foram incubadas com os anticorpos secundários contra camundongo (Alexa 488 – Invitrogen/1:400) e coelho (Alexa 594 – Invitrogen/1:400). Em seguida as células foram lavadas mais três vezes e foram incubadas com Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) por 5 minutos para visualização dos núcleos.

Para a diferenciação osteogênica foi utilizado o Alizarin Red S, um derivado da antraquinona, que através de um processo de quelação, forma um complexo Alizarin Red S – Cálcio. Para a coloração, as células são lavadas 2 vezes com PBS, fixadas por 30 minutos com etanol 70%, lavadas 2 vezes com água MilliQ, incubadas por 30 minutos com solução de Alizarin Red 0,2% e lavadas novamente com PBS.

A verificação da diferenciação adipogênica foi feita a partir da incubação das células com *Oil Red*, reconhecido corante de vesículas adipogênicas. Para este procedimento as células são lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, corados por 30 minutos com solução de Oil Red a 0,0036g/ml, seguida de duas lavagens com PBS.

O protocolo de diferenciação condrogênica (Invitrogen) é feito de maneira diferente, pois as células, ao invés de mantidas em monocamada, são colocadas na placa de cultura sob a forma de gotas super concentradas (com aproximadamente 10^5 células por gota de 5ul). No 21º dia as células foram coradas com azul de toluidina, um marcador de matriz extracelular. O que se espera, quando há o potencial, é que as células induzidas se mantenham na conformação semi-esférica, enquanto as células mantidas com o meio de cultura controle, se espalhem em monocamada. Após a diferenciação, as células foram coradas com azul de toluidina 1%, um marcador de matriz extracelular. Para este procedimento as células são lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos, incubadas com o corante por 30 minutos e em seguida lavadas por 3 vezes com PBS.

Potencial miogênico *in vivo*

Nosso experimento piloto consistiu em injetar células humanas localmente no músculo gastrocnêmio esquerdo de um camundongo da linhagem Black/SCID, ou seja, que é naturalmente imunossuprimido, e dessa forma é um controle positivo para nosso anticorpo. O animal foi anestesiado e recebeu 10^5 células diretamente no músculo. Aguardamos cerca de 15 minutos antes de sacrificar o animal e coletar o músculo injetado e o seu contralateral.

No experimento subsequente, foram utilizados novamente animais Black/SCID para o transplante das células em estudo. O protocolo descrito foi baseado em Crisan, 2008. Brevemente: os animais foram anestesiados com xilazina/cetamina e tiveram o músculo

gastrocnêmio direito lesionado com 15ug de carditoxina. Três horas após a lesão os animais receberam uma injeção com 10^5 células por via intraperitoneal ou foram novamente anestesiados e receberam 2×10^4 células por via local (no músculo lesionado). Três semanas depois os animais foram sacrificados e os gastrocnêmios foram coletados e fixados por congelamento em nitrogênio líquido.

Os cortes histológicos foram analisados por imunofluorescência com o seguinte protocolo: após o descongelamento das lâminas, os cortes são fixados por 20 minutos em PFA 4%, lavados 3 vezes com PBS, incubados por 15 minutos em solução de permeabilização (contendo BSA e Triton-X100), bloqueados por 1 hora com solução contendo BSA, SFB e Triton-X100, incubados por 48 horas com o anticorpo primário contra lamina A/C humana (Vector VLP550), lavados novamente 3 vezes com PBS e incubados por uma hora com anticorpo secundário anti-mouse Cy3.

Ensaio de formação de vasos *in vitro*

Está bem estabelecido que os pericitos são células capazes de sustentar a formação de vasos *in vitro* formados pelas células endoteliais. Assim, para comprovar tal capacidade, foi utilizado um protocolo adaptado de (Endothelial cell tube formation assay - Corning), descrito em seguida: O matrigel (Corning, número de catálogo 356234) foi retirado do congelador e colocado a 4°C por aproximadamente uma hora. Foram adicionados 50ul deste por poço de placa de 96. Para retirar todas as possíveis bolhas, a placa passou por um spin em uma centrifuga refrigerada. Em seguida, a placa foi incubada por 30 minutos para polimerização do matrigel. Foram adicionadas 2×10^4 de células endoteliais (Huvec), ou pericito, ou mesenquimal, quando cultivadas isoladamente por poço. Quando foi realizado o co-cultivo, foram colocadas 2×10^4 de Huvec mais $7,5 \times 10^3$ de pericito ou mesenquimal. Três

horas depois já podiam ser observadas as estruturas esperadas. O experimento foi realizado em duplicata e acompanhado por 24 horas.

III. Imunomodulação

Com o intuito de verificar as propriedades imunomodulatórias das células tronco, tentou-se padronizar dois testes: A análise quantitativa do infiltrado inflamatório no músculo, e quantificação das citocinas envolvidas no processo inflamatório. Esta padronização foi feita com o objetivo de observar as diferenças do processo inflamatório entre camundongos *DKO* e *mdx* de modo que, ao final do tratamento, fosse possível avaliar se houve ou não uma melhora na inflamação dos camundongos *DKO* e se isso estaria correlacionado com a melhora clínica. Foram utilizados 5 camundongos *C57/BL6* (6 semanas de idade), 5 *Mdx*^{*C57/BL6*} (6.5 semanas de idade), 5 *Mdx/Utr*^{+/+} (7.5 semanas de idade), 1 *Mdx/Utr*^{+/-} (7.5 semanas de idade), 5 *DKO* (7.5 semanas de idade) e 2 *DKO* mais velhos (12.5 semanas de idade).

O estudo quantitativo do infiltrado inflamatório foi desenhado de forma a obter a população de células do músculo dos camundongos e verificar a expressão de marcadores de superfície celular desta população por citometria de fluxo, por meio dos marcadores CD4 e CD8 (linfócitos), *TOLL like-receptor* (macrófagos ativados), CD11c (células dendríticas), MHC I (células nucleadas), MHC II (células apresentadoras de antígenos – macrófagos, células dendríticas e linfócitos B), CD86 (moléculas co-estimulatórias). Outros tecidos, como sangue, baço, rim e linfonodo dos camundongos também foram analisados. Para evitar coagulação, 50 µl de EDTA a 5% são adicionados às amostras de sangue e em seguida, foram diluídas com PBS até 3ml. Foi utilizado Ficoll-Paque Premium (GE) e centrifugação a 1400rpm por 30 minutos para a separação do plasma e das células mononucleares a serem analisadas por citometria de fluxo. Timo, baço e linfonodo foram apenas macerados sobre

filtros de separação celular (Cell Strainer, 0.4um, BD Science) com auxílio de uma seringa e constante lavagem do filtro com PBS. O músculo quadríceps direito foi utilizado para citometria, tendo sido submetido à digestão com 1 ml de colagenase IA concentração de 1mg/ml (Sigma) por 1h15m em agitador a 250rpm a 4°C, e em seguida foi macerado como os outros tecidos. A quantidade determinada de células foi incubada com os anticorpos titulados (Biolegend) por 1 hora em temperatura ambiente, seguidas de lavagem com PBS, centrifugação a 500rcf por 5min e ressuspendidas em PBS novamente para serem lidas no citômetro de fluxo.

