
Mariane Secco

**Avaliação do potencial terapêutico de células-
tronco mesenquimais do cordão umbilical
humano associadas ao IGF-1 para Distrofias
Musculares Progressivas**

São Paulo

2011

Mariane Secco

**Avaliação do potencial terapêutico de células-
tronco mesenquimais do cordão umbilical
humano associadas ao IGF-1 para Distrofias
Musculares Progressivas**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciências, na Área de
BIOLOGIA/GENÉTICA.

Orientadora: Profa. Dra. Mayana Zatz

Co-orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Secco, Mariane

Avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano associadas ao IGF-1 para distrofias musculares progressivas

Número de páginas: 207

Tese (Doutorado Direto) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Distrofia Muscular 2. Células-tronco Mesenquimais 3. IGF-1

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).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Mayana Zatz

Orientadora

Dedicatória

*Dedico essa tese aos meus pais, Irvando e Teresa,
por tornarem possível o alcance de todos os meus sonhos,
e sempre acreditarem nas minhas escolhas.*

Agradecimentos

A realização de cada uma das etapas do presente trabalho foi fruto de muito esforço e dedicação. No entanto, nada disso teria sido possível sem o apoio e ajuda de várias pessoas muito especiais. Por isso, serei eternamente grata a cada um de vocês.

A DEUS, pela proteção e amparo e por ter colocado no meu caminho uma Família exemplar e Amigos maravilhosos.

Aos meus pais, Irvando e Teresa, por todo amor que me dedicaram, por serem meus exemplos de vida, luta, coragem e determinação. *Pai, Mãe*, agradeço sempre a Deus por ter me abençoado com pais tão maravilhosos. Sem o apoio de vocês nada disso teria sido possível!

Ao meu marido maravilhoso, companheiro, amigo, meu porto-seguro, minha paz. *Amor*, desculpe pela minha ausência em tantos momentos. Sem o seu apoio e compreensão eu não teria conseguido. Te amo demais.

À minha irmã, Andressa, que assim como minha mãe, é meu exemplo de mulher forte, determinada, guerreira, meu exemplo de mãe, de esposa, de amiga. Que sorte a minha ter uma irmã tão maravilhosa. *Dessinha*, obrigada por me ouvir e me aconselhar sempre.

Ao meu cunhado Alexandre, exemplo de motivação. *Xandy*, obrigada por cuidar da minha irmã e da Manu.

A nossa Manuella, que com a sua pouca idade ainda não tem noção do quanto representa para cada um de nós. Aiiiiii, como eu te amo *Manu*.

A GRANDE Soninha, meu anjo-da-guarda. Benção de Deus na minha vida. Muito obrigada por tudo.

Muito obrigada a toda minha Família e Amigos, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

Em especial, agradeço aos meus padrinhos, Vaneide e Cuca (*in memoriam*).

Agradeço especialmente também aos meus primos maravilhosos, pela indescritível infância que tivemos juntos, mas principalmente por ter vocês na minha vida.

Aos meus avós, em especial a minha avó Alzira, que nos olha lá de cima, e certamente continua torcendo por todos nós e vibrando junto com as nossas conquistas. A minha avó Dirce, por ter gasto todas as velas em orações. Além disso, agradeço a ela por ter me ensinado a ter pensamento positivo SEMPRE. Vó, dentre tantas outras coisas, obrigada por me ensinar que “PALAVRA É ORAÇÃO”.

Aos meus sogros, Conceição e Raul, e meus cunhados Ana, Paola, Paulinho e Fábio. Meus primos e amigos Lipe e Paty. Muito obrigada pelo carinho, apoio e torcida.

Aos meus sobrinhos lindos, Giulia, Bia e João. Vocês trazem ainda mais alegria e amor para todos nós.

As minhas amigas mais que especiais, Marley, Monica, Lu, Cintia. Grande parte dessa conquista também é de vocês. Obrigada por tudo!

No decorrer da vida científica aprendemos que a execução de ideias depende fundamentalmente do trabalho em equipe. No meu caso, além do trabalho em equipe, eu tive a sorte de fazer AMIGOS. Por isso, agradeço imensamente e divido essa conquista e alegria com todos vocês.

Agradeço especialmente a minha orientadora Mayana Zatz, que sem dúvida teve um papel fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

Mayana, muito obrigada por ter apostado em mim e por ter oferecido um espaço em seu laboratório por todos esses anos. Serei eternamente grata.

Agradeço especialmente também ao Prof. Oswaldo Keith Okamoto, pelas conversas, sugestões, e conselhos que foram fundamentais desde a primeira etapa deste projeto.

Tati, meu agradecimento especial também a você, que foi a primeira a me acolher de braços abertos no laboratório, que acreditou em mim desde o primeiro momento, e sempre torceu pela minha vitória. Muito obrigada por tudo.

Nati e Eder, meu agradecimento mais que especial para vocês. MEUS PARCEIROS. Tenho certeza que ainda vamos viver muito momentos maravilhosos juntos.

Carmão, muito obrigada pelas dicas e ensinamentos. Grande parte desse trabalho não teria sido possível sem a sua ajuda.

Marcos, não tenho palavras para expressar o quanto FOI FENOMENAL trabalhar com você durante todos esses anos. Dentre tantas outras coisas, levo comigo seu exemplo de determinação.

Amanda, Camila, Gabi, Jú, Mayra, Carla, Estela, Helô, muito obrigada pelos momentos de descontração e tantas risadas. Obrigada por todas as saídas gastronômicas. Não sei o que seria de mim sem o dogão da Reitoria, a tapioca, bolos da mãe da Mayra... Foi tudo inesquecível.

A todos os outros colegas e companheiros de laboratório: Toninha, Inês, Luciana, Miguel, Michel, Melinda, Monize, Naila, Nani. Agradeço em especial ao David, por ter me ajudado tanto com a minha avó.

Não poderia deixar de agradecer também aos amigos de outros laboratórios.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Proteínas Musculares e Histopatologia Comparada, especialmente à Profa. Mariz pela disponibilidade de sempre. Agradeço também em especial à Paula, que sempre tinha ótimos conselhos para me dar.

Agradeço ainda a todos os amigos do Laboratório de Genética do Desenvolvimento, especialmente à Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno e a Daniela Bueno.

Agradeço a todas as alunas do Prof. Keith, que sempre são tão gentis com todos nós.

Agradeço ainda a todos os funcionários do Genoma, que mantem a estrutura do Centro e nos permitem trabalhar com muito mais conforto. Muito obrigada a todos vocês.

Agradeço a Miriam e a Neide do IPEN, por toda a ajuda e disponibilidade.

Meu muito obrigada também ao Prof. Sérgio Verjovski e ao Yuri Moreira por terem me auxiliado em uma das etapas desse projeto.

À Constância Gotto pelo apoio e conselhos.

Agradeço também quem já passou pelo projeto e atualmente está em outros lugares. Em especial, agradeço a Kelly Bagattini, que sempre foi uma fofa comigo e que me ajudou muito no começo do estágio.

Aos funcionários, professores e amigos do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da USP.

A todas as mães e filhos que doaram o cordão umbilical e fizeram possível a realização deste trabalho.

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra me desejaram sucesso, sorte e felicidade durante o desenvolvimento deste estudo. Absorvi todas as coisas boas e desejo tudo em dobro para todos vocês.

Epígrafe

*“Se eu pude enxergar mais longe,
foi porque subi nos ombros de gigantes.”*

(Isaac Newton)

Nota do Autor

A proposta deste trabalho é a avaliação do potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais (MSCs; do inglês *mesenchymal stem cells*) de cordão umbilical associadas ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1; do inglês *insulin-like growth factor 1*) para terapia de distrofias musculares progressivas.

Esta tese foi organizada no formato de capítulos, sendo o primeiro deles composto por uma introdução geral e objetivos deste estudo (**CAPÍTULO 1**). Os capítulos seguintes consistem de artigos científicos publicados em revistas internacionais ou em processo de redação/publicação, os quais descrevem os resultados obtidos durante o período de doutoramento. No último capítulo é feita uma discussão geral sobre todos os resultados obtidos (**CAPÍTULO 7**). Nos anexos encontram-se os trabalhos relacionados com o tema desta tese, também já publicados em revistas internacionais.

A primeira etapa do nosso estudo consistiu na identificação de fontes abundantes e acessíveis de células-tronco. Neste contexto, descrevemos a eficiência no isolamento de MSCs a partir do tecido do cordão umbilical humano (**CAPÍTULO 2**) e, posteriormente, comparamos o perfil de expressão gênica de MSCs obtidas de sangue e tecido de cordão umbilical (**CAPÍTULO 3**). Nas etapas seguintes analisamos o potencial miogênico *in vitro* das MSCs obtidas do cordão umbilical, quando submetidas a dois diferentes protocolos de indução. Primeiramente investigamos o papel dos fatores solúveis liberados pelo músculo distrófico em induzir a diferenciação miogênica de MSCs (**CAPÍTULO 4**). Esse protocolo nos permitiu entender como o microambiente do músculo distrófico interfere na potencial miogênica de MSCs e contribuiu para a identificação de alguns dos fatores de crescimento e/ou citocinas presentes no músculo e que estariam, possivelmente, relacionados com a miogênese. Dada a relevância do IGF-1 neste processo, posteriormente analisamos o seu papel na diferenciação miogênica *in vitro* de MSCs (**CAPÍTULO 5**). Além disso, verificamos a influência do IGF-1 na interação de MSCs com células

musculares obtidas de pacientes distróficos, quando em co-culturas **(CAPÍTULO 5)**. Por fim, com base nos resultados obtidos a partir dos experimentos *in vitro*, analisamos se a associação de IGF-1 e MSCs *in vivo* seria capaz de promover uma melhora funcional no músculo de modelos murinos de distrofias musculares **(CAPÍTULO 5 e 6)**.

Propor uma terapia para as diferentes formas de distrofias musculares requer ultrapassar diversas barreiras. Embora o uso de células-tronco tem se consolidado como uma estratégia terapêutica promissora, os resultados discrepantes obtidos até o momento reforçam a necessidade de otimizar os protocolos dos transplantes celulares, visando aumentar a efetividade da terapia celular para as distrofias musculares. Neste sentido, a ideia da combinação de diferentes abordagens – MSCs e IGF-1 – surgiu com o intuito de potencializar os efeitos das células-tronco no músculo distrófico. Com base nos resultados obtidos a partir dos experimentos do IGF-1 na diferenciação miogênica de MSCs *in vitro*, a nossa hipótese inicial era que este fator contribuiria para promover a miogênese de MSCs *in vivo*. Visto que os resultados obtidos foram contrários a essa suposição, prosseguimos com a investigação de outros mecanismos que poderiam estar envolvidos no reparo do músculo. Enquanto algumas perguntas foram sendo respondidas, outras novas questões foram surgindo e algumas ainda permanecem em aberto como perspectivas para projetos futuros.

