CARLOS HERMANO DA JUSTA PINHEIRO

**Efeito da Terapia com Células-Tronco Musculares e
Células-Tronco Mesenquimais na Regeneração do
Músculo Esquelético: Modulação por Ácido Oléico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

CARLOS HERMANO DA JUSTA PINHEIRO

**Efeito da Terapia com Células-Tronco Musculares e
Células-Tronco Mesenquimais na Regeneração do
Músculo Esquelético: Modulação por Ácido Oléico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pinheiro, Carlos Hermano da Justa.

Efeito da terapia com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na regeneração do músculo esquelético: modulação por ácido oléico / Carlos Hermano da Justa Pinheiro. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Células-tronco e regeneração do músculo esquelético.

Versão do título para o inglês: Effect of muscle stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on skeletal muscle regeneration: modulatory effect of oleic acid.

1. Músculo esquelético 2. Regeneração (fenômenos biológicos) 3. Células-tronco 4. Ácidos graxos 5. Diferenciação celular 6. Proliferação celular I. Curi, Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB079/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carlos Hermano da Justa Pinheiro.

Título da Tese: Efeito da terapia com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na regeneração do músculo esquelético: modulação por ácido oléico.

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **068** nas fls. **58** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rui Curi, Coordenador(a) da Linha de pesquisa ***"Efeito da terapia com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na regeneração do músculo esquelético: Possível modulação por ácidos graxos"*** do qual participou o(s) alunos ***Carlos Hermanto da Justa Pinheiro*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **18.09.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 19 de setembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

A minha amada esposa (Denise) e filho
(David), pelo amor, carinho e por fazerem de
mim um ser humano pleno.

Ao meu querido pai (*In Memoriam*), pelo amor
e carinho.

Aos meus pais, pela vida, por todo
cuidado, carinho e amor que tiveram comigo.

A minha amada avó Miriam (*In Memoriam*),
pelo exemplo de vida, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela saúde, pela vida, pelas oportunidades e por sempre me iluminar.

Agradeço, a minha amada esposa (Denise G. Moura Pinheiro) por todo apoio compreensão, carinho e por estar sempre comigo em todos os momentos importantes.

Aos meus familiares que participaram de alguma forma dessa conquista, seja pelo apoio, seja pela compreensão.

Especialmente, ao meu pai, José Haroldo Gonçalves Pinheiro (In memorian). Sem o seu apoio e ajuda essa conquista teria sido mais difícil.

Agradeço a minha querida avó materna, Miriam Silveira da Justa (In memorian), por sempre ter acreditado no meu potencial e por ter sido tão importante na minha vida.

Agradeço à minha sogra, Maria Selma G. Moura, por todo apoio e compreensão.

Agradeço ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Rui Curi por ter aceitado me orientar no mestrado e doutorado, por sempre ter acreditado no meu potencial como cientista, por todos os conselhos e palavras amigas e por sempre nos incentivar o amor pela prática e ensino da ciência.

Aos amigos Kaio Fernando Vitzel e Lucas Guimarães Ferreira, pelo auxílio nos experimentos.

Ao Cláudio, do Biotério de Experimentação, por todo o auxílio prestado no uso de animais.

Aos funcionários do ICB: Adhemar Petri, José Roberto Mendonça e Tatiana C. Alba Loureiro pelos auxílios prestados.

Gostaria de agradecer à FAPESP pela bolsa de Doutorado que tornou possível a realização deste trabalho.

Agradeço também ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro dado ao laboratório.

Ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana e ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) por nos fornecer toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho científico.