Os fatores TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa, envolvido na ativação de células e substâncias do sistema imune), IFN- γ (Interferon gama, responsável pela ativação de macrófagos), IL-2 (Interleucina 2, ativação autócrina de células CD4), IL-10 (Interleucina 10, secretada por macrófago supressor), IL-12 (Interleucina 12, ativadora de células *natural killers*) e TGF- β (Fator de crescimento transformante beta, participa da inflamação, além da regulação da matriz extracelular) são citocinas que participam do processo inflamatório e foram quantificadas pela técnica Elisa Array (MagPix, Luminex – BioRad) a partir do sangue e do meio condicionado do músculo dos camundongos. Como é possível que o VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) atue protegendo o músculo distrófico pela sua capacidade angiogênica e pró-regenerativa ele também foi quantificado.

Resumidamente, para a análise do perfil de citocinas em cada tecido murino, os músculos gastrocnêmios foram incubados com alpha-MEM (Gibco) por 2 horas a 4°C no agitador a 250 rpm, de maneira a fazer um meio condicionado, e em seguida centrifugados por 30min em velocidade máxima para a obtenção das proteínas solúveis presentes nesse músculo.

Além disso, para o controle positivo de imunomodulação, realizou-se um tratamento com anti-inflamatório prednisona. Foram obtidos 16 animais afetados que foram divididos

em dois grupos aleatoriamente, de forma a balancear o número de fêmeas e machos e as idades nos dois grupos. Esse procedimento foi baseado no trabalho de Keeling et al. (2007), no qual um grupo foi tratado com predinisona (Medley) a 5mg/kg e o grupo usado como controle experimental, administrou-se água. A via de administração foi oral por gavagem, duas vezes por semana em dias consecutivos, durante um mês e meio. Os animais foram pesados e medidos semanalmente.

IV. Grupos Experimentais

O modelo murino utilizado foi o $Utrn^{tm1Jrs} Dmd^{mdx}/J$ (*The Jacksons Laboratory*), descrito no item acima “*Modelos Animais*”.

Os experimentos foram feitos com quatro grupos de camundongos:

- grupo controle injetado com solução salina (HBSS) n=23 (12 machos e 11 fêmeas)
- grupo experimental injetado com pericito A24F n=21 (11 machos e 10 fêmeas)
- grupo experimental injetado com mesenquimal A24SF n=22 (11 machos e 11 fêmeas)
- grupo experimental injetado com pericitos A19F (linhagem com a qual o trabalho anterior obteve sucesso). Entretanto, o transplante de células foi realizado por apenas 4 vezes; n=20 (11 machos e 9 fêmeas)

A sigla de cada linhagem é referente à sua origem. “A” para definir que as células foram derivadas de tecido adiposo. O número refere-se à doadora; assim, todo o material de número 24 é originado de uma mesma pessoa. Ao final da sigla, “F” foi usado para designar células fracionadas (separadas) da população total, ou seja, os pericitos, enquanto “SF” é para referir-se a fração estromal, ou seja, as células mesenquimais.

Cada animal do grupo experimental recebeu uma injeção sistêmica por via intraperitoneal com 1×10^6 células em 0.1ml de HBSS (Hank's Buffered Salt Solution,

GIBCO). Os animais foram injetados semanalmente por 2 meses a partir da oitava semana de vida do animal. Os animais do grupo veículo receberam, pelo mesmo regime de injeções, apenas HBSS.

V. Genotipagem

O modelo murino utilizado é o *Utrn*^{*tm1Jrs*} *Dmd*^{*mdx*}/*J* (*The Jacksons Laboratory*), um duplo mutante para os genes codificadores das proteínas musculares utrofina e distrofina. Todos os animais dessa linhagem são homozigotos afetados para a distrofina, ou seja, são *mdx*. O nome *Utrn*^{*tm1Jrs*} *Dmd*^{*mdx*}/*J* foi abreviado e aqui é sempre referido como *dko*.

É necessário ressaltar que as padronizações foram realizadas comparando animais *dko* com irmãos *mdx*, e não com animais normais, como os *C57/BL6* devido o genótipo não isogênico da linhagem *dko* adquirida. Assim, os animais mais próximos aos *dko* estudados, seriam os irmãos *mdx*, que apesar de serem distróficos, possuem um fenótipo leve da doença.

Os camundongos *dko* são mantidos em heterozigose para a utrofina. Esses animais são genotipados para o gene codificador da utrofina utilizando a técnica de PCR em uma máquina de PCR quantitativo em tempo real (Light Cycler, Roche). Pela análise das curvas de dissociação podemos saber quais animais são homozigotos para o alelo mutado, heterozigotos ou homozigotos para o alelo selvagem, pois a dissociação do amplificado do gene mutado se dá em torno de 90°C e para o alelo selvagem em torno de 86°C (Fig 4).

Fig. 4: Exemplo da curva de dissociação observada para cada um dos genótipos possíveis para o gene da utrofina.

VI. Avaliação terapêutica

A avaliação do benefício da terapia celular foi realizada pelas avaliações físicas e da sobrevida. Todos estes testes foram padronizados inicialmente com animais dko (aproximadamente $n=60$) e irmãos *mdx* ($n=20$) sem qualquer tratamento, a fim de avaliar a capacidade dos testes em distinguir clinicamente grupos de animais fenotipicamente diferentes.

VII. Avaliação Física

Esteira: O teste da esteira foi realizado em declive com angulação máxima (por volta de 45 graus) em um total de 10 minutos, iniciando com velocidade de 3mts/min e aumento 3mts/min a cada minuto completado. O estímulo de choque ao fundo da esteira estava em nível mínimo, apenas para garantir que os animais não se acomodassem àquele espaço. Ao ficar encostado no fundo da esteira, no estímulo de choque, o animal é retirado, recolocado em sua gaiola e seu tempo de corrida anotado.

Radiografia: Em colaboração com o Hospital Veterinário da USP, os animais foram radiografados. Para tanto, os camundongos são sedados com xilazina (Agener Uniao) e cetamina (Syntec), diluídos em uma mistura a 0,16% e 0,83%, respectivamente, e são presos aos cassetes com fitas adesivas. Após digitalização das radiografias, a curvatura da coluna é

analisada e são calculados o comprimento e a distância linear da região torácica com o software RadiAnti DICOM Viewer 1.8.4. Com essas medidas é feito o cálculo da razão distância linear/comprimento (Lima et al. 2010), sendo a medida linear a menor distância entre a primeira e a última vértebra que possui costela, e o comprimento a medida de toda a curvatura da coluna entre essas mesmas vértebras (Fig 5).