Sumário

Resumo	14
Abstract	15
Capítulo 1	16
I. Introdução Geral	16
II. Objetivos	41
III. Referências Bibliográficas	42
Capítulo 2	52
Isolamento de células-tronco mesenquimais de amostras de cordão umbilical humano	52
Capítulo 3	62
Análise comparativa do perfil de expressão gênica de células-tronco mesenquimais humanas provenientes de sangue de cordão <i>versus</i> tecido de cordão umbilical	62
Capítulo 4	80
Efeitos dos fatores solúveis liberados pelo músculo distrófico na indução da proliferação e diferenciação miogênica de células-tronco mesenquimais humanas	80
Capítulo 5	106
Potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano associadas ao IGF-1 em um modelo murino de distrofia muscular...	106
Capítulo 6	161
Administração local de IGF-1, em associação a células-tronco mesenquimais humanas, em um modelo murino de distrofia muscular.....	161

Capítulo 7	186
I. Discussão Geral.....	186
II. Conclusões	197
III. Referências Bibliográficas	199
Anexo I	203
Biografia	206

Resumo

As Distrofias Musculares Progressivas constituem um grupo de doenças genéticas caracterizadas por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. As diferentes abordagens terapêuticas propostas para esse grupo de doenças têm como enfoque restaurar a proteína muscular deficiente por meio da terapia celular ou terapia gênica, ou o tratamento dos sinais e sintomas patológicos do músculo pela administração de fármacos e/ou fatores de crescimento. A combinação de diferentes estratégias pode aumentar a eficiência do reparo muscular. Deste modo, este trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais (MSCs) associadas ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) para diferentes tipos de distrofias musculares. Inicialmente avaliamos o potencial miogênico de MSCs humanas de cordão umbilical *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que os fatores solúveis liberados pelo músculo distrófico de camundongos *mdx* foram capazes de induzir a diferenciação miogênica terminal das células-tronco. Além disso, verificamos que o IGF-1, por si só, é capaz de promover a miogênese de MSCs, com mais eficiência que os protocolos de indução padrões. Ainda nos estudos *in vitro*, demonstramos que MSCs são capazes de interagir com células musculares de pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) e restaurar a expressão de distrofina, quando cultivadas em meios suplementados com IGF-1. Frente a estes resultados, prosseguimos com os estudos em modelos animais, *in vivo*, e demonstramos que as MSCs humanas de cordão umbilical e IGF-1, quando administrados conjuntamente por via sistêmica, são capazes de modular a inflamação, reduzir a fibrose, aumentar o reparo muscular e, conseqüentemente, promover uma melhora clínica significativa do músculo de camundongos LAMA2^{dy2j} – modelo murino de Distrofia Muscular Congênita. Cabe ressaltar que as células humanas não foram rejeitadas após administração sistêmica em modelos animais não imunossuprimidos. Esses resultados suportam o potencial uso combinado de MSCs de cordão umbilical humano e IGF-1 no tratamento de distrofias musculares. Contudo, a confirmação destes dados em um modelo animal de grande porte, como os modelos caninos de distrofia muscular, é de extrema importância visando o entendimento dos mecanismos envolvidos no reparo muscular e avaliação de eventuais efeitos adversos, o que pode representar um passo importante para o início dos testes clínicos em pacientes.

Abstract

Progressive muscular dystrophies are a clinically and genetically heterogeneous group of disorders caused by the deficiency or abnormal muscle proteins, resulting in progressive degeneration and loss of skeletal muscle function. Strategies for the development of a muscular dystrophy therapy have focused on the possibility of restoring the defective muscle protein by cell therapy or on delivery of growth factors to treat or ameliorate muscular pathology symptoms. Combining both strategies could be a very useful approach to enhance the efficiency of muscle repair. The aim of this study is to evaluate the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells (MSCs) from umbilical cord tissue combined with IGF-1 for muscle regeneration. Firstly, we verified the myogenic potential of these cells *in vitro*. Our results demonstrated that the soluble factors released from *mdx* dystrophic muscle were able to promote the myogenic differentiation of MSCs. Moreover, we showed that IGF-1 is capable of enhancing considerably the myogenesis of human MSCs from UC *in vitro*. More interestingly, we showed that IGF-1 enhances the interaction of MSCs and DMD muscle cells in co-culture and the restoration of dystrophin expression. Subsequently, our *in vivo* studies revealed that the association of IGF-1 and MSCs markedly reduced muscle inflammation and fibrosis, and significantly improved muscle strength in LAMA2^{dy2j} mice, a murine model for congenital muscular dystrophy. It is important to point out that human cells are not rejected even in xenotransplants without immunosuppression. In summary, our results suggest that a combinatorial strategy of both IGF-1 and MSCs could enhance the efficiency of muscle repair and, therefore, should be further tested as a potential therapeutic approach in muscular dystrophies. However it is important to repeat the experiments on canine dystrophic model (GRMD; *Golden Retriever Muscular Dystrophy*) – in order to enhance our knowledge about the mechanism involved in muscle repair and monitor any eventual long-term side effects, which could represent an important point to start the clinical trial in patients.

Capítulo 1

I - INTRODUÇÃO GERAL

1. Distrofias Musculares Progressivas

As Distrofias Musculares Progressivas (PMDs; do inglês *Progressive Muscular Dystrophies*) constituem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias caracterizadas por degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. Atualmente foram descritas mais de 40 formas de PMDs que diferem entre si quanto à idade de manifestação dos primeiros sinais e sintomas, velocidade de progressão da doença, gravidade e localização preferencial das lesões, dentre outros sinais (Emery et al., 2002).

Em geral, as mutações que geram as distrofias estão de alguma forma relacionadas com a organização do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (DGC; do inglês *Dystrophin-associated Glycoprotein Complex*), localizado na porção interna do sarcolema (**FIGURA 1**; Jones et al., 1998; Ehmsen et al., 2002). O complexo DGC é considerado essencial para a manutenção da função muscular, porque 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 (Petrof et al., 1993; Jones et al., 1998; Rando et al., 2001; Ehmsen et al., 2002; Dalkilic and Kunkel, 2003). Distrofia Muscular de Duchenne (DMD; do inglês *Duchenne Muscular Dystrophy*) e Becker (BMD; do inglês *Becker Muscular Dystrophy*) são causadas por mutações no gene da distrofina. Mutações na laminina- $\alpha 2$, por sua vez, causam a Distrofia Muscular Congênita tipo 1A (CMD; do inglês *Congenital Muscular Dystrophin*). Muitas das mutações nos genes do complexo DGC, incluindo mutações na disferlina, afetam a musculatura dos membros e do tronco

proximal sendo denominadas de Distrofias Musculares do tipo Cinturas (LGMD; do inglês *Limb-Girdle Muscular Dystrophy*), o grupo mais heterogêneo das distrofias (Passos-Bueno et al., 1999; Zatz et al., 2000; Zatz et al., 2003).

Em biópsia muscular, os achados histológicos comuns a todas as PMDs consistem em variação no calibre das fibras musculares, áreas de necrose, invasão de células inflamatórias e reposição do tecido muscular por tecido adiposo e/ou tecido conjuntivo (Emery et al., 2002)

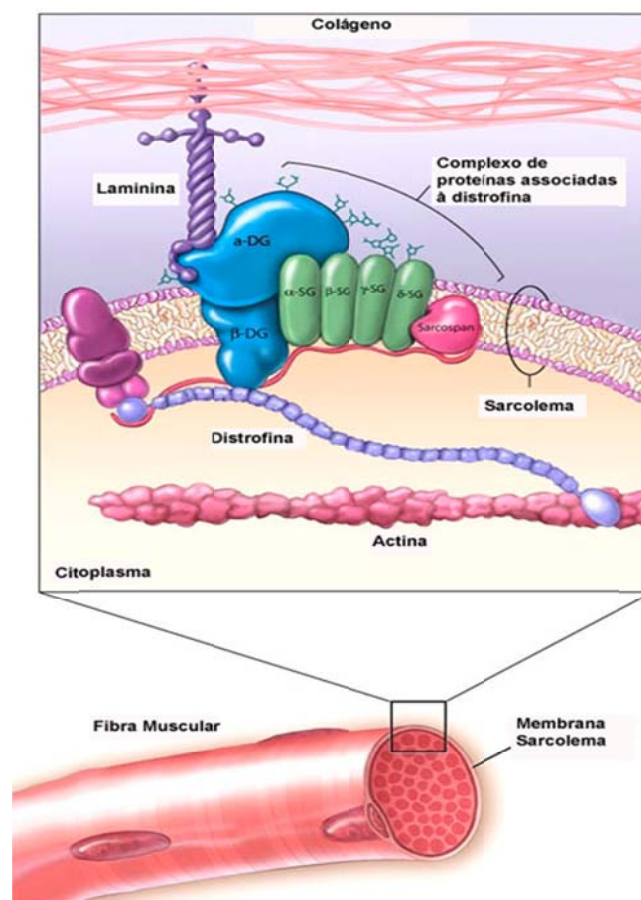


FIGURA 1 – Complexo de Glicoproteínas associadas à Distrofina. Representação esquemática mostrando a interação da distrofina com proteínas citoplasmáticas, transmembrana e extracelulares no músculo esquelético (Modificado a partir de Lydia Kibiuk).

1.1. Distrofia Muscular de Duchenne

Dentre as diferentes miopatias genéticas, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), é a mais grave e comum, com incidência de um em cada 3.500 nascimentos vivos do sexo masculino (O'Brien and Kunkel, 2001).

A causa primária da doença consiste de mutações no gene da distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X, que codifica para uma proteína integrante do sarcolema, responsável por ancorar as proteínas do citoesqueleto às proteínas presentes na membrana plasmática (**FIGURA 1**; Kunkel et al., 1985; Blake et al., 2002; Van Deutekom & Van Ommen, 2003; Vainzof & Zatz, 2003). Em seres humanos, a importância do funcionamento da distrofina no músculo esquelético é demonstrada pela grave patologia que ocorre em sua ausência. Na maioria dos casos, os sinais clínicos iniciam-se entre 3-5 anos de idade, caracterizados por níveis séricos aumentados da enzima creatina quinase, pseudo-hipertrofia das panturrilhas, quedas frequentes e dificuldade em correr e subir escadas. Com a progressão da doença, ciclos repetitivos de degeneração superam a capacidade regenerativa do tecido muscular, causando sua substituição por tecido conjuntivo e adiposo. O confinamento em cadeira de rodas se dá em torno dos 10 a 12 anos de idade e, sem cuidados especiais, os afetados raramente sobrevivem após os 20 anos (Blake et al., 2002; Van Deutekom & Van Ommen, 2003).