*“How wonderful that we have met with a paradox. Now we have some hope of
making progress.”*

*“Que bom que nós nos encontramos com um paradoxo. Agora, temos alguma
esperança de progredir.”*

NIELS HENRICK DAVID, BOHR (FÍSICO DINAMARQUÊS)

(7/10/1885-18/11/1962)

RESUMO

PINHEIRO, C. H. J. **Efeito da terapia com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na regeneração do músculo esquelético: modulação por ácido oleico.** 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Durante a miogênese *in vitro* observou-se diminuição do conteúdo total de AGs saturados e aumento do conteúdo total de AGs insaturados com consequente aumento no índice de instauração. Houve aumento da expressão e do índice de atividade da delta-9-dessaturase que converte ácido esteárico em ácido oléico. O tratamento com ácido oléico aumentou o diâmetro dos miotubos em 3 e 7 dias após a indução da miogênese e também aumentou o conteúdo de fatores reguladores da miogênese (MyoD, miogenina e myf-6) e o conteúdo de cadeia pesada da miosina. O tratamento com ácido oléico (100 μ M) também diminuiu a taxa de proliferação de células-tronco musculares que foi avaliada pela incorporação de timidina marcada com carbono-14 e expressão de PCNA e ciclina D1. A sinalização Notch, que regula a proliferação e reprime a diferenciação nessas células, foi diminuída como pode ser observado pela diminuição do conteúdo de Hes-1. Houve também aumento do conteúdo de beta-catenina e inibição da GSK3-beta sugerindo que o aumento de ácido oléico durante a miogênese em células-tronco musculares pode estar associado à aceleração da diferenciação por inibição da sinalização Notch. O transplante autólogo e local (nas bordas da lesão) de células-tronco musculares melhorou a regeneração do músculo gastrocnêmio lesionado por laceração. O enxerto celular avaliado por expressão do gene SRY. Houve melhora parcial no ganho de força muscular (força tetânica) e promoveu aumento no conteúdo de marcadores de regeneração muscular incluindo miosina neonatal e desmina. Já o transplante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos machos melhorou a regeneração do músculo gastrocnêmio restaurou a força muscular (força tetânica) e aumento de marcadores de regeneração muscular como miosina neonatal e desmina indicando ter sido mais efetivo no tratamento desse tipo de lesão. Houve menor enxerto células-tronco musculares, pré-tratadas com ácido oléico, nos músculos lesionados. Nenhum efeito foi observado no enxerto de células-tronco mesenquimais, pré-tratadas *in vitro* com ácido oléico. Observou-se que nos músculos de animais que receberam terapia celular houve aumento da expressão de Hes-1, Pax7 e PCNA sugerindo ativação e proliferação das células transplantadas no tecido do receptor sendo que esse aumento não ocorreu nos animais que receberam transplante de células-tronco pré-tratadas com ácido oléico. O tratamento com ácido oléico também foi administrado a camundongos com distrofia muscular por deficiência de distrofina. Após 20 dias de suplementação, houve diminuição do número de fibras musculares com mionúcleo centralizado (marcador de fibras recém-formadas) e do diâmetro das fibras musculares do tibial anterior assim como menor expressão de Hes-1, Pax7 e PCNA. Conjuntamente, estes resultados sugerem que o ácido oleico acelera a diferenciação miogênica por um mecanismo associado à inibição da via de sinalização do Notch em células-tronco musculares. As células-tronco musculares tratados com ácido oleico apresentam baixa taxa de proliferação e reduzida capacidade regenerativa quando transplantadas no músculo esquelético lesionado. O ácido oléico é estimulador da miogênese e inibidor da sinalização Notch e ativação de células-tronco musculares.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Regeneração muscular. Células satélites. Células-tronco. Terapia celular. Ácidos graxos.

ABSTRACT

PINHEIRO, C. H. J. **Effect of muscle stem cells and mesenchymal stem cells transplantation on skeletal muscle regeneration:** modulatory effect of oleic acid. 2012. 96 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