Fig. 5: Exemplo de radiografia para observação da cifose observada em animais *dko* e seus irmão *mdx*.

Os parâmetros da esteira e da radiografia foram avaliados no início do tratamento (por volta da oitava semana de vida) e ao final do tratamento (por volta da décima sexta semana de vida).

Peso e sobrevivida: O peso foi medido semanalmente e o tempo de sobrevivida desses animais também foi acompanhado.

VIII. Análises estatísticas

O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5. As curvas de sobrevivida foram comparadas globalmente pelos testes Log-rank (Mantel-Cox) e Logrank-trend. Quando comparadas duas a duas, os testes aplicados eram o Log-rank (Mantel-Cox) e Geham-Breslow-Wilcoxon. As curvas de peso foram comparadas pelo teste One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Tukey. As médias de tempo nas corridas em esteira

foram comparadas utilizando o teste Mann-Whitney. Os valores foram considerados significativos com $P < 0,05$.

4. Resultados

I. Caracterização das linhagens celulares

Todas as caracterizações das linhagens celulares usadas foram feitas por volta da passagem 8, escolhida para a realização das injeções, pois nela a expansão já seria suficiente para obter a quantidade de células necessárias para todo o tratamento dos animais.

A ausência de duplicações e deleções foi confirmada por MLPA.

A taxa de crescimento foi avaliada por seis dias consecutivos com intervalos de 24 horas entre cada contagem e pode ser observado na figura 6. O número inicial de células foi o mesmo para todas as linhagens. As linhagens pareadas de pericitos e mesenquimal tiveram taxas de crescimento semelhantes, com duplicação da população a cada, aproximadamente, 48 horas. Já a linhagem de pericitos A19F não duplicou ao longo do tempo analisado.

Fig. 6: Taxa de crescimento celular de cada linhagem em passagem 8; SF – população mesenquimal; F – População de pericitos.

Com estes resultados, e sabendo que a linhagem de pericito A19F já havia sido bastante expandida (mas ainda assim mostrou resultados positivos no trabalho anterior), questionou-se a possibilidade dessas células estarem entrando em senescência celular, devido

ao seu alto número de divisões. Para isso, foi realizado o teste de senescência celular, que por meio da atividade de beta-galactosidase em pH6, cora em azul as células que estão passando pelo processo de senescência. Porém, os testes da beta galactosidase não indicaram qualquer senescência celular na passagem escolhida (Fig. 7). Entretanto, na prática tivemos dificuldade em expandir as células da linhagem A19F por mais tempo e por isso foram realizadas menos injeções do que o previsto (apenas 4 de 8). Essa dificuldade ocorreu tanto pelo tempo nas duplicações populacionais, como também pela observação de células entrando em autofagia e apoptose. Isso demonstra que o kit para avaliar senescência pode não ter sido eficiente em sua marcação, uma vez que os outros parâmetros evidenciaram o desgaste e o envelhecimento da linhagem A19F.

Fig. 7: Teste de senescência celular utilizando kit de beta-galactosidase, com ausência da marcação azul que indicaria células senescentes.

A imunofenotipagem das linhagem celulares revelou que a linhagem mesenquimal A24SF foi bem homogênea para os marcadores mesenquimais (negativos para CD34, CD45, HLA DR, CD31; positivos para CD29, CD90, CD73, HLA ABC, CD44, CD105). As linhagens de pericito também se mostraram bastante consistentes com os marcadores mesenquimais, exceto pelo CD90. O marcador CD56 foi utilizados no FACs para seleção negativa das células que apresentassem esse epítipo; dessa forma foram excluídos os

progenitores musculares da população de pericitos e, tanto nessas, quanto na linhagem mesenquimal, essa subpopulação pareceu se manter em baixas quantidades. O marcador CD146, utilizado no *sorting* para a separação positiva de pericitos foi analisado e, mesmo após um longo tempo de cultura, apenas nas linhagens perivasculares A19F e A24F, essa população mostrou-se enriquecida (tabela 1).

É sabido que os marcadores podem mudar ao longo da cultura (Murray et al. 2014; Lv et al. 2014; Hagmann et al. 2013), seja pelo crescimento preferencial de uma subpopulação, seja por fatores externos como o meio de cultura utilizado que pode induzir a mudança de expressão de marcadores, e por isso, torna-se tão importante a realização do *sorting* com o material ainda fresco. Quanto ao CD146, existem discordâncias quanto à perda ou não deste marcador (Crisan, Yap, et al. 2008; Blocki et al. 2013), mas no presente trabalho foi constatado que este marcador permanece presente mesmo após o cultivo celular.

Tabela 1: Imunofenotipagem por citometria de fluxo.

	A24SF	A24F	A19F
CD34	0,0%	2,1%	3,7%
CD29	99,0%	99,0%	100,0%
CD45	3,4%	2,7%	2,7%
HLA ABC	97,3%	87,0%	90,0%
CD44	99,3%	99,6%	99,0%
HLA DR	1,6%	2,7%	0,8%
CD31	0,0%	1,9%	1,8%
CD117	2,9%	2,4%	3,8%
CD90	99,0%	49,3%	29,3%
CD13	98,5%	100,0%	99,9%
CD105	100,0%	97,8%	99,8%
CD73	99,0%	100,0%	99,7%
CD146	40,6%	75,0%	93,0%
CD56	2,6%	4,0%	4,6%

Quanto às diferenciações *in vitro*, a linhagem perivascular A24F não apresentou potencial para se diferenciar em adipócitos, porém, teve grande capacidade em diferenciar-se

em osteoblastos, com uma produção grande de matriz de cálcio. Quanto à formação de condroblastos, permaneceu na conformação mesmo com o meio de cultura controle. A linhagem mesenquimal A24SF, mesmo apresentando um aspecto pior ao ser cultivada com meio de indução adipogênico, manteve o potencial de diferenciação como pode ser constatado pela presença de vesículas refringentes marcadas por *Oil Red*. Foi capaz também de diferenciar-se em osteoblastos e condroblastos, mas ao contrário dos pericitos, com o meio controle observou-se uma tendência das células perderem sua conformação circular e se espalharam pela placa de cultura (Fig. 8).

As células foram também diferenciadas *in vitro* com meio de cultura miogênico. Após 15 dias de cultivo nessas condições, foi feita uma imunofluorescência utilizando anticorpos para distrofina e miosina de cadeia pesada, marcadores finais da diferenciação miogênica. Não houve marcação com nenhum dos anticorpos e também não foram identificadas fusões celulares.

Fig. 8: Diferenciações adipo, osteo e condrogênicas *in vitro*. Pericitos A24F não foram capazes de diferenciar-se em adipócitos e células mesenquimais A24SF se diferenciaram nas três linhagens.