1.1.1. Distrofina e o Complexo Glicoproteico Associado à Distrofina

Em 1985 o gene responsável pela DMD foi localizado no braço curto do cromossomo X (Xp21). Com 2,3 megabases (Mb), o gene DMD é o maior gene humano já caracterizado (Kunkel et al., 1985). É constituído por 79 éxons, sendo transcrito em um RNA mensageiro (mRNA) de 14 kilobases (Kb). Após a localização do gene e sua clonagem em 1987, descobriu-se que o produto do gene é a distrofina, uma proteína de 3685 aminoácidos e massa molecular de

427 kilodaltons (kDa), localizada na face citoplasmática da membrana das fibras musculares esqueléticas e cardíacas (Hoffman et al., 1987).

A maioria dos afetados pela DMD apresentam uma mutação que altera a fase de leitura do mRNA (*frame-shifting*) do gene da distrofina, causando a produção de uma proteína truncada que é rapidamente degradada na célula muscular. Dentre as mutações que causam DMD 60% são deleções, 5-6% duplicações e mutações de ponto nos casos restantes (Koenig et al., 1987). Mutações que mantêm o quadro de leitura da distrofina, gerando uma proteína comprometida, mas parcialmente funcional, são responsáveis pela Distrofia Muscular de Becker (BMD), alélica à DMD (Koenig et al., 1989). A incidência da BMD é cerca de 10 vezes menor que a da DMD, ocorrendo um caso a cada 30 mil nascimentos do sexo masculino. Os sintomas e sinais da BMD são semelhantes aos da DMD, mas consideravelmente mais leves. O início de manifestação é mais tardio e a evolução clínica da doença é mais lenta. Além disso, a velocidade de progressão da patologia é extremamente variável, podendo haver, em uma mesma família, afetados com diferentes graus de comprometimento muscular.

Além da manutenção do quadro de leitura do mRNA a gravidade do quadro clínico pode estar associada à localização da deleção. Deleções nas regiões de ligação da distrofina com a actina (região carboxi-terminal) ou na região de ligação com as proteínas da membrana plasmática (região amino-terminal) resultam em um quadro de DMD mais grave. Por outro lado, foram observados casos de deleção de 50% do gene, restrita à região central (domínio em bastão ou *rod domain*), associadas a um quadro clínico leve (Vainzof et al., 1993a,b; Passos-Bueno et al., 1994).

A análise da presença de distrofina no músculo pode ser feita por *Western blot* (WB) e imunofluorescência utilizando anticorpos para região amino-terminal e carboxi-terminal. Os pacientes DMD apresentam ausência de distrofina em WB. Entretanto, se a análise por imunofluorescência é feita com o anticorpo amino-terminal uma marcação positiva parcial de algumas fibras pode

ser observada, geralmente sem correlação com a gravidade do quadro clínico. Além disso, algumas fibras isoladas distrofina positivas podem ser observadas, denominadas fibras revertentes. A análise de proteínas em pacientes BMD por WB mostra bandas de distrofina com peso molecular alterado ou em quantidade diminuída. A imunofluorescência apresenta uma marcação positiva para distrofina, embora diferente do músculo normal (Hoffman et al., 1988; Vainzof et al., 2003).

Estudos de solubilização da distrofina a partir de frações do sarcolema mostraram que esta proteína interage com várias outras proteínas e glicoproteínas que formam o complexo DGC. Acredita-se que o papel do DGC é estrutural, realizando a ligação entre o citoesqueleto de actina à matriz extracelular, e responsável pela estabilização do sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento da célula muscular, transmitindo a força gerada nos sarcômeros à matriz extracelular. Atualmente, há também evidências de que o DGC esteja envolvido na sinalização celular (Ehmsen et al., 2002; Petrof et al., 1993; Rando, 2001). Como mencionado anteriormente, mutações em outros componentes deste complexo podem acarretar no aparecimento de uma série de doenças musculares, o que ilustra o papel fundamental que ele desempenha na manutenção da integridade do músculo. Alterações na proteína laminina-2, por exemplo, acarretam em uma forma grave de distrofia muscular, a Distrofia Muscular Congênita tipo 1A (CMD1A).

1.2. Distrofias Musculares Congênitas

As Distrofias Musculares Congênitas (CMDs) formam um grupo heterogêneo de doenças musculares caracterizado clinicamente pela presença de hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento motor, grau variável de contraturas articulares, e possível associação com anormalidades no sistema nervoso central ou olhos. Pode ocorrer também comprometimento respiratório e da deglutição. A biópsia muscular invariavelmente apresenta alterações

histopatológicas distróficas. O quadro clínico tende a ficar estável, mas alguns pacientes apresentam uma evolução clínica lenta e progressiva (Dubowitz, 1999).

Aproximadamente 50% dos casos de CMDs são classificados como forma clássica ou CMD tipo 1A (CMD1A), e são causados por mutações no gene LAMA2 que codifica a cadeia $\alpha 2$ da laminina-2, também conhecida como merosina (Hillaire et al., 1994). A laminina-2 é a principal proteína da matriz extracelular na membrana basal da fibra muscular. Encontra-se ligada às proteínas citoplasmáticas, como a distrofina, por meio de interações com o DGC (**FIGURA 1**). Forma um heterodímero em forma de cruz, composto por uma cadeia $\alpha 2$ e duas outras cadeias $\beta 1$ e $\gamma 1$. Originalmente com 400 kDa, a cadeia $\alpha 2$ da laminina sofre uma clivagem pós-traducional, originando os fragmentos de 80 e 300 kDa.

O gene LAMA2 é composto por 260 kb organizados em 64 éxons, sendo que a parte codificante do RNA mensageiro tem cerca de 9,5 kb. O estudo de mutações no gene LAMA2 mostrou grande heterogeneidade, com presença de deleções e mutações de sentido trocado levando a códons de parada prematuros (Guicheney et al., 1997). A mutação mais frequente, encontrada em cerca de 20% dos pacientes, é uma deleção de 2pb (2096-2097). Dado o grande tamanho do gene e a variabilidade de alterações, (grande parte dos pacientes é heterozigoto composto e as mutações pontuais são muito frequentes) a triagem de mutações não é feita rotineiramente nos grandes centros do mundo. Neste caso, o diagnóstico é estabelecido por biópsia muscular e análise imuno-histoquímica utilizando um anticorpo monoclonal comercial que reage com o fragmento de 80kDa da região C-terminal da proteína. Aproximadamente 95% das mutações no gene LAMA2 acarretam na deficiência total da proteína, enquanto que os 5% restantes apresentam deficiência parcial de merosina no músculo, relacionadas às mutações de sentido trocado e pequenas deleções que não alteram o quadro de leitura (Hayashi et al., 1997).

Clinicamente, o grupo de pacientes merosina-negativos apresenta um fenótipo mais grave; a maioria dos pacientes é incapaz de adquirir marcha independente e o comprometimento respiratório é mais intenso. A maior parte dos afetados por CMD1A não apresenta comprometimento da inteligência, mas apresentam alterações da substância branca do cérebro, observadas por exames tomográficos ou por ressonância magnética (Dubowitz, 1999).

Outras formas mais raras e menos graves de DMC são causadas pela deficiência genética de diversas proteínas. Foram identificados dez genes que causam formas específicas de distrofias congênitas, mas se acredita em uma heterogeneidade ainda maior (Sparks and Escolar, 2011). Atualmente, a classificação internacional reconhece as seguintes categorias de genes responsáveis pela doença:

- a. Genes codificadores das proteínas estruturais da membrana basal ou matriz extracelular das fibras musculares esqueléticas: genes do colágeno VI, cadeia laminina- α 2 e integrina- α 7;
- b. Genes codificadores de glicosiltransferases e candidatos que afetam a glicosilação da α -dystroglicana, uma proteína de membrana externa da membrana basal: genes POMT1, POMGnT1, *fukutin*, *fukutin-related protein*, *Large*.
- c. Selenoproteína-1, que codifica uma proteína do retículo endotelial de função desconhecida.

Existe ainda um grupo heterogêneo de pacientes com CMD, cujo defeito genético, ou a deficiência proteica, ainda não foram identificados. Estes pacientes são incluídos no subgrupo chamado de CMD com merosina presente.

Embora as bases moleculares das diferentes distrofias musculares estejam bem documentadas, os mecanismos envolvidos na progressão da doença ainda não foram esclarecidos. O avanço nessa área depende do entendimento dos processos envolvidos na regeneração muscular, visando identificar aqueles que podem estar alterados nas PMDs.

2. Regeneração muscular e a importância do IGF-1

A musculatura esquelética de mamíferos adultos exibe uma grande capacidade de se adaptar a demandas, como crescimento e lesão. Os processos pelos quais essas adaptações ocorrem são atribuídos a uma pequena população de células mononucleadas – denominadas células satélites ou precursores miogênicos – que residem na periferia das fibras musculares, entre o sarcolema e a lâmina basal. Sem nenhuma perturbação, essas células encontram-se em estado quiescente. Entretanto, em resposta a um estímulo, seja uma lesão do músculo ou uma demanda aumentada de trabalho, as células satélites são ativadas, proliferam, se diferenciam e se fundem a fibras musculares pré-existentes para formar novas miofibras multinucleadas (Chargé & Rudnicki, 2004).

Apesar de certas peculiaridades, o processo de reparo do músculo nitidamente recapitula os eventos fundamentais do desenvolvimento embrionário, pois envolve a ativação de vários genes em comum, incluindo os genes da família Pax – Pax-3 e Pax-7 – e da família de fatores regulatórios miogênicos (MRFs; do inglês *Myogenic Regulatory Factors*), que consiste de MyoD, Myf5, MRF4 e miogenina. Células satélites quiescentes expressam Pax-7. A ativação e proliferação dos precursores miogênicos é marcada pela expressão de Myf5 e MyoD. Miogenina, por sua vez, é expressa mais tardiamente e é associada com a fusão e diferenciação terminal (**FIGURA 2**; Chargé & Rudnicki, 2004).