During *in vitro* myogenesis, there is a decrease in total content of saturated fatty acids (FA) and increase of total content of unsaturated FA with consequent increase in unsaturation index. An increase in expression of mRNA delta-9-desaturase which converts stearic acid into oleic acid was observed when satellite cells (muscle stem cells) differentiated to myotubes. We demonstrated herein that oleic acid treatment (100 μ M) increased myotube diameter after 3 and 7 days of differentiation and also increased the content of myogenic regulatory factors (MRFs – MyoD, Myogenin and Myf6) as well content of myosin heavy chain (MHC). The treatment with oleic acid did also decreased cell proliferation rate evaluated by thymidine incorporation and expression of PCNA mRNA and cyclinD1 mRNA. Notch signaling pathway that regulates cell proliferation and inhibits myogenesis, was decreased (decreased content of Hes1, a Notch-target) in satellite cells by oleic acid treatment. There was also an increase in total content of beta-catenin and inhibition (by phosphorylation at serine 9) of GSK3 β suggesting that the increase in oleic acid content during myogenesis may be associated to acceleration of muscle differentiation due to Notch signaling pathway inhibition. Autologous and local transplantation of male muscle stem cells in injured skeletal muscle from female rats improved muscle regeneration and partially improved recovery of function. Muscle stem cell engraftment was evaluated by expression of SRY mRNA. Muscle stem cell transplantation increased markers of regeneration (such as neonatal MHC and desmin) in injured skeletal muscle. The transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells did also improved regeneration and restored function in injured skeletal muscle. In injured skeletal muscle, there was a low engraftment of muscle stem cells submitted to a pre-treatment with oleic acid compared to untreated muscle stem cells. The pre-treatment with oleic acid did not change mesenchymal stem cell engraftment in injured skeletal muscle. Following 48hrs of muscle stem cell transplantation, an increase in expression of Hes1, Pax7 and PCNA mRNA was observed in injured skeletal muscle suggesting activation and proliferation of muscle stem cells in host tissue. These effects did not occurred in rats that received muscle stem cells pre-treated with oleic acid. The treatment with oleic acid was also administered to *mdx* dystrophic mice (dystrophin-deficient mice). Oleic acid treatment for 20 days decreased number of fibres containing centralized myonuclei (a histologic marker of muscle regeneration), muscle fiber diameter and expression of Hes1, Pax7 and PCNA mRNA compared to untreated *mdx* mice. Taken together, these results suggested that oleic acid accelerates myogenic differentiation by a mechanism associated to inhibition of Notch signaling pathway in muscle stem cells. Muscle stem cells treated with oleic acid present low proliferative and regenerative capacities when transplanted into injured skeletal muscle. Oleic acid is a stimulatory factor on myogenesis and inhibitory factor of Notch signaling pathway and activation of muscle stem cells.

Key words: Skeletal muscle. Muscle regeneration. Satellite cells. Stem cells. Cellular therapy. Fatty acids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Célula satélite	18
Figura 2 - Ativação do programa miogênico em células-tronco musculares (células satélites)	20
Figura 3 - Envolvimento de células-tronco musculares (células satélites) e células-tronco de medula óssea na miogênese, reparo e hipertrofia muscular.....	22
Figura 4 - Alteração da composição total de ácidos graxos saturados e insaturados e índice de insaturação em células-tronco musculares durante a miogênese.....	39
Figura 5 - Alteração da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) em células-tronco musculares durante a miogênese	41
Figura 6 - Aumento do índice de atividade e expressão gênica da delta-9-dessaturase em células-tronco musculares durante a miogênese	42
Figura 7 – Efeito do tratamento com ácido oléico sobre a viabilidade de células-tronco musculares	43
Figura 8 – Aumento do diâmetro dos miotubos em 3 e 7 dias de diferenciação durante tratamento com ácido oléico.....	44
Figura 9 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo de fatores reguladores da miogênese (MyoD, miogenina e Myf-6) em miotubos após 3 dias de diferenciação	46
Figura 10 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo de cadeia pesada da miosina em miotubos após 7 dias de diferenciação	48
Figura 11 - Tratamento com ácido oléico aumenta seu próprio conteúdo em células-tronco musculares e miotubos	49
Figura 12 - Tratamento com ácido oléico diminui a taxa de proliferação de células-tronco musculares <i>in vitro</i>	50
Figura 13 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo de proteínas reguladoras da sinalização Notch em células-tronco musculares <i>in vitro</i>	52
Figura 14 - Efeito do ácido oléico na atividade nuclear do fator de transcrição NF-kappa B em células-tronco musculares	53
Figura 15 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo de total Beta-Catenina em células-tronco musculares <i>in vitro</i>	55
Figura 16 - Tratamento com ácido oléico inibe GSK3-beta em células-tronco musculares <i>in vitro</i>	55
Figura 17 - Tratamento com ácido oléico não altera o conteúdo de proteínas da sinalização Wnt em células-tronco musculares <i>in vitro</i>	56