O ensaio de formação de vaso *in vitro* foi escolhido para fazer a avaliação do potencial angiogênico das células estudadas. Com base na demonstração dessa característica, conseguimos observar a formação de vasos utilizando células endoteliais comerciais como controle positivo (Huvec) e dos pericitos, e a ausência de qualquer formação utilizando a

linhagem mesenquimal (Fig. 9). Dessa forma, demonstramos que os pericitos A24F possuem capacidade angiogênica *in vitro*. A capacidade angiogênica de pericitos não está descrita na literatura.

Fig. 9: Formação de vasos *in vitro* após 3 horas de cultivo. As Huvecs e os pericitos formaram corretamente as estruturas, bem como os co-cultivos de Huvec com pericito ou mesenquimal. A única linhagem que teve ausência de qualquer formação de vasos foi a linhagem mesenquimal cultivada individualmente.

Foi realizada também a formação de vasos *in vitro* a partir do co-cultivo de Huvec e pericitos. Isso por que foi demonstrada a capacidade dos pericitos em manter as estruturas de vasos das huvec *in vitro* por mais tempo (Blocki et al. 2013). Porém, a sustentação das Huvecs pelos pericitos não foi confirmada, pois quando analisadas após 24 horas (Fig. 10), apenas as Huvecs sozinhas e os pericitos sozinhos ainda possuíam uma conformação comparável aos vasos vistos previamente após 3 horas de cultura. Esse dado indica ainda que a combinação do co-cultivo pode não ter sido boa nem para os pericitos e nem para as

Huvecs, já que individualmente elas mantiveram a formação de vasos durante o tempo analisado.

Fig. 10: Análise da formação de vasos *in vitro* após 24 horas de cultivo. Aumento de 5x.

Os experimentos *in vitro*, apesar de serem bem diferentes do ambiente *in vivo*, indicam que essas células possuem potencial para se diferenciarem em outros tecidos.

O potencial miogênico foi o único a ser avaliado *in vivo*. No experimento piloto, foram injetadas células diretamente no músculo de camundongos imunossuprimidos e após 15 minutos o animal foi sacrificado. Esse foi o controle positivo para o nosso anticorpo da imunofluorescência, pois haveria a garantia de que as células não seriam rejeitadas ou perdidas. Foi observado um rastro de células positivamente marcadas (ANEXO I). Pelo curto período em que as células ficaram no músculo, elas não se integrariam às fibras musculares e, de acordo com o esperado, as células não foram co-marcadas com núcleos das fibras musculares. Não houve marcação no músculo contra-lateral não injetado.

Porém, quando avaliamos os camundongos que foram lesionados com cardiotoxina, transplantados com células (pericitos, mesenquimais ou mioblastos comerciais) por via local ou intraperitoneal e foram aguardadas 3 semanas para a regeneração tecidual, não foram encontradas células nos gastrocnêmios injetados. Foram encontradas apenas algumas marcações inespecíficas e não coincidentes com núcleos. O mioblasto foi usado com o intuito

de ser o controle positivo da imunofluorescência, mas já foram relatados problemas quanto a sua eficiência de diferenciação pós-transplante (Tremblay & Guerette 1997).

II. Padronização dos testes físicos

Inicialmente foi proposto que os camundongos fossem submetidos aos testes de Grip Strength System (força muscular), deambulação (força muscular) e esteira (resistência física). Porém, outro projeto de pesquisa do grupo mostrou que o teste do Grip e de deambulação não foram capazes de diferenciar animais afetados e não afetados, apesar dos fenótipos serem evidentemente diferentes.

Desta maneira, pela necessidade de novos testes para análise do sucesso da terapia celular, foram padronizados experimentos que pudessem evidenciar as diferenças clínicas de animais duplo mutantes *versus* animais irmãos apenas *mdx*. Para tais testes físicos, foram utilizados 20 animais *mdx* e 56 animais *dko*.

As diferenças entre os animais *dko* e seus irmãos *mdx* foram estatisticamente significativas, evidenciando quantitativamente os fenótipos observados. A grande diferença de desempenho na corrida em esteira pode ser observada na figura 11.

Fig. 11: Resultados da padronização das corridas em esteira. Os animais foram submetidos a 2 corridas, nas idades que foram realizados nos tratamentos (oitava semana e na décima sexta semana de vida).

Outro teste, com o mesmo objetivo de padronização foi realizado a partir de radiografias dos animais estudados. A razão da medida linear/comprimento da região torácica está inversamente relacionada ao grau da doença, isto é, valores próximos de 1 são animais que não apresentam cifose. Pela radiografia de animais afetados e normais para o gene da utrofina, as razões analisadas são significativamente diferentes (Fig. 12).

Fig. 12: Comparação das razões medida linear/comprimento das regiões torácicas de animais afetados e normais, nas datas que foram utilizadas para o tratamento com células, na oitava semana de vida e na décima sexta semana de vida.

O peso entre machos e fêmeas foi significativamente diferente, entre os animais *mdx* e também entre os animais *dko*. Por isso, foi decidido que para a avaliação do peso os animais seriam comparados separando-os pelo sexo. Para a sobrevivência, os valores também foram significativamente diferentes entre animais duplo mutantes e *mdx* (Fig. 13).

(a)

(b)

Fig. 13: Avaliação do peso (a) e da sobrevivência (b) dos animais *dko* e irmãos *mdx* ao longo do tempo.

III. Padronização dos experimentos de imunomodulação

Referente à quantificação de células inflamatórias, em cada um dos tecidos analisados por citometria de fluxo, não foi observada qualquer diferença inter grupos, e verificamos também que a variabilidade foi muito grande intra grupos (Anexo II).

Já na padronização do perfil de citocinas do músculo das várias linhagens de camundongos, das 23 citocinas possíveis de serem analisadas pelo kit, 4 citocinas (IL2, IL3, IL9 e IL10) não foram identificadas em nenhum animal, apesar da sensibilidade de detecção

do kit ser bem alta. Para algumas amostras houve um desvio alto nas duplicatas experimentais, bem como uma grande variabilidade entre os indivíduos de um mesmo grupo. As únicas citocinas que conseguiram evidenciar a diferença de inflamação entre animais normais e afetados, mas não no grau de severidade dos afetados, foram a IL6 e a IL12. As outras não apresentaram um padrão evidente entre grupos ou ainda, poucos animais apresentaram algum nível dessas citocinas (Anexo III).

Os resultados obtidos nos experimentos pilotos evidenciaram a grande variabilidade dos animais *dko* estudados, o que já era esperado. Porém, em linhagens isogênicas e sem variações fenotípicas, como os camundongos *C57/BL6* e *mdx* avaliados, a quantidade de células do sistema imune e também a quantificação das citocinas foram altamente variáveis, com presença, por vezes de citocinas inflamatórias em músculos fenotipicamente normais e não afetados pela distrofia. Por isso, a análise do potencial imunomodulatório *in vivo* dessas células em animais tratados não traria resultados confiáveis.

O fato de não termos conseguido separar grupos com genótipos e fenótipos diferentes de acordo com o padrão imunológico não permitiu responder essa pergunta, que era um dos objetivos dessa pesquisa.