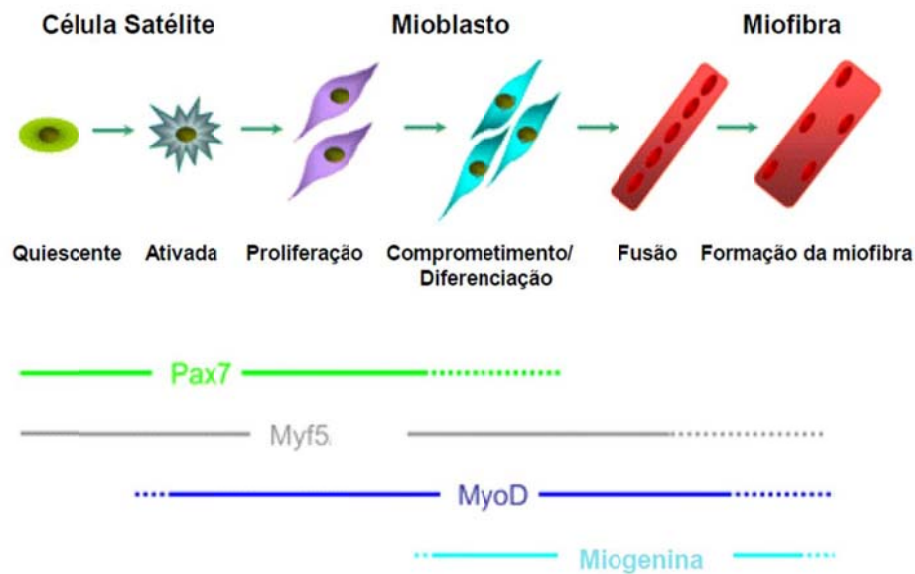


FIGURA 2 – Regeneração Muscular. Representação esquemática mostrando a ativação, proliferação e diferenciação miogênica de células satélites e marcadores típicos de cada estágio do processo de miogênese (modificado a partir de Zammit *et al.*, 2006).

O reparo do músculo é um processo complexo que envolve quatro etapas interdependentes: degeneração, inflamação, regeneração e fibrose (Tidball *et al.*, 1995; Pelosi *et al.*, 2007). O dano tecidual inicia uma invasão rápida e sequencial de células inflamatórias que podem persistir por dias ou meses enquanto a regeneração e/ou reparo do tecido ocorrem. A participação da inflamação é crucial para a ativação do processo de regeneração muscular, mas a sua persistência nem sempre é benéfica para o tecido. Várias evidências demonstram que o processo inflamatório crônico prejudica a regeneração do músculo e, conseqüentemente, culmina na sua fibrose (Mourkioti & Rosenthal, 2005; Pelosi *et al.*, 2007). De fato, as interações entre células inflamatórias e fibroblastos são as responsáveis pela produção de citocinas pró-fibróticas, como o TGF- β (do inglês *Transforming Growth Factor- β*), principal regulador da

fibrose em diversas condições patológicas. Na musculatura esquelética, a cascata fibrogênica também é iniciada por TGF- β (Bernasconi et al., 1995; Gosselin et al., 2004). Estudos prévios mostraram que essa citocina impede a expressão de MyoD e inibe a miogênese de células satélites, enquanto induz a sua diferenciação para miofibroblatos (Tidball, 2005). Para que o reparo do músculo possa ocorrer de forma satisfatória, outros fatores de crescimento e/ou citocinas atuam de forma a modular a inflamação, promover a regeneração e limitar a fibrose. Em especial o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1; do inglês *insulin-like growth factor 1*) têm sido mostrado por contribuir positivamente em vários processos durante o reparo do músculo (Pelosi et al., 2007; Mourkioti & Rosenthal, 2005).

No caso de pacientes com PMDs, ciclos repetidos de degeneração/regeneração exaurem o “estoque” de células satélites e, conseqüentemente, a capacidade regenerativa do músculo é perdida (Laguens et al., 1963; Heslop et al., 2000). Além disso, há indícios de que a inflamação crônica instaurada no músculo distrófico promova um desbalanço entre os fatores pro e anti-fibrogênicos, resultando na substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo. De fato, vários trabalhos têm demonstrado que os níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas encontram-se elevados no músculo distrófico gravemente comprometido, o que evidencia sua contribuição para o processo patológico. Por outro lado, os níveis de IGF-1 são elevados em animais distróficos portadores de uma forma clínica mais benigna de distrofia muscular (De Luca et al., 1999; Sakuma et al., 2000; De Lima et al., 2007). Esses achados são um forte indício da sua participação no processo de regeneração do músculo.

O entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de reparo muscular é de extrema importância, uma vez que eles podem ser manipulados de forma a aumentar a eficiência da regeneração muscular e diminuir a fibrose em casos patológicos como nas distrofias musculares. Dada a sua importância nesse processo, o IGF-1 será considerado em mais detalhes a seguir.

2.1. Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1)

O IGF-1 é um fator de crescimento peptídico, estruturalmente homólogo à insulina, e de fundamental importância nos processos de proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares (Mourkioti & Rosenthal, 2005). Sua síntese se dá principalmente no fígado, mas pode ocorrer em outros tecidos. A maioria dos IGFs em circulação apresentam-se associados a uma família de proteínas transportadoras, conhecidas pela sigla IGFBPs (do inglês *insulin-like growth factor binding proteins*). Seis IGFBPs foram clonadas e sequenciadas: IGFBP-1 a 6. As IGFBPs humanas apresentam peso molecular entre 22,8 kDa (IGFBP-6) e 44 kDa (forma glicosilada da IGFBP-3) e exibem grande homologia estrutural entre si. Todas apresentam elevado grau de especificidade e de afinidade para IGFs. Além de aumentarem a sua vida média, as IGFBPs modulam as ações autócrinas, parácrinas e endócrinas do IGF-1, podendo tanto potencializá-las quanto inibi-las. De uma forma geral a associação do IGF-1 com as IGFBPs diminuem sua disponibilidade biológica (Mourkioti & Rosenthal, 2005).

Na musculatura esquelética o IGF-1 exerce a maioria das suas ações via interação com o receptor IGF-1R e ativação de múltiplas vias de sinalização, entre elas a via da fosfoinositol-3-quinase (PI3K) e das MAP quinases, que resultam na proliferação, diferenciação miogênica e aumento da sobrevivência de células precursoras - processos fundamentais para a regeneração muscular (**FIGURA 3**; Mourkioti & Rosenthal, 2005). De fato, várias evidências têm mostrado que o IGF-1 contribui ativamente para o reparo do músculo, inclusive em condições patológicas como nas distrofias musculares (De Luca et al., 1999; Sakuma et al., 2000; De Lima et al., 2007). Além de participar da ativação e diferenciação de células satélites, diversos estudos têm mostrado que o IGF-1 é capaz de aumentar o recrutamento de outros progenitores celulares para auxiliar no reparo do músculo (Sacco et al., 2005), modular o processo inflamatório e reduzir a substituição do músculo por tecido adiposo e/ou conjuntivo (Pelosi et al., 2007). Esses efeitos são de extrema importância para amenizar os sintomas clínicos característicos dos diferentes tipos de distrofias

musculares. Por essa razão, ensaios experimentais pré-clínicos e clínicos visando avaliar o potencial terapêutico do IGF-1 em casos de distrofias musculares tem sido realizados por diversos grupos de pesquisa (Barton et al., 2002; Gehrig et al., 2008; Kumar et al., 2011). No entanto, cabe ressaltar, que o IGF-1 por si só não é capaz de restaurar a expressão das proteínas ausentes nos diferentes casos de distrofias musculares. Por essa razão, a combinação de diferentes abordagens pode constituir uma estratégia terapêutica mais atraente para as distrofias musculares e, portanto, será considerada a seguir.

IGF-1 no Músculo Esquelético

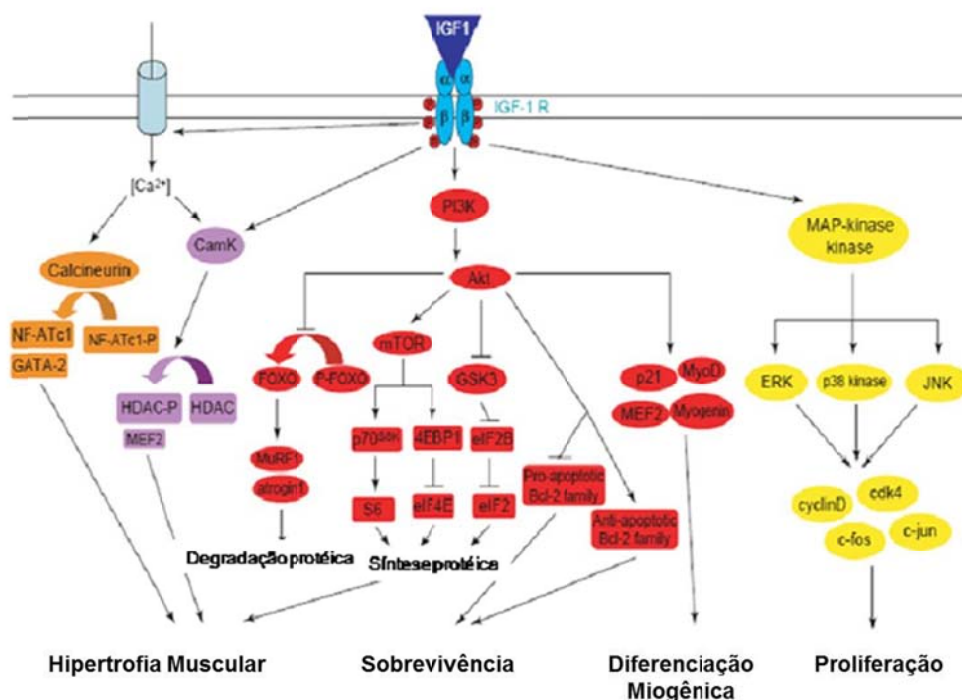


FIGURA 3 – Funções desempenhadas pelo IGF-1 no músculo esquelético. Representação esquemática das vias ativadas pela ligação do IGF-1 no receptor IGF-1R de células musculares esqueléticas (modificado a partir de Mourkioti & Rosenthal, 2005).

3. Modelos animais para as DMPs

Embora grandes avanços tenham sido obtidos no entendimento das bases moleculares e genéticas das PMDs, nenhum tratamento efetivo para esta doença está disponível. O progresso nesta área depende de modelos animais fiéis à patologia clínica humana, que constituem ferramentas importantes para o melhor entendimento das doenças genéticas e para a investigação de possíveis terapias para as diferentes formas de distrofias musculares.

A descoberta do gene responsável pela DMD e de seu produto proteico, a distrofina, permitiu a identificação de modelos animais homólogos à DMD humana em camundongos, cachorros, gatos e peixe (Bulfield et al., 1984; Sharp et al., 1992; Winand et al., 1994; Bassett and Currie, 2004; Vainzof et al., 2008). Nos humanos e nos cães, o processo de degeneração e fibrose predomina, levando a uma perda progressiva da estrutura e função muscular. Já nos modelos felino e murino, observa-se pouca fibrose e o processo de regeneração supera a necrose do músculo, gerando um fenótipo brando ou ausente de distrofia muscular. Dessa forma, a utilização do modelo murino e felino torna-se limitada, servindo apenas como modelo genético e bioquímico, mas não como modelo clínico-patológico da DMD humana (Partridge, 1991).