Figura 18 - Marcadores de lesão e demonstração da regeneração incompleta no músculo gastrocnêmio lacerado.....	57
Figura 19 - Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas à lesão muscular e transplante de células-tronco musculares de machos.....	58
Figura 20 - Morfologia e expressão de MyoD em células-tronco musculares e mioblastos	59
Figura 21 - Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas lesão muscular e transplante de células-tronco musculares ou mioblastos de machos.....	59
Figura 22 - Efeito da terapia com células-tronco musculares na massa muscular esquelética após 28 dias da lesão.....	61
Figura 23 - Efeito da terapia com células-tronco musculares na força muscular (tetânica) após 28 dias da lesão	62
Figura 24 - Efeito da terapia com células-tronco musculares na nos marcadores de regeneração muscular após 28 dias da lesão.....	63
Figura 25 - Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas lesão muscular e transplante de células-tronco musculares ou células-tronco mesenquimais de machos	64
Figura 26 - Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais na massa muscular esquelética após 28 dias da lesão.....	65
Figura 27 - Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais na força muscular (tetânica) após 28 dias da lesão.....	66
Figura 28 - Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais na nos marcadores de regeneração muscular após 28 dias da lesão.....	67
Figura 29 – Efeito da terapia com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na morfologia muscular após 28 dias da lesão	68
Figura 30 – Desenho experimental para estudo do efeito do ácido oléico na terapia celular em ratos.....	69
Figura 31 - Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas lesão muscular e transplante de células-tronco musculares e mesenquimais de machos	70
Figura 32 - Efeito do ácido oleico na proliferação de células-tronco mesenquimais <i>in vitro</i>	71
Figura 33 - Expressão de marcadores de ativação de células-tronco musculares 48 horas após o transplante celular	72
Figura 34 – Desenho experimental para investigação do efeito do ácido oléico no enxerto e efeito de células-tronco musculares na regeneração do músculo esquelético.....	73