Outro problema para a realização destes experimentos envolvendo a imunomodulação é a ausência de um controle positivo robusto, pois os animais tratados com corticoides morreram precocemente, da mesma maneira que os animais não tratados, resultado já descrito na literatura (Sali, 2012). Dessa forma, como nossa hipótese era verificar se o efeito imunomodulatório das células seria benéfico o suficiente para melhorar a qualidade de vida dos animais experimentais, novamente ficamos sem parâmetros ao observar que nem mesmo um potente imunossupressor como a prednisona foi eficaz para tal propósito.

IV. Avaliação do potencial terapêutico de CTAs e pericitos

Os parâmetros utilizados para verificar se houve melhora clínica dos camundongos tratados, radiografia, esteira e peso, mostraram resultados variados.

Quanto às radiografias (Fig. 14), não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle. A variável analisada, cifose, era considerada a mais difícil de ser recuperada com o tratamento, pois envolve alterações ósseas graves. De fato, os tratamentos não foram suficientes para reverter esse fenótipo.

Fig. 14: Média do grau de cifose nos grupos veículo (HBSS) e tratados com pericito (A24F) e CTA mesenquimal (A24SF), pré e pós tratamento.

No teste da esteira também não foi observada a melhora dos animais tratados em relação ao grupo controle (Fig. 15). Esses testes indicam, em conjunto, que não houve um incremento da força e da resistência muscular, associados a manutenção do esqueleto ósseo e ao tempo de atividade intensa.

Fig. 15: Média do tempo de corrida nos grupos veículo (HBSS) e tratados com pericito (A24F) e CTA mesenquimal (A24SF), pré e pós tratamento.

O peso dos animais foi acompanhado por cerca de 20 semanas, tendo início uma semana antes do tratamento, até a sua morte. Após 24 semanas de vida, eram poucos os animais vivos, e caso só houvesse um representante do grupo, ele não era mais acompanhado para este parâmetro.

O resultado das curvas de acompanhamento do peso foi contraditório. Em nenhum dos dois conjuntos de dados houve diferença entre pericitos e HBSS. Porém, nos machos foi observado um ganho de peso dos animais tratados com células mesenquimais em comparação ao grupo veículo. Já para as fêmeas houve o oposto, o grupo tratado com as mesenquimais foi significativamente mais leve do que o grupo HBSS (Fig. 16).

(a)

(b)

Fig. 16: Média de peso dos animais acompanhados semanalmente: machos (a) e fêmeas (b) dos três grupos de tratamento.

Nosso grupo observou, no trabalho anterior, aumento da sobrevida ao tratar os animais *dko* com linhagem de pericito de tecido adiposo A19F. No desenvolvimento desta pesquisa, utilizamos esta mesma linhagem de forma a validar os resultados prévios e também com o intuito de usá-las como controle positivo. Infelizmente, como já foi explicado, enfrentamos problemas relacionados à senescência ao continuar expandindo essas células. Por isso, o tratamento foi realizado por apenas 4 semanas, e imaginamos que talvez este grupo pudesse ser utilizado para responder a seguinte pergunta: menos injeções são suficientes para se observar um benefício terapêutico?

Neste grupo, todos os testes também foram realizados por volta da 8^a e 16^a semanas de vida. Pode ser observado que não houve uma melhora evidente em comparação com o grupo HBSS na esteira, radiografia ou peso (Fig. 17). Houve uma perda de peso significativa das fêmeas tratadas com A19F em relação às fêmeas tratadas com HBSS.

Fig. 17: Avaliações terapêuticas do tratamento com a linhagem de pericitos A19F por 4 semanas. Os parâmetros avaliados: esteira (a), radiografia (b), e peso (c) não foram diferentes do grupo veículo após o tratamento.

As curvas de sobrevida foram tabuladas de duas formas: a primeira análise considerou a sobrevida total dos animais e a segunda análise a sobrevida apenas durante o tempo de tratamento (Fig. 18). O dia zero é sempre o início do tratamento. Dessa forma, pudemos verificar se houve alguma diferença entre os períodos com e sem transplante de células.

(a)

(b)

Fig. 18: Sobrevida dos animais tratados por 8 semanas com pericito A24F, mesenquimal A24SF, HBSS e animais tratados por 4 semanas com A19F. Em (a) estão os dados de sobrevida total dos animais e em (b) a sobrevida apenas durante o tratamento. Animais que não haviam morrido no dia da contagem são considerados (chamados de dados censurados).

Durante o tempo total de tratamento não houve diferença entre as curvas, mas com o término do tratamento a queda no percentual de sobreviventes tornou-se mais acentuada, e o encontro das curvas por volta do 100º dia diminui o poder estatístico da análise. Já se considerarmos apenas o período de tratamento, não houve diferença no teste Logrank, mas

houve tendência significativa pelo teste Logrank-trend. Este teste confirma que os animais que receberam pericitos A24F possuem melhor sobrevida em relação àqueles que receberam mesenquimais A24SF e, por sua vez, são melhores do que o grupo HBSS.

5. Discussão

Apesar de ter sido observada uma clara tendência (confirmada pelo teste Logrank-trend) do aumento da expectativa de vida dos animais tratados com o pericito A24F, não observamos significância estatística do teste de maior poder (Logrank). Em geral, o primeiro questionamento que surge sobre a análise estatística é o número amostral. Entretanto, pelo fato dos animais apresentarem variabilidade clínica da doença, utilizamos grupos grandes, de 20 animais, número muito maior do que em geral é observado nos artigos publicados. Isso sugere que o real efeito dessas células foi pequeno no desenho experimental que utilizamos.

A próxima pergunta então seria de como poderíamos aumentar o efeito terapêutico dos pericitos. O primeiro ponto a ser colocado em questão é o fato de terem sido realizados transplantes xenogênicos, ou seja, transplante de células humanas em camundongos sem imunossupressão o que pode diminuir o efeito das células por estas estarem sujeitas à rejeição. Por outro lado, sabe-se que drogas imunossupressoras tem efeito clínico benéfico (Davies & Grounds 2006) e por isso se for realizada terapia celular em animais imunossuprimidos, geneticamente ou com uso de drogas, torna-se difícil distinguir se o efeito terapêutico foi devido a terapia celular ou simplesmente da ablação do sistema imune. Além disso, como se acredita que as células-tronco tenham características imuno-modulatórias esse parâmetro não poderá ser avaliado se os animais forem imunossuprimidos. Outra possibilidade para evitar rejeição seria utilizar células murinas, mas como os animais *dko* não são isogênicos, o transplante seria alogênico e ainda poderia haver uma resposta imune contra as células injetadas. Existem evidências de incompatibilidade de sistema imune entre algumas espécies. Isso diminuiria a rejeição em transplantes xenogênicos (Le Blanc 2006), mas também diminuiria o efeito imunomodulatório das CTAs. Uma outra alternativa seria a utilização de camundongos “humanizados” (Rongvaux et al. 2014), em que há a substituição

dos componentes do sistema imune inato e adquirido de murinos por humanos. De uma maneira mais simplificada, para que possa ser verificado todo o potencial das células transplantadas em camundongos, o ideal é que se utilizassem animais isogênicos com fenótipo grave e CTAs derivadas de camundongos com o mesmo *background* dos animais que serão tratados.