Nos últimos anos, cães da raça Golden Retriever portadores de distrofia muscular (GRMD – *Golden Retriever Muscular Dystrophy*) têm se mostrados importantes para a realização de triagens experimentais, pois suas alterações musculares assemelham-se a patogênese humana, além de possuírem uma massa muscular comparável a dos pacientes distróficos. Os cães afetados possuem uma mutação de ponto (A>G) no sítio 3' de *splicing* do íntron 6 do gene da distrofina. Por consequência, durante o processamento do RNAm, ocorre a perda total do éxon 7 ou a perda dos 5 nucleotídeos iniciais deste éxon. Ambas variantes de *splicing* introduzem uma mudança no quadro de leitura e um códon de terminação prematuro, resultando em uma deficiência grave da proteína distrofina no músculo (Sharp et al., 1992).

O *Sapje* é o modelo *zebrafish* para DMD. Surgiu recentemente como um modelo animal promissor para o estudo de distrofias musculares e outras doenças humanas devido ao seu pequeno tamanho, grande número de descendentes (50-350 por semana), rápido desenvolvimento da musculatura esquelética e transparência nas fases embrionária/juvenil. O *Sapje* apresenta musculatura normal até o dia 2 pós-fertilização, porém seu músculo vai perdendo a organização gradativamente, levando à perda da mobilidade por volta do dia 5 pós-fertilização (Steffen et al., 2007).

Com relação aos modelos murinos, o camundongo *mdx* tem sido extensivamente estudado. Como na DMD humana, este modelo também apresenta deficiência total da proteína distrofina causada por uma mutação no éxon 23 do gene, que resulta em um códon de parada prematuro. Entretanto, o camundongo *mdx* não apresenta fraqueza muscular evidente (Bulfield et al., 1984). Alguns pesquisadores sugerem que o fenótipo comparativamente leve deste camundongo pode, em parte, ser atribuído à utrofina, uma proteína relacionada à distrofina, a qual está aumentada nas fibras musculares regeneradas nos animais adultos. Foi demonstrado que camundongos duplamente mutantes para distrofina e utrofina apresentavam um fenótipo muito mais grave e morte prematura (Tinsley et al., 1996, 1998; Squire et al., 2002). Além disso, existem indícios de que estes animais apresentam um microambiente muscular que favorece uma capacidade regenerativa mais efetiva que em humanos (Dimario et al., 1989; De Luca et al., 1999; Yablonka-Reuveni and Andreson, 2006).

Outros modelos murinos de PMDs apresentam características fenotípicas semelhantes às encontradas em seres humanos. O camundongo *SJL*, modelo da LGMD2B (disferlinopatia), apresenta uma PMD que afeta primeiramente os músculos proximais. Estes animais apresentam uma mutação em um sítio de *splicing* do gene que codifica a disferlina, levando a perda do éxon 45 (171 pb) no RNAm. As alterações histopatológicas são discretas e o animal apresenta pouco comprometimento muscular quando jovem; no geral,

as alterações clínicas são evidentes após 9 meses de idade e, somente quando o animal é erguido pela cauda (Bittner et al., 1999).

Os camundongos *dy/dy* e *LAMA2^{dy/2j}* são modelos naturais da CMD1A. Ambos apresentam degeneração com comprometimento muscular grave e desmielinização do sistema nervoso periférico. O camundongo *dy/dy*, identificado em 1955, apresenta ausência total da proteína merosina no músculo, e o animal sofre de uma forma bastante grave de distrofia muscular, com fraqueza acentuada e reduzido tempo de vida. A mutação neste camundongo ainda não foi localizada. Os camundongos *LAMA2^{dy/2j}*, por sua vez, apresentam deficiência parcial da merosina. A mutação no gene *LAMA2* presente nestes animais leva a uma alteração no seu *splicing* e, conseqüentemente, a produção de uma proteína truncada sem o domínio VI amino-terminal. Embora seu quadro clínico seja menos grave do que no camundongo *dy/dy*, os animais *LAMA2^{dy/2j}* também apresentam redução na expectativa de vida e um comprometimento muscular bem evidente. No geral, a fraqueza muscular inicia-se em torno de três semanas e meia de idade, afetando primeiramente os membros traseiros, seguido dos axiais e da musculatura dianteira. O músculo esquelético apresenta alterações histopatológicas características do processo de degeneração, incluindo aumento de fibras centronucleadas e quantidade de tecido intersticial, presença de infiltrado inflamatório e variação no calibre das fibras musculares (Sunada et al., 1994, 1995).

Pelo fato de apresentarem um fenótipo diferencial e grave, os camundongos *dy/dy* e *LAMA2^{dy/2j}* têm despertado inestimável interesse no estudo do mecanismo patológico da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas diversificadas.

4. Estratégias terapêuticas para PDMs

Diferentes estratégias terapêuticas para as PMDs já foram propostas ou testadas em modelos animais. Dentre elas, o transplante de mioblastos,

apesar de restaurar a expressão de distrofina em camundongos *mdx* e pacientes com DMD, ainda apresenta limitações, como baixa distribuição das células após injeção, rejeição imune e baixa sobrevivência celular (Urish et al., 2005; Grounds and Davies, 2007; Peault et al., 2007).

A terapia gênica também tem sido extensivamente testada para PMDs. No caso da DMD, o grande tamanho do mRNA da distrofina constitui um grande empecilho nesta área, pois dificulta a sua manipulação em vetores virais. Entretanto, a criação de miniaturas deste gene (micro e mini-distrofinas) tornou possível sua introdução em vetores virais adenoassociados (AVV) e a realização de ensaios pré-clínicos em camundongos *mdx* (Wang et al., 2000; Abmayr et al., 2005; Liu et al., 2005). Atualmente, os grandes obstáculos a serem resolvidos envolvem a dose necessária para transdução viral em todo o corpo humano sem causar toxicidade, sua baixa permanência e necessidade de reinjeção sem causar rejeição, e por último, a efetividade da terapia gênica em modelos animais de grande porte (Blankinship et al., 2006; Yuasa et al., 2007; Muntoni and Wells, 2007).

Outras abordagens terapêuticas que têm sido avaliadas em modelos animais incluem drogas inibidoras da via de proteassomas responsáveis pela degradação de proteínas no músculo, a indução da super-expressão de genes relacionados com o reparo muscular, e inibição daqueles associados ao processo de degeneração e fibrose (O'Brien and Kunkel, 2001).

Concomitante aos estudos em modelos animais, já se encontram em andamento estudos clínicos avaliando a segurança da administração de AVV em pacientes com DMD, administração de oligonucleotídeos antisense para indução de *exon skipping* e avaliação de drogas que atuam no mecanismo de tradução do RNA, como por exemplo, a gentamicina (Howard et al., 2004; Wells et al., 2003; O'Brien and Kunkel, 2001; Benchaouir et al., 2007; Chamberlain and Chamberlain, 2010).

A gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo que ignora os chamados códons de parada gerados pela mutação de ponto em pacientes

com mutações *nonsense* (Howard et al., 2004). A grande vantagem da gentamicina é que é uma droga muito conhecida e de uso regular em medicina. Por outro lado, as grandes desvantagens são a forma de aplicação, que deve ser injetável, e os efeitos colaterais para a função auditiva (surdez) e renal (insuficiência renal). Além disso, é sabido que os efeitos desse antibiótico só seriam aplicáveis em pacientes que tivessem mutação de ponto, que constituem a minoria dos casos. Em camundongos *mdx*, mais de 20% de distrofina foi produzida com o uso de gentamicina. No entanto, em estudos realizados com portadores de Duchenne e de Distrofia de Cinturas não foi constatado o restabelecimento da produção da proteína ausente. Não obstante, os pacientes apresentaram redução dos níveis da enzima creatina quinase sérica, o que poderia indicar menor agressão muscular (O'Brien & Kunkel, 2001).

Outros tratamentos medicamentosos têm sido testados no sentido de prolongar a sobrevivência de pacientes com PMDs. Os corticóides são medicamentos utilizados na tentativa de melhorar parcialmente a função pulmonar e diminuir o ritmo de perda da força muscular em pacientes com PMDs. A prednisolona e deflazacort são os corticóides mais usados na prática clínica para tal finalidade. Inclusive, a prednisolona tem sido indicada para crianças portadoras de DMD para manter a deambulação e prevenir ou retardar a escoliose, que é uma deformidade óssea frequente nestes pacientes. No entanto, estas drogas possuem efeitos colaterais importantes, incluindo obesidade, catarata, distúrbio do crescimento, diabetes, hipertensão arterial e osteoporose (Wong and Christopher, 2002; Merlini et al., 2003).

Cabe ressaltar que todos os métodos descritos são experimentais e/ou paliativos e ainda não existe nenhum tratamento efetivo para esse grupo de doenças. Contudo, a utilização de células-tronco tem sido considerada como uma abordagem terapêutica promissora para as diferentes formas de distrofias musculares e, portanto, será considerada em mais detalhes no tópico a seguir.

4.1. Células-tronco

Células-tronco são definidas pela sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplos tipos celulares. Graças a essas características, as células-tronco têm sido extensivamente estudadas como alternativa terapêutica para inúmeras doenças degenerativas e incapacitantes, onde o objetivo imediato é restaurar o funcionamento de tecidos e/ou órgãos por meio da proteção celular ou reposição de células danificadas por células saudáveis.

De acordo com a sua origem, as células-tronco se classificam em adultas ou embrionárias. Além disso, elas podem ser caracterizadas de acordo com o seu potencial em gerar diferentes tecidos.

As células-tronco embrionárias (CTEs) são definidas como pluripotentes, uma vez que são capazes de se diferenciar em todos os 216 tecidos que compõem o organismo humano. Tradicionalmente, elas são derivadas a partir da massa celular interna de blastocistos provenientes de embriões extranumerários produzidos nas clínicas de fertilização *in vitro* e doados à pesquisa pelos casais responsáveis, de acordo com as legislações vigentes em cada país (Thomson et al., 1998). Mais recentemente, células-tronco pluripotentes foram produzidas por meio da reprogramação de células adultas. Essas células são conhecidas como células-tronco pluripotentes induzidas (iPS, do inglês *induced pluripotent stem cells*) e possuem vantagem em relação às CTEs por não levantarem nenhum problema ético na sua obtenção (Klimanskaya et al., 2006; Nakagawa et al., 2007; Takahashi et al., 2007). No entanto, alguns trabalhos publicados mostram que as células iPS possuem diferenças quando comparadas às CTEs (Doi et al., 2009; Urbach et al., 2010). Quanto à aplicação terapêutica de CTEs, além da questão ética, dificuldades técnicas como compatibilidade genética entre doador e receptor e controle da formação de tumores são grandes desafios a serem superados com a pesquisa.