Figura 35 – Presença de fibras musculares esqueléticas expressando a GFP no músculo esquelético lesionado de camundongos selvagens que receberam terapia com células-tronco musculares pré-tratadas com ácido oléico	74
Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com ácido oléico (100 μ M) no enxerto e efeito do transplante de células-tronco musculares na recuperação funcional do músculo esquelético lacerado	75
Figura 37 - Efeito da suplementação com ácido oléico 0,45g/kg na morfologia e área de secção transversa do músculo tibial anterior em camundongos <i>mdx</i>	77
Figura 38 - Efeito da suplementação com ácido oléico na sinalização Notch, Pax7 e PCNA no músculo esquelético de camundongos <i>mdx</i>	78
Figura 39 - Envolvimento da β -Catenina na regulação da função de células-tronco musculares (células satélites)	82
Figura 40 – Mecanismo proposto para o efeito do ácido oléico na modulação da proliferação e diferenciação de células-tronco musculares	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados na reação de RT-PCR em tempo real	37
Tabela 2 - Efeito da suplementação com ácido oléico no diâmetro de fibras musculares e fibras com mionúcleo centralizado (marcador de regeneração) no músculo tibial anterior de camundongos distróficos <i>mdx</i>	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Células-tronco musculares</i>	17
1.2 <i>Regulação da ativação, proliferação e diferenciação de células-tronco musculares</i>	19
1.3 <i>Envolvimento de outras células-tronco na regeneração muscular</i>	20
1.4 <i>Laceração muscular</i>	22
1.5 <i>Terapia celular em lesões musculares</i>	23
1.6 <i>Ácidos graxos e funções celulares</i>	24
1.7 <i>Os ácidos graxos podem ter efeito modulador na miogênese e na regeneração muscular?</i>	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 <i>Aspectos bioéticos</i>	28
3.2 <i>Animais</i>	28
3.3 <i>Indução da lesão muscular</i>	28
3.4 <i>Isolamento da células-tronco musculares para cultivo</i>	29
3.5 <i>Ensaio de proliferação celular</i>	30
3.6 <i>Tratamento com ácido oléico em cultura celular</i>	30
3.7 <i>Determinação da composição de ácidos graxos em cultura de células-tronco musculares e células musculares esqueléticas diferenciadas</i>	30
3.8 <i>Análise da ativação do fator de transcrição NF-κB pelo ensaio de mobilidade eletroforética retardada (EMSA) em gel de poliacrilamida</i>	31
3.9 <i>Obtenção das células-tronco musculares e mioblastos para transplante</i>	32
3.10 <i>Suplementação com ácido oléico</i>	33
3.11 <i>Rastreamento das células-tronco transplantadas no tecido muscular lesionado</i>	33
3.12 <i>Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea</i>	33
3.13 <i>Obtenção das células-tronco mesenquimais de medula óssea para transplante</i>	33
3.14 <i>Análise da força muscular</i>	34
3.15 <i>Análise gravimétrica do músculo esquelético</i>	34
3.16 <i>Extração e quantificação de proteínas totais</i>	35
3.17 <i>Extração e quantificação de RNA total</i>	35
3.18 <i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	36
3.19 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real</i>	36
3.20 <i>Extração e quantificação de proteínas específicas por Western Blotting</i>	37
3.21 <i>Análise estatística</i>	38
4 RESULTADOS	39

4.1 <i>A miogênese é acompanhada de alterações na composição de ácidos graxos em miotubos derivados de células-tronco musculares</i>	39
4.2 <i>O tratamento com ácido oléico acelera a diferenciação miogênica e inibe a sinalização Notch em células-tronco musculares</i>	42
4.3 <i>Terapia com células-tronco musculares melhora a regeneração do músculo esquelético lesionado por laceração</i>	57
4.4 <i>Terapia com células-tronco mesenquimais melhora a regeneração do músculo esquelético lesionado por laceração.</i>	64
4.5 <i>Pré-tratamento com ácido oleico diminui o enxerto de células-tronco musculares e não tem efeito no enxerto de células-tronco mesenquimais</i>	69
4.6 <i>Suplementação diminui a capacidade regenerativa do músculo esquelético em camundongos com distrofia muscular</i>	76
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

A lesão muscular esquelética é um evento comum na prática desportiva e em politraumatizados. O músculo esquelético pode sofrer lesão através de mecanismos variados incluindo ações mecânicas diretas, como nos casos das lacerações e contusões musculares, e alongamento brusco e/ou excessivo como visto na distensão muscular (CRISCO et al., 1994; FUKUSHIMA et al., 2001).

A injúria muscular, imediatamente, inicia o processo de degeneração e inflamação que é seguido pela regeneração (preenchimento da área de lesão por novas fibras musculares) ou cicatrização (preenchimento da área de lesão por matriz extracelular, fibrose). Inicialmente, as fibras musculares necróticas são removidas do local da lesão por ação dos macrófagos (CARLSON e FAULKNER, 1983; HANNAFIN et al., 1994). Após a limpeza da área necrosada, novas fibras musculares surgem em decorrência da ativação, proliferação e diferenciação de células mononucleares multipotentes residentes no tecido muscular adulto em resposta a sinais locais que incluem a interleucina 6 (IL-6) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (CHAKRAVARTHY et al., 2000; HURME e KALIMO, 1992; SERRANO et al., 2008).