O segundo ponto a ser discutido com o intuito de melhorar o efeito clínico baseia-se no protocolo de injeções nos seguintes aspectos: a) frequência de injeções; b) manutenção do tratamento até o final da vida; c) número de células por injeção; d) início do tratamento com animais mais jovens; e) obtenção de células de doadores mais jovens; f) derivação de células a partir de amostras maiores de tecido adiposo.

Observamos que a maior diferença na sobrevida dos animais tratados com pericitos A24F se dá no início e durante o tratamento. Isso pode ser explicado por duas hipóteses: no início do tratamento, os animais estão mais jovens e com sintomas mais leves, assim, como no questionamento anterior, talvez seja importante dar início ao tratamento o mais cedo possível; além disso, enquanto os animais estavam sendo injetados os resultados de sobrevida foram melhores, por isso, investigações mais profundas sobre a duração do tratamento, também são importantes.

O terceiro ponto a ser ponderado é se existe a heterogeneidade dos pericitos, como foi verificado nas CTAs. Apesar de termos confirmado o resultado anterior utilizando pericitos de tecido adiposo de outra doadora, já foi mostrado que existem subpopulações diferentes de pericitos (Birbrair et al. 2013; Birbrair et al. 2014): uma população com potencial miogênico e angiogênico e outra com potencial de formação de fibrose. Além disso, mostrou-se que o ambiente muscular que receberá as células também é importante, pois quanto mais velho e lesionado, pior a eficiência das células transplantadas (Birbrair et al. 2013; Lu et al. 2014). Tanto o potencial miogênico quanto o angiogênico são de interesse para o tratamento de

distrofias, pois a maior vascularização é importante para a recuperação do tecido injuriado, além de poder contribuir com a restauração tecidual pela disponibilização de mais precursores associados a vasos. Seria interessante descobrir se essas subpopulações de pericitos que foram descritas em músculos de camundongos, também existissem em humanos e em outros tecidos, o que permitiria testar seu potencial terapêutico.

Mostramos neste trabalho que as células estudadas não possuem potencial miogênico *in vitro* ou *in vivo* e esta ausência de regeneração tecidual em que ainda é observado o benefício terapêutico já foi descrito na literatura (Gharaibeh et al. 2011). Porém, por dificuldades técnicas não conseguimos comprovar a participação das células injetadas na modulação do sistema imune do animal. Atualmente existem muitos ensaios *in vitro* para verificar a capacidade de imunomodulação, mas não há muito sobre a imunomodulação *in vivo*. Tentamos padronizá-los, mas pela grande variabilidade inter individual, não foi possível dar continuidade aos experimentos.

Em um primeiro momento, esperávamos tratar os animais *dko* com a linhagem de pericitos A19F de forma a validar os resultados obtidos anteriormente. Enfrentamos então problemas durante a expansão dessas células, que parecem ter esgotado o seu potencial proliferativo. Com a dificuldade em obter quantidades suficientes dessa linhagem, injetamos apenas por 4 semanas na tentativa de verificar se havia um possível efeito terapêutico de acordo com o número de injeções. Porém, o estado das células não permitiu uma conclusão confiável. No trabalho anterior, as células A19F foram capazes de aumentar a sobrevivência dos animais no início do tratamento. Na presente pesquisa, não foi observada qualquer melhora no percentual de sobrevivência com injeções das células A19F, nem no início e nem ao final do tratamento. Não houve melhoras no peso, esteira ou radiografia e foi observada ainda uma pequena perda de peso das fêmeas tratadas com A19F.

Também não foram observadas diferenças significativas nos testes de esteira e radiografia nos animais tratados com pericitos A24F ou mesenquimais A24SF. Houve uma diferença significativa no peso dos animais tratados com a linhagem mesenquimal A24SF, com aumento de peso nos machos e diminuição nas fêmeas.

A análise da tendência das curvas de sobrevivência, durante o tratamento, sugere que os pericitos foram melhores do que as células mesenquimais de tecido adiposo de uma mesma doadora. Além disso, pode ser observado que os resultados de animais tratados com as células mesenquimais tendem a ser melhores, por sua vez, do que os animais tratados com veículo. Isto poderia ocorrer porque as células mesenquimais são constituídas por uma população heterogênea, incluindo pericitos que poderiam ser os responsáveis pelo efeito clínico benéfico. Em resumo, esses resultados corroboram resultados anteriores segundo os quais os pericitos teriam um potencial terapêutico melhor que as células mesenquimais de tecido adiposo.

6. Conclusões

- Animais *dko* tratados com pericitos de tecido adiposo tem uma sobrevida maior, durante o período de tratamento, do que animais tratados com células mesenquimais obtidas do mesmo tecido adiposo.

- Validamos o trabalho de Valadares et al. (2014) com a observação do aumento de sobrevida com o tratamento de animais *dko* com pericitos derivados de tecido adiposo de uma doadora diferente do estudo anterior.

- As diferenças são observadas apenas durante o tratamento e são mais acentuadas em seu início, indicando que o tratamento deve ser feito o mais cedo possível e realizado a longo prazo.

- O potencial terapêutico do tratamento só foi efetivo para a sobrevida, não tendo melhorado nenhum outro aspecto clínico avaliado.

- Não conseguimos obter conclusões definitivas sobre a atuação *in vivo* dessas células. Foi verificado que pericitos e mesenquimais não foram capazes de se diferenciar em tecido muscular *in vivo*, mas sua capacidade imunomodulatória não foi confirmada.

7. Bibliografia

Alexander, M.S. et al., 2014. MicroRNA-486 – dependent modulation of DOCK3 / PTEN / AKT signaling pathways improves muscular dystrophy – associated symptoms. , 124(6), pp.2651–2667.

Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C., 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell*, 21(2), pp.193–215.

Asakura, A. et al., 2002. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *The Journal of cell biology*, 159(1), pp.123–34.

Bansal, D. & Campbell, K.P., 2004. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in cell biology*, 14(4), pp.206–13.

Benchouir, R. et al., 2007. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell stem cell*, 1(6), pp.646–57.

Berardi, E. et al., 2014. Molecular and cell-based therapies for muscle degenerations: a road under construction. *Frontiers in physiology*, 5(April), p.119.

Bertini, E. et al., 2011. Congenital muscular dystrophies: a brief review. *Seminars in pediatric neurology*, 18(4), pp.277–88.

Bianco, P., Robey, P.G. & Simmons, P.J., 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts and assays. *Cell stem cell*, 2(4), pp.313–319.

Birbrair, A. et al., 2013. Type-1 pericytes participate in fibrous tissue deposition in aged skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*, 305(11), pp.C1098–113.