As células-tronco adultas (CTAs), por sua vez, não apresentam os impasses éticos relacionados à pesquisa com CTEs, uma vez que podem ser

obtidas a partir de diversas fontes biológicas, muitas vezes descartadas após procedimentos cirúrgicos, incluindo-se o cordão umbilical, a medula óssea, polpa dentária, tecido adiposo, trompas de falópio, músculo orbicular do lábio, dentre outros (Zuk et al., 2001; Covas et al., 2003; Seo et al., 2004; Jazedje et al., 2009a; Gronthos et al., 2002; Romanov et al., 2003).

Com relação ao potencial de diferenciação, as CTAs são definidas como:

- a. unipotentes: capazes de se diferenciarem em um único tipo celular;
- b. oligopotentes: capazes de se diferenciarem em poucos tipos celulares;
- c. multipotentes: dão origem a vários, porém limitados, tipos celulares;

Em relação aos tipos de CTAs, duas populações principais se destacam: células-tronco hematopoiéticas (HSCs; do inglês *hematopoietic stem cells*) e células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês *mesenchymal stem cells*). Tradicionalmente as HSCs são isoladas da medula óssea, porém, mais recentemente, o mesmo protocolo também está sendo realizado com o sangue do cordão umbilical. As HSCs por definição são capazes de originar toda a linhagem de células sanguíneas e as mesmas podem ser identificadas por uma série de marcadores de superfície celular, como CD34, CD38, CD45, CD133, dentre outros. Ao contrário das HSCs que crescem em suspensão *in vitro*, as MSCs são cultivadas aderidas nas placas de cultura. MSCs, hoje mais comumente conhecidas como células-tronco estromais mesenquimais, compreendem uma população de células progenitoras multipotentes capazes de diferenciar em vários tipos celulares de origem mesodérmica, incluindo condrócitos, osteócitos e adipócitos (Deans and Moseley, 2000). Além disso, estas células podem ser caracterizadas com os marcadores de superfície celular CD29, CD90, SH2, SH3, SH4, dentre outros.

As células-tronco provenientes do cordão umbilical apresentam um forte atrativo para o uso em terapias celulares devido à presença da fração hematopoiética e mesenquimal. Ademais, o cordão umbilical é geralmente descartado após o parto e sua coleta é realizada por um método simples,

seguro e não doloroso, não causando nenhum dano para a mãe ou para a saúde do recém-nascido. Cabe ressaltar ainda que as células-tronco do cordão, por serem mais “imaturas”, apresentam maior potencialidade e capacidade proliferativa frente a outros tipos de CTAs. Sua fração hematopoiética vem sendo utilizada com sucesso, desde o final da década de 80, para tratar diversas doenças hematológicas. Já o potencial terapêutico da fração mesenquimal vem sendo explorada *in vitro* e *in vivo* devido à maior plasticidade destas células em relação à fração hematopoiética.

4.1.1. Otimizando a Terapia celular para DMPs

Inicialmente usadas no tratamento de doenças hematológicas e distúrbios auto-imunes, o transplante de HSCs tem sido proposto como alternativa para terapia de outras doenças degenerativas. Entretanto, no caso das distrofias musculares, a maioria dos ensaios pré-clínicos demonstraram que HSCs não foram capazes de restaurar a expressão das proteínas musculares deficientes em níveis clinicamente relevantes (Dell’Agnola et al., 2004; Lapidos et al., 2004; Kuhr et al., 2007). Estudos previamente realizados em nosso laboratório relataram resultados similares ao transplantar HSCs provenientes de sangue de cordão umbilical em cães GRMDs (Zucconi et al., 2011). Recentemente, Kang et al (2010) também publicaram a ineficácia do transplante de HSCs em um paciente com DMD. Assim, abordagens terapêuticas atualmente em experimentação incluem o transplante de outros tipos de células-tronco.

Sampaolesi e colaboradores (2006) demonstraram que células-tronco isoladas dos vasos de biópsias musculares, denominadas mesoangioblastos, foram capazes de promover uma melhora funcional dos animais injetados e restaurar a expressão de distrofina em 70% das fibras musculares de cães GRMD, após injeções consecutivas via artéria femoral. Apesar do grande impacto do trabalho, este foi criticado internacionalmente devido ao uso de ciclosporina – uma droga anti-inflamatória que poderia ser

responsável por si só pela melhora clínica – e pelo método subjetivo de avaliação física dos animais.

Um tipo de CTA que vem se destacando em estudos pré-clínicos e clínicos é a MSC. A facilidade de isolamento e cultivo, aliada a propriedades como capacidade de expansão *in vitro* e de migração *in vivo*, capacidade multipotente de diferenciação celular, poucas restrições relacionadas às interações com o sistema imunológico e atividade imunossupressora, aumentam o potencial de aplicação de MSCs na área de medicina regenerativa (Kassem *et al.*, 2004; Le Blanc and Pittenger, 2005; Caplan and Dennis, 2006; Caplan and Correa, 2011).

Embora o uso terapêutico das MSCs tem sido extensivamente estudado, os dados apresentados ainda são um tanto quanto controversos. Em relação às distrofias musculares, um dos trabalhos pioneiros com MSCs de medula óssea mostrou que essas células foram utilizadas com sucesso em transplantes para reparo muscular em *mdx* (Dezawa *et al.*, 2005). Entretanto, a quantidade de MSCs obtidas da punção de medula óssea é pequena (aproximadamente uma célula-tronco por 10^5 células aderentes), o que gera a necessidade de uma grande expansão celular *in vitro* para obter um número suficiente de células para transplante. Mais recentemente foi relatada a injeção de MSCs de medula óssea, transfectadas com vetores virais expressando PAX-3, em camundongos *mdx*. Ao contrário dos resultados demonstrados anteriormente, neste estudo os autores observaram que, apesar da restauração da expressão da distrofina, não houve melhora clínica da musculatura dos animais (Gang *et al.*, 2009).

Em relação ao possível processo de diferenciação miogênica das células transplantadas no tecido hospedeiro, ensaios pré-clínicos também demonstraram resultados discrepantes. Em camundongos *SJL*, MSCs humanas obtidas de lipoaspirado injetadas sistemicamente (veia caudal), sem imunossupressão, migraram para a musculatura, se diferenciaram em músculo – comprovado pela presença de proteínas musculares – e melhoraram o

quadro clínico dos animais afetados (Vieira et al., 2008) . Por outro lado, o mesmo experimento realizado com MSCs de cordão umbilical humano mostrou que embora as células-tronco tenham migrado para o músculo dos animais injetados não foi possível detectar a presença de proteínas musculares humanas. Mesmo assim, os animais apresentaram um aparente benefício clínico (Vieira et al., 2010).

No modelo canino GRMD, a injeção de MSCs de polpa dentária humana mostrou resultados promissores após repetidas injeções por via sistêmica (Kerkis et al., 2008). Entretanto, os resultados foram significativamente melhores com MSCs de tecido adiposo humano, injetadas pela artéria femoral; as células injetadas migraram para os músculos distróficos sem causar nenhum efeito colateral e proteínas musculares humanas foram encontradas no músculo dos cães injetados, mesmo após seis meses dos transplantes (Vieira et al., 2011). Corroborando com os resultados obtidos nos modelos murinos, as MSCs de tecido de cordão umbilical humano não mostraram a mesma habilidade para se diferenciar em células musculares e restaurar a expressão de distrofina quando injetadas nos cães GRMD, em comparação com aquelas obtidas de tecido adiposo (Zuncconi et al., 2011). Por outro lado, estudos mais recentes destacaram o potencial miogênico *in vivo* e *in vitro* de MSCs de cordão umbilical (Gang et al., 2004; Conconi et al., 2006; Jazedje et al., 2009; Kocaeft et al., 2010).

Apesar dos benefícios clínicos demonstrados nesses trabalhos, as variáveis responsáveis pelo sucesso do transplante de MSCs ainda não foram estabelecidas. A primeira hipótese estudada para justificar os efeitos benéficos da terapia celular é a diferenciação miogênica das células injetadas e, conseqüentemente, a restauração da expressão da proteína ausente no músculo distrófico. No entanto, os estudos têm mostrado que a recuperação funcional de modelos murinos e/ou caninos de DMD é independente do resgate da expressão de distrofina após transplante de MSCs, o que sugere que a sua diferenciação não é o mecanismo determinístico dos efeitos observados (Gang et al., 2009; English et al., 2010; Gharaibeh et al., 2011; da Justa Pinheiro et al.,

2011; Caplan and Correa, 2011). De fato, estudos publicados recentemente revelaram que a diferenciação miogênica das MSCs *in vivo* é um evento raro, ocorrendo em apenas pequena proporção, muitas vezes não detectáveis. A maioria dos estudos *in vitro* também reportou baixa eficiência na indução da miogênese de MSCs (Gharaibeh et al., 2011). Com base nos achados reportados anteriormente, deve-se considerar que o potencial miogênico de MSCs pode variar de acordo com o tecido de onde foram obtidas (Vieira et al., 2010; Gharaibeh et al., 2011). Além disso, é importante ressaltar que o micro ambiente do músculo distrófico também exerce influência na capacidade de diferenciação miogênica das células-tronco transplantadas e, portanto, deve ser avaliado em protocolos de terapia celular para distrofias musculares (Gharaibeh et al., 2011). Não obstante, a diferenciação miogênica de MSCs ainda permanece em debate e, trabalhos que tenham como objetivo a otimização desse processo continuam sendo de extrema importância.

Além da diferenciação miogênica direta das MSCs, outra hipótese cogitada para explicar os efeitos terapêuticos das MSCs em modelos experimentais de distrofias musculares é o efeito indireto como resultado da secreção de citocinas e fatores de crescimento, com ação tanto parácrina quanto autócrina. Sugere-se que os fatores secretados pelas MSCs exerceriam ação anti-apoptótica, anti-fibrogênica e anti-inflamatória, que contribuiriam para aliviar os sintomas e sinais clínicos do músculo distrófico (Ichim et al., 2010; English et al., 2010; da Justa Pinheiro et al., 2011; Caplan and Correa, 2011).

O entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nos efeitos promovidos pelas MSCs é fundamental para otimizar os benefícios clínicos da terapia celular. Além disso, outras questões essenciais ainda persistem e devem ser investigadas antes que a terapia celular possa se afirmar como uma alternativa de tratamento.