1.1 Células-tronco musculares

A capacidade de regeneração do músculo esquelético deve-se a presença de células-tronco musculares. Essas células, descritas primeiramente por Mauro na década de 60, foram denominadas de satélites devido a sua localização estratégica na periferia do sarcolema. A regeneração da lesão muscular só é possível devido à ativação dessas células satélites, uma vez que fibras musculares adultas não possuem capacidade de divisão celular (MAURO, 1961).

Figura 1 - Célula satélite.

(A) ilustração representativa da localização da célula satélite em relação à fibra muscular esquelética. (B) Imagem obtida por Mauro (1961) através de microscopia eletrônica na primeira descrição da célula satélite documentada na literatura científica. Sp = célula satélite; bm = membrana basal; mp = fibra muscular esquelética.

Fonte: Pinheiro (2012).

Atualmente sabemos que a população de células satélites é bastante heterogênea. Além das células mais comprometidas com a miogênese (*paired-box 7* ou Pax-7⁺, CD34⁺, M-Caderina⁺ e Sca-1⁺), vários outros tipos celulares com características de células-tronco e com graus diferentes de multipotencialidade já foram isolados a partir do músculo esquelético adulto. Dentre os principais tipos celulares que participam da regeneração muscular estão as células CD34⁺ e Sca-1⁺, mesoangioblastos (CD31⁺, CD34⁺, Flk-1⁺, Sca-1⁺, Thy1⁺ e c-Kit⁺) e células periféricas (*side population cells*; CD45⁺ e Sca-1⁺) (ASAKURA et al., 2002). No músculo esquelético, o fator de transcrição Pax-7 só é expresso em células satélites (termo que hoje em dia é bastante utilizado para designar células mais comprometidas com a miogênese) sendo bastante utilizado como marcador molecular para esse tipo celular (REIMANN et al., 2004; ZAMMIT et al., 2006). Embora existam tipos diferentes de células-tronco no músculo esquelético adulto, acredita-se que todas representem estágios diferentes de diferenciação de um único tipo celular e todas são consideradas células-tronco musculares. As células periféricas, por exemplo, podem expressar o Pax-7 e se diferenciar em mioblastos quando estimuladas após a lesão muscular. O mesmo já foi demonstrado em mesoangioblastos (SAMPAOLESI et al., 2006). Já, as células CD34⁺ e Sca-1⁺, isoladas recentemente e denominadas de células-tronco derivadas de músculo (*muscle derived stem cells*) apresentam maior potencialidade e capacidade de auto-renovação (DEASY et al., 2001).

1.2 Regulação da ativação, proliferação e diferenciação de células-tronco musculares

A proliferação e diferenciação das células satélites são reguladas pelas sinalizações Notch e Beta-catenina (BRACK et al., 2008). As células satélites possuem receptor Notch-1 que quando ativado por seu ligante (*Delta-like 1* e/ou *Jagged-1*) é clivado e transloca-se para o núcleo onde ativa a transcrição do gene *Hes-1*, um fator de transcrição envolvido na ativação do ciclo celular e inibição da expressão de genes responsáveis pela miogênese (LUO et al., 2005). Em um segundo momento, a expressão da proteína *Numb*, em uma das células-filhas, inibe a sinalização do Notch e permite a transcrição dos genes reguladores da miogênese (*MyoD*, *Miogenina* e *Myf-6*) (LUO et al., 2005). Outras proteínas importantes para ativação da diferenciação muscular pertencem à classe Wnt (BRACK et al., 2008). Para que a miogênese ocorra, é necessário que haja expressão dos fatores reguladores da miogênese e fatores de transcrição que iniciam a diferenciação muscular. O *MyoD*, a *miogenina* e o *myf-6* são os principais fatores reguladores da miogênese e são expressos em cascata nessa respectiva ordem somente na célula-tronco muscular em diferenciação (Para revisão, ver CHARGE e RUDINICKI, 2004). Células-tronco quiescentes