Birbrair, A. et al., 2014. Type-2 Pericytes Participate in Normal and Tumoral Angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, (336).

Blake, D.J. et al., 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*, 82(2), pp.291–329.

Blocki, A. et al., 2013. Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem cells and development*, 22(17), pp.2347–55.

Caplan, a I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), pp.641–50.

- Ceafalan, L.C., Popescu, B.O. & Hinescu, M.E., 2014. Cellular players in skeletal muscle regeneration. *BioMed research international*, 2014, p.957014.
- Chamberlain, J.R. & Chamberlain, J.S., 2010. Muscling in: Gene therapies for muscular dystrophy target RNA. *Nature medicine*, 16(2), pp.170–1.
- Christ, B. & Ordahl, C.P., 1995. Early stages of chick somite development. *Anatomy and embryology*, 191(5), pp.381–96.
- Corselli, M. et al., 2012. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 21(8), pp.1299–308.
- Cossu, G. & Bianco, P., 2003. Mesoangioblasts — vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(5), pp.537–542.
- Crisan, M., Yap, S., et al., 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, 3(3), pp.301–13.
- Crisan, M. et al., 2009. Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176, pp.118–23.
- Crisan, M., Huard, J., et al., 2008. Purification and culture of human blood vessel-associated progenitor cells. *Current protocols in stem cell biology*, Chapter 2(March), p.Unit 2B.2.1–2B.2.13.
- Da Justa Pinheiro, C.H. et al., 2012. Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Stem cell reviews*, 8(2), pp.363–74.
- Dalkilic, I. & Kunkel, L.M., 2003. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(3), pp.231–238.
- Davies, K.E. & Grounds, M.D., 2006. Treating muscular dystrophy with stem cells? *Cell*, 127(7), pp.1304–6.
- De Angelis, L. et al., 1999. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *The Journal of cell biology*, 147(4), pp.869–78.
- Deasy, B.M., Li, Y. & Huard, J., 2004. Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Current opinion in biotechnology*, 15(5), pp.419–23.
- Decary, S. et al., 2000. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscular disorders : NMD*, 10(2), pp.113–20.
- Deconinck, a E. et al., 1997. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90(4), pp.717–27.
- Dellavalle, a et al., 2011. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nature communications*, 2, p.499.

Dellavalle, A. et al., 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature cell biology*, 9(3), pp.255–67.

Emery, A.E.H., 2002a. Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscular disorders : NMD*, 12(4), pp.343–9.

Emery, A.E.H., 2002b. The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307), pp.687–95.

Endo, K. et al., 2013. Classification of various muscular tissues using miRNA profiling. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*, 34(6), pp.289–99.

English, K., 2013. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and cell biology*, 91(1), pp.19–26.

English, K. et al., 2013. Mesoangioblasts suppress T cell proliferation through IDO and PGE-2-dependent pathways. *Stem cells and development*, 22(3), pp.512–23.

English, K., French, A. & Wood, K.J., 2010. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell stem cell*, 7(4), pp.431–42.

English, K. & Wood, K.J., 2013. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(5), p.a015560.

Esner, M. et al., 2006. Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Development (Cambridge, England)*, 133(4), pp.737–49.

Gharaibeh, B. et al., 2011. Terminal differentiation is not a major determinant for the success of stem cell therapy - cross-talk between muscle-derived stem cells and host cells.

Grady, R.M. et al., 1997. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 90(4), pp.729–38.

Griffin, M.D. et al., 2013. Concise review: adult mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory diseases: how well are we joining the dots? *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(10), pp.2033–41.

Gronthos, S. et al., 2002. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), pp.531–535.

Gros, J. et al., 2005. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*, 435(7044), pp.954–8.

Gussoni, E. et al., 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401(6751), pp.390–4.

Guttinger, M. et al., 2006. Allogeneic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice. *Experimental cell research*, 312(19), pp.3872–9.

Hagmann, S. et al., 2013. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC musculoskeletal disorders*, 14, p.223.

Hoffman, E.P. et al., 2012. Novel approaches to corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*, 23(4), pp.821–8.

Hoffman, E.P., Brown, R.H. & Kunkel, L.M., 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6), pp.919–28.

Howard, M.T. et al., 2004. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Annals of neurology*, 55(3), pp.422–6.

Ichim, T.E. et al., 2010. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cellular immunology*, 260(2), pp.75–82.

Isaac, C. et al., 2013. Dystrophin and utrophin “double knockout” dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 31(3), pp.343–9.

Ishizaki, M. et al., 2011. Rescue from respiratory dysfunction by transduction of full-length dystrophin to diaphragm via the peritoneal cavity in utrophin/dystrophin double knockout mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(7), pp.1230–5.

Jazedje, T. et al., 2009. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *Journal of translational medicine*, 7, p.46.

Joe, A.W.B. et al., 2010. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature cell biology*, 12(2), pp.153–63.

Jorgensen, C., 2010. Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: is it specific to bone marrow-derived cells? *Stem cell research & therapy*, 1(2), p.15.

Junqueira, L.C & Carneiro, J. Histologia Básica. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Karalaki, M. et al., 2009. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In vivo (Athens, Greece)*, 23(5), pp.779–96.

Kean, T.J. et al., 2013. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem cells international*, 2013, p.732742.

Keeling, R.M. et al., 2007. Weekly oral prednisolone improves survival and strength in male mdx mice. *Muscle & nerve*, 35(1), pp.43–8.

Khurana, T.S. & Davies, K.E., 2003. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(5), pp.379–90.

Kipling, D. & Cooke, H.J., 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Letter to Nature*, 347.

Koenig, M. et al., 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50(3), pp.509–17.

Le Blanc, K., 2006. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy*, 8(6), pp.559–61.

Lima, B.L. et al., 2010. A new mouse model for marfan syndrome presents phenotypic variability associated with the genetic background and overall levels of Fbn1 expression. *PloS one*, 5(11), p.e14136.

Lostal, W. et al., 2010. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Human molecular genetics*, 19(10), pp.1897–907.

Lu, A. et al., 2014. Rapid depletion of muscle progenitor cells in dystrophic mdx/utrophin^{-/-} mice. *Human molecular genetics*, (29), pp.1–15.

Lv, F.J. et al., 2014. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, pp.1408–1419.

Mendell, J.R. et al., 1989. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *The new England journal of medicine*, 320, pp.1592–7.

Meregalli, M. et al., 2012. The role of stem cells in muscular dystrophies. *Current gene therapy*, 12(3), pp.192–205.

Merlini, L. et al., 2003. Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & nerve*, 27(February), pp.222–227.

Minasi, M.G. et al., 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development (Cambridge, England)*, 129(11), pp.2773–83.

Mitchell, K.J. et al., 2010. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nature cell biology*, 12(3), pp.257–66.

Moisset, P. a et al., 1998. Expression of human dystrophin following the transplantation of genetically modified mdx myoblasts. *Gene therapy*, 5(10), pp.1340–6.