Com relação às MSCs, talvez a preocupação mais consistente seja seu potencial de originar outras linhagens celulares de mesoderme, tais como osso e tecido adiposo. Neste sentido, estratégias para prevenir a diferenciação

intramuscular das células-tronco injetadas em tipos celulares não desejados, incluem o seu estímulo, *ex vivo* ou *in situ*, com fatores relacionados com a indução da miogênese. Idealmente esse estímulo melhoraria seu potencial terapêutico e, simultaneamente, limitaria sua diferenciação em tecidos indesejáveis. Neste sentido, alguns trabalhos têm proposto a indução da super-expressão de genes relacionados com a cascata da miogênese em MSCs, sobretudo MyoD, com o intuito de aprimorar a diferenciação miogênica das células *in vitro* e *in vivo* (Gang et al., 2008; Gang et al., 2009; Wagner et al., 2009; Goudenege et al., 2009; Kocafe et al., 2010; Nitahara-Kasahara et al., 2011).

A manipulação do microambiente da lesão também é de extrema importância visando favorecer as ações diretas e/ou indiretas das MSCs no local da injúria e, conseqüentemente, otimizar os protocolos de terapia celular (Wagner et al., 2009). No caso das distrofias musculares, em estágios mais avançados da doença, os fatores solúveis liberados na musculatura esquelética em decorrência da inflamação crônica e da substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo podem acarretar na indução da diferenciação de MSCs para gordura e/ou tecido conectivo, ou ainda diminuir a sobrevida das células. Além disso, a fibrose que se instaura no músculo distrófico forma uma barreira que dificulta a sua re-população pelas MSCs injetadas. De fato, muitos dos resultados obtidos até o momento demonstraram que as células parecem não tolerar o ambiente pós-transplante e efetivamente regenerar o músculo em quantidades clinicamente relevantes. Neste caso, pode-se presumir que intervenções terapêuticas visando amenizar as alterações secundárias do músculo distrófico – tais como inflamação crônica e fibrose intersticial – são fundamentais para aumentar a efetividade dos transplantes celulares. Tendo em vista a complexidade da doença, é provável que tratamentos mais efetivos resultem de uma combinação de diferentes estratégias terapêuticas.

Considerando os inúmeros papéis desempenhados pelo IGF-1 durante o processo de reparo do músculo – tais como aumento da sobrevida, ativação e diferenciação miogênica de células satélites, modulação da

inflamação e redução da fibrose (Mourkioti & Rosenthal, 2005) – pode-se sugerir que a associação de MSCs e IGF-1 constitui uma alternativa atraente para o tratamento das distrofias.

Com base nessas premissas, este trabalho visa avaliar o potencial de MSCs de cordão umbilical humano associadas ao IGF-1, de diferenciar-se em células musculares *in vitro* e *in vivo*, restaurar a expressão proteica e a morfologia do músculo distrófico, atenuando os sinais clínicos associados à degeneração muscular.

II – CONCLUSÕES

- 1.** O tecido do cordão umbilical é a fonte mais rica e de fácil obtenção de MSCs, comparando-se com o sangue do cordão umbilical;
- 2.** MSCs humanas do sangue e do tecido do cordão umbilical, obtidos do mesmo doador, apresentam diferenças no perfil de expressão gênica;
- 3.** MSCs humanas de cordão umbilical são capazes de se diferenciar em células musculares esqueléticas e expressar distrofina *in vitro*, quando submetidas a dois protocolos distintos de diferenciação miogênica;
- 4.** Fatores solúveis liberados pelo músculo distrófico de camundongos *mdx* são capazes de induzir a diferenciação miogênica terminal de MSCs humanas de cordão umbilical *in vitro*;
- 5.** O IGF-1, por si só, é capaz de induzir a diferenciação miogênica terminal de MSCs humanas de cordão umbilical *in vitro*;
- 6.** MSCs humanas de cordão umbilical são capazes de interagir com células musculares de pacientes DMD *in vitro*, quando cultivadas em meios suplementados com IGF-1;
- 7.** A associação de MSCs humanas de cordão umbilical e IGF-1 promoveu uma melhora clínica significativa em camundongos distróficos LAMA2^{dy2j};
- 8.** MSCs humanas do cordão umbilical não são rejeitadas e são capazes de atingir à musculatura de camundongos distróficos LAMA2^{dy2j}, quando injetadas por via sistêmica em animais não imunossuprimidos;

- 9.** MSCs humanas de cordão umbilical não foram capazes de expressar a proteína distrofina humana *in vivo* após injeção em camundongos distróficos LAMA2^{dy2j}, mesmo quando associadas ao IGF-1;
- 10.** Os benefícios clínicos observados pelo tratamento conjunto de MSCs humanas de cordão umbilical e IGF-1 são resultado da combinação de ações anti-inflamatórias, anti-fibróticas e pró-regeneração promovidas pelas MSCs e IGF-1.

III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abmayr, S., Gregorevic, P., Allen, J.M., and Chamberlain, J.S. (2005). Phenotypic improvement of dystrophic muscles by rAAV/microdystrophin vectors is augmented by Igf1 codelivery. *Mol. Ther.* 12, 441-450.

Barton, E.R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H.L. (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J. Cell Biol.* 157, 137-148.

Bassett, D., and Currie, P.D. (2004). Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.* 31, 537-540.

Benchaouir, 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, 646-657.

Bernasconi, P., Torchiana, E., Confalonieri, P., Brugnoli, R., Barresi, R., Mora, M., Cornelio, F., Morandi, L., and Mantegazza, R. (1995). Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J. Clin. Invest.* 96, 1137-1144.

Bittner, R.E. et al. (1999). Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nature Genetics* 23, 141-142.

Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews* 82, 291-329.

Blankinship, M.J. et al. (2006). Gene therapy strategies for Duchenne Muscular Dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. *Molecular Therapy*, 13, 241-249.

Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81, 1189-1192.

Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.* 98, 1076-1084.

Caplan, A.I., and Correa, D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* 9, 11-15.

Chamberlain, J.R., and Chamberlain, J.S. (2010). Muscling in: Gene therapies for muscular dystrophy target RNA. *Nat. Med.* 16, 170-171.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Chargé, S.B., and Rudnicki, M.A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* *84*, 209-238.

Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., and Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* *433*, 760-764.

Conconi, M.T., Burra, P., Di Liddo, R., Calore, C., Turetta, M., Bellini, S., Bo, P., Nussdorfer, G.G., and Parnigotto, P.P. (2006). CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int. J. Mol. Med.* *18*, 1089-1096.

Covas, D.T. et al. (2003). Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol Res.* *36*, 1179-1183.

Da Justa Pinheiro, C.H., De Queiroz, J.C., Guimarães-Ferreira, L., Vitzel, K.F., Nachbar, R.T., De Sousa, L.G., De Souza-Jr, A.L., Nunes, M.T., and Curi, R. (2011). Local Injections of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Inflammation and Increase Angiogenesis Ameliorating the Dystrophic Phenotype in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscle. *Stem Cell Rev.* [Epub ahead of print].

Dalkilic, I., and Kunkel, L.M. (2003). Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 231-238.

De Lima, A.R. et al. (2007). Muscular dystrophy-related quantitative and chemical changes in adenyphysis GH-cells in golden retrievers. *Growth Horm. IGF Res.* *17*, 480-491.

Deans, R.J., and Moseley, A.B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* *28*, 875-884.

Dell'Agnola, C., Wang, Z., Storb, R., Tapscott, S.J., Kuhr, C.S., Hauschka, S.D., Lee, R.S., Sale, G.E., Zellmer, E., Gisburne, S., et al. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood.* *104*, 4311-4318.

Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C., and Nabeshima, Y. (2005). Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* *309*, 314-317.

De Luca, A. et al. (1999). Higher content of insulin-like growth factor-I in dystrophic mdx mouse: potential role in the spontaneous regeneration through an electrophysiological investigation of muscle function. *Neuromuscul Disord* *9*, 11-18.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Di Mario, J., Buffinger, N., Yamada, S., and Strohman, R.C. (1989). Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 244, 688-690.

Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., Miller, J., Schlaeger, T., Daley, G.Q., and Feinberg, A.P. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 41, 1350-1353.

Dubowitz, V. (1999). 68th ENMC international workshop: On Congenital Muscular Dystrophy, 9-11, April 1999, Naarden, The Netherlands: *Neuromuscul. Disord.* 9, 446-454.

Ehmsen, J., Poon, E., and Davies, K. (2002). The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 115, 2801-2803.

Emery, A.E. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* 359, 687-695.

English, K., French, A., and Wood, K.J. (2010). Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell* 7, 431-442.

Gang, E.J., Jeong, J.A., Hong, S.H., Hwang, S.H., Kim, S.W., Yang, I.H., Ahn, C., Han, H., and Kim, H. (2004). Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells.* 22, 617-624.

Gang, E.J., Bosnakovski, D., Simsek, T., To, K., and Perlingeiro, R.C. (2008). Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage. *Exp. Cell Res.* 314, 1721-1733.

Gang, E.J., Darabi, R., Bosnakovski, D., Xu, Z., Kamm, K.E., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C., (2009). Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Exp. Cell Res.* 315, 2624-2636.

Gehrig, S.M., Ryall, J.G., Schertzer, J.D., and Lynch, G.S. (2008). Insulin-like growth factor-I analogue protects muscles of dystrophic mdx mice from contraction-mediated damage. *Exp. Physiol.* 93, 1190-1198.

Gharaibeh, B., Lavasani, M., Cummins, J.H., and Huard, J. (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. *Stem Cell Res. Ther.* 2, 31.

Gosselin, L.E., Williams, J.E., Deering, M., Brazeau, D., Koury, S., and Martinez, D.A. (2004). Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* 30, 645-653.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Goudenege, S., Pisani, D.F., Wdziekonski, B., Di Santo, J.P., Bagnis, C., Dani, C., and Dechesne, C.A. (2009). Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol. Ther.* *17*, 1064-1072.

Gronthos, S. et al. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* *81*, 531-535.

Grounds, M.D., and Davies, K.E. (2007). The allure of stem cell therapy for muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* *17*, 206-208.

Guicheney, P., Vignier, N., Helbling-Leclerc, A., Nissinen, M., Zhang, X., Cruaud, C., Lambert, J.C., Richelme, C., Topaloglu, H., Merlini, L., et al. (1997). Genetics of laminin alpha 2 chain (or merosin) deficient congenital muscular dystrophy: from identification of mutations to prenatal diagnosis. *Neuromuscul.* *7*, 180-186.

Hayashi, Y.K., Ishihara, T., Domen, K., Hori, H., and Arahata K. (1997). A benign allelic form of laminin alpha 2 chain deficient muscular dystrophy. *Lancet.* *349*, 1147.