Monaco, A.P. et al., 1986. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Letters to Nature*.

Montarras, D. et al., 2005. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5743), pp.2064–7.

Mourkioti, F. et al., 2013. Role of telomere dysfunction in cardiac failure in Duchenne muscular dystrophy. *Nature cell biology*, 15(8), pp.895–904.

Murphy, M.B., Moncivais, K. & Caplan, A.I., 2013. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*, 45(11), p.e54.

Murray, I.R. et al., 2014. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(8), pp.1353–74.

Nigro, V. & Savarese, M., 2014. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*, 33(1), pp.1–12.

Nowak, K.J. & Davies, K.E., 2004. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO reports*, 5(9), pp.872–6.

Park, T.S. et al., 2011. Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem cells and development*, 20(3), pp.451–63. Partridge, T.A. et al., 1989. Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to positive by injection of normal myoblasts.

Péault, B. et al., 2007. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(5), pp.867–77.

Qu-Petersen, Z. et al., 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *The Journal of cell biology*, 157(5), pp.851–64.

Robinton, D.A. & Daley, G.Q., 2013. The Promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), pp.295–305.

Rodriguez, A. et al., 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. , 201(9).

Rongvaux, A. et al., 2014. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nature biotechnology*, 32(4), pp.364–72.

Sacco, A. et al., 2011. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, 143(7), pp.1059–1071.

Schugar, R.C. et al., 2009. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009, p.789526.

Seale, P. et al., 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), pp.777–86.

Secco, M. et al., 2008. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(1), pp.146–50.

Singer, N.G. & Caplan, A.I., 2011. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual review of pathology*, 6(November 2010), pp.457–78.

Suzuki, D.E., Nakahata, A.M. & Okamoto, O.K., 2014. Knockdown of E2F2 Inhibits Tumorigenicity, but Preserves Stemness of Human Embryonic Stem Cells. *Stem cells and development*, 23(11), pp.1266–74.

Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp.663–76.

Tedesco, F.S. et al., 2012. Transplantation of genetically corrected human iPSC-derived progenitors in mice with limb-girdle muscular dystrophy. *Science translational medicine*, 4(140), p.140ra89.

Tinsley, J.M. et al., 1996. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Letter to Nature*.

Torrente, Y. et al., 2004. Human circulating AC133 + stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle.

Tremblay, J.P. & Guette, B., Myoblast Transplantation: a Brief Review of the Problems and of Some Solutions.

Urso, M.L., 2013. Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 115(6), pp.920–8.

Vainzof, M. et al., 2008. Animal models for genetic neuromuscular diseases. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 34(3), pp.241–8.

Valadares, M.C. et al., 2014. Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J Mice. *Stem cell reviews*.

Vieira, N.M. et al., 2012. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell transplantation*, 21(7), pp.1407–17.

Vieira, N.M., Brandalise, V., et al., 2008. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 100(4), pp.231–41.

Vieira, N.M., Bueno, C.R., et al., 2008. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), pp.2391–8.

Wang, B., Li, J. & Xiao, X., 2000. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(25), pp.13714–9.

Watchko, J. et al., 2002. Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. *Human gene therapy*, 13(12), pp.1451–60.

Wicklund, M.P., 2013. The muscular dystrophies. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 19(6 Muscle Disease), pp.1535–70.

Wilson, a, Butler, P.E. & Seifalian, a M., 2011. Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. *Cell proliferation*, 44(1), pp.86–98.

Xiao, X., Li, J. & Samulski, R.J., 1996. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *Journal of virology*, 70(11), pp.8098–108.

Yarak, S., 2010. Human adipose-derived stem cells : current challenges and . , 85(5), pp.647–656.

Zammit, P.S., Partridge, T. a & Yablonka-Reuveni, Z., 2006. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 54(11), pp.1177–91.

Zatz, Rapaport, Vainzof, Passos-Bueno, Bortolini, Pavanello, Peres. 1991. "Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy." *Journal of Neurological Sciences*.

Zatz, M., Vainzof, M. & Passos-Bueno, M.R., 2000. Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Current opinion in neurology*, 13(5), pp.511–7.

Zheng, B. et al., 2007. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nature biotechnology*, 25(9), pp.1025–34.

Zhu, B. & Murthy, S.K., 2014. Stem cell separation technologies. *Curr opin chem eng*, 2(1), pp.3–7.

Zimmerlin, L. et al., 2010. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(1), pp.22–30.

Zuk, P. a et al., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7(2), pp.211–28. Zuk, P.A. et al., 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. pp.4279–4295.

ANEXO I

Corte de músculos gastrocnêmios injetado localmente com células humanas. O controle positivo do experimento piloto foi obtido a partir da injeção de células humanas e após 15 minutos foi feita a coleta do músculo. O experimento que avaliou o potencial miogênico *in vivo* das células estudadas foi realizado a partir de lesão do músculo, transplante local de células e coleta três semanas após. No experimento a marcação foi inespecífica e não coincidentes com núcleos corados com DAPI.

ANEXO II

Porcentagem de células de cada marcador utilizado por órgão e grupo de animais.

ANEXO III

Citocinas verificadas por Elisa Array. Amostras 1-5 circuladas em preto – C57/BL6; 6-10 circuladas em vermelho – MDX/BL6; 11-15 circuladas em amarelo – MDX Utr+/+; Amostras 16, 17, 18, 20 e 23 circuladas em azul claro – DKO; 21 e 22 circuladas em verde – DKO “velhos”; e amostra não circulada – MDX Utr +/-

8. Biografia

Juliana Plat de Aguiar Gomes é Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (2012). Atualmente é aluna de pós-graduação (Mestrado) do departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (2014). Esta dissertação é apresentada para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na área de Biologia/Genética.

Publicações relevantes:

1. Lima, BL ; Santos, EJC ; Fernandes, GR ; Merkel, C ; Mello, MR ; **GOMES, JPA** ; Soukoyan, M ; Kerkis, A ; Massironi, SMG ; Visintin, JA ; Pereira, LV . A New Mouse Model for Marfan Syndrome Presents Phenotypic Variability Associated with the Genetic Background and Overall Levels of Fbn1 Expression. Plos One, 2010.
2. Vieira, N ; Valadares, M ; Zuconni, E ; Secco, M ; Bueno Junior, CR ; Brandalise, V ; Assoni, AF ; **GOMES, JP** ; Landini, V. ; Andrade, T. ; Caetano, H. ; Vainzof, M ; Zatz, M. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. Cell Transplantation, 2011.
3. Valadares, M ; **GOMES, JP** ; Castello, G ; Assoni, A ; Pelatti, M ; Bueno, C ; Corselli, M ; Silva, H ; Bartolini, P ; Vainzof, M ; Margarido, PF ; Baracat, E ; Péault, B ; Zatz, M. Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn^{tm1Ked} Dmd^{mdx}/JMice. Stem Cell Reviews and Reports, 2014.