Heslop, L., Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2000). Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *Journal of Cell Science* *113*, 2299-2308.

Hillaire, D., Leclerc, A., Fauré, S., Topaloglu, H., Chiannikulchaï, N., Guicheney, P., Grinas, L., Legos, P., Philpot, J., Evangelista, T., et al. (1994). Localization of merosin-negative congenital muscular dystrophy to chromosome 6q2 by homozygosity mapping. *Hum. Mol. Genet.* *3*, 1657-1661.

Hoffman, E.P. et al. (1988). Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* *318*, 1363-1368.

Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* *51*, 919-928.

Howard, M.T. et al. (2004). Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Annals of Neurology* *55*, 422-426.

Ichim, T.E., Alexandrescu, D.T., Solano, F., Lara, F., Campion, R. de N., Paris, E., Woods, E.J., Murphy, M.P., Dasanu, C.A., Patel, A.N., Marleau, A.M., Leal, A., and Riordan NH. (2010). Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol.* *260*, 75-82.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Jazedje, T. et al. (2009a). Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *J. Transl. Med.* 7, 46.

Jazedje, T. et al. (2009). Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with or without differentiation induction in vitro. *J. Transl. Med.* 7, 6.

Jones, K.J., Kim, S.S., and North, K.N. (1998). Abnormalities of dystrophin, the sarcoglycans, and laminin alpha2 in the muscular dystrophies. *J. Med. Genet.* 35, 379-386.

Kang, P.B., Lidov, H.G., White, A.J., Mitchell, M., Balasubramanian, A., Estrella, E., Bennett, R.R., Darras, B.T., Shapiro, F.D., Bambach, B.J. et al. (2010). Inefficient dystrophin expression after cord blood transplantation in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 41, 746-750.

Kassem, M. et al. (2004). Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95, 209-214.

Kerkis, I., Ambrosio, C.E., Kerkis, A., Martins, D.S., Zucconi, E., Fonseca, S.A., Cabral, R.M., Maranduba, C.M., Gaiad, T.P., Morini, A.C., et al. (2008). Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic? *J. Transl. Med.* 6, 35.

Klimanskaya, I. et al. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485.

Kocaeffe, C., Balci, D., Hayta, B.B., and Can, A. (2010). Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem Cell Rev.* 6, 512-522.

Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (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, 509-517.

Koenig, M. et al. (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *American Journal of Human Genetics* 45, 498-506.

Kuhr, C.S., Lupu, M., and Storb, R. (2007). Hematopoietic cell transplantation directly into dystrophic muscle fails to reconstitute satellite cells and myofibers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 886-888.

Kumar, A., Yamauchi, J., Girgenrath, T., and Girgenrath, M. (2011). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor 1 improves outcome in

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Lama2Dy-w mice, a model for congenital muscular dystrophy type 1A. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2333-2343.

Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Middlesworth, W., Ochs, H.D., and Latt, S.A. (1985). Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82, 4778-4782.

Laguens, R. (1963). Satellite Cells of Skeletal Muscle Fibers in Human Progressive Muscular Dystrophy. *Virchows Archiv fur Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinische Medizin* 336, 564-569.

Lapidos, K.A., Chen, Y.E., Earley, J.U., Heydemann, A., Huber, J.M., Chien, M., Ma, A., and McNally, E.M. (2004). Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 114, 1577-1585.

Le Blanc, K., and Pittenger, M. (2005). Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 7, 36-45.

Liu, M. et al. (2005). Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol. Ther.* 11, 245-256.

Merlini, L. et al. (2003). Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle and Nerve* 27, 222-227.

Mourkioti, F., and Rosenthal, N. (2005). IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol* 26, 535-42.

Muntoni, F., and Wells, D. (2007). Genetic treatments in muscular dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 590-594.

Nakagawa, M. et al. (2007). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology* 26, 101-106.

Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Okada, H., Wada-Maeda, M., Nakamura, A., Okada, T., and Takeda S. (2011). Long-term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells That Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs With Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* [Epub ahead of print].

O'Brien, K.F., and Kunkel, L.M. (2001). Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism* 74, 75-88.

Partridge, T. (1991). Animal models of muscular dystrophy--what can they teach us? *Neuropathol Appl. Neurobiol.* 17, 353-363.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Passos-Bueno, M.R., Vainzof, M., Marie, S.K., and Zatz, M. (1994). Half the dystrophin gene is apparently enough for a mild clinical course: confirmation of its potential use for gene therapy. *Hum. Mol. Genet.* 3, 919-922.

Passos-Bueno, M.R., Vainzof, M., Moreira, E.S., and Zatz, M. (1999). Seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *American Journal of Medical Genetics* 82, 392-398.

Peault, B. et al. (2007). Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Molecular Therapy* 15, 867-877.

Pelosi, L., Giacinti, C., Nardis, C., Borsellino, G., Rizzuto, E., Nicoletti, C., Wannenes, F., Battistini, L., Rosenthal, N., Molinaro, M., et al. (2007). Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J.* 21, 1393-1402.

Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M. and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3710-3714.

Rando, T.A. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24, 1575-1594.

Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A., and Smirnov, V.N. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21, 105-110.

Rooney, J.E., J. V. Welser, et al. (2006). Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin. *J. Cell Sci.* 119, 2185-2195.

Sacco, A., Doyonnas, R., LaBarge, M.A., Hammer, M.M., Kraft, P., and Blau, H.M. (2005). IGF-I increases bone marrow contribution to adult skeletal muscle and enhances the fusion of myelomonocytic precursors. *J. Cell Biol.* 171, 483-492.

Sakuma, K. et al. (2000). Postnatal profiles of myogenic regulatory factors and the receptors of TGF-beta 2, LIF and IGF-I in the gastrocnemius and rectus femoris muscles of dy mouse. *Acta Neuropathol* 99, 169-176.

Sampaolesi, M. et al. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444, 574-579.

Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., and Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 364, 149-155.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

- Sharp, N.J. et al. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115-121.
- Sparks, S.E., and Escolar, D.M. (2011). Congenital muscular dystrophies. *Handb. Clin. Neurol.* 101, 47-79.
- Squire, S., Raymackers, J.M., Vandebrouck, C., Potter, A., Tinsley, J., Fisher, R., Gillis, J.M., and Davies, K.E. (2002). Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum. Mol. Genet.* 11, 3333-3344.
- Steffen, L.S. et al. (2007). Zebrafish orthologs of human muscular dystrophy genes. *BMC Genomics* 8, 79.
- Sunada, Y., Bernier, S.M., Kozak, C.A., Yamada, Y., and Campbell, K.P. (1994). Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *Journal of Biological Chemistry* 269, 13729-13732.
- Sunada, Y., Bernier, S.M., Utani, A., Yamada, Y., and Campbell, K.P. (1995). Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. *Human Molecular Genetics* 4, 1055-1061.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Thomson, J. A. et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 5391, 1145-1147.
- Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J.M., and Davies, K. (1998). Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat. Med.* 4, 1441-1444.
- Tidball, J.G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, 345-353.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., and Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 6, 407-411.
- Urish, K. et al. (2005). Initial failure in myoblast transplantation therapy has led the way toward the isolation of muscle stem cells: potential for tissue regeneration. *Curr. Top. Dev. Biol.* 68, 263-280.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Vachon, P., H., F. Loechel, et al. (1996). Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J. Cell Biol.* 134, 1483-1497.

Vainzof, M., and Zatz, M. (2003). Protein defects in neuromuscular diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36, 543-555.

Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Takata, R.I., Pavanello Rde, C., and Zatz, M. (1993a). Intrafamilial variability in dystrophin abundance correlated with difference in the severity of the phenotype. *J. Neurol. Sci.* 119, 38-42.

Vainzof, M., Takata, R.I., Passos-Bueno, M.R., Pavanello, R.C., and Zatz, M. (1993b). Is the maintainance of the C-terminus domain of dystrophin enough to ensure a milder Becker muscular dystrophy phenotype? *Hum. Mol. Genet.* 2, 39-42.

Vainzof, M., Ayub-Guerrieri, D., Onofre, P.C., Martins, P.C., Lopes, V.F., Zilberztajn, D., Maia, L.S., Sell, K., and Yamamoto, L.U. (2008). Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J. Mol. Neurosci.* 34, 241-248.

Van Deutekom, J.C., and Van Ommen, G.J. (2003). Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 4, 774-783.

Vieira, N. M. 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* 26, 2391-2398.

Vieira, N.M., Zucconi, E., Bueno, C.R. Jr., Secco, M., Suzuki, M.F., Bartolini, P., Vainzof, M., and Zatz, M. (2010) Human multipotent mesenchymal stromal cells from distinct sources show different in vivo potential to differentiate into muscle cells when injected in dystrophic mice. *Stem Cell Rev.* 6, 560-566.

Vieira, N. M., Valadares, M., Zucconi, E., Secco, M., Bueno, C.R. Jr., Brandalise, V., Assoni, A., Gomes, J., Landini, V., Andrade, T., et al. (2011). 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 Transplant.* [Epub ahead of print].

Wagner, J., Kean, T., Young, R., Dennis, J.E., and Caplan, A.I. (2009). Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 531-536.

Wang, B. et al. (2000). Adeno-associated virus carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophin in mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13714-13719.

Capítulo 1 – Referências Bibliográficas

Wells, K.E., Fletcher, S., Mann, C.J., Wilton, S.D., and Wells, D.J. (2003). Enhanced in vivo delivery of antisense oligonucleotides to restore dystrophin expression in adult mdx mouse muscle. *FEBS Letters* 552, 145-149.

Winand, N.J., Edwards, M., Pradhan, D., Berian, C.A., and Cooper, B.J. (1994). Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4, 433-445.

Wong, B.L., and Christopher, C. (2002). Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J. Child Neurol.* 17, 183-190.

Yablonka-Reuveni, Z., and Anderson, J.E. (2006). Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Dev. Dyn.* 235, 203-212.

Yuasa, K. et al. (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther.* 17, 1240-1260.

Zammit, P.S., T. A. Partridge, et al. (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem Cytochem* 54, 1177-1191.

Zatz, M., Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy: one gene with different phenotypes, one phenotype with different genes. *Curr. Opin. Neurol.* 13, 511-517.

Zatz, M., De Paula, F., Starling, A., and Vainzof, M. (2003). The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 13, 532-544.

Zuconi, E., Vieira, N.M., Bueno, C.R. Jr., Secco, M., Jazedje, T., Costa Valadares, M., Fussa Suzuki, M., Bartolini, P., Vainzof, M., and Zatz, M. (2011). Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J. Biomed Biotechnol.* 2011:715251.

Zuk, P.A. et al. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 7, 211-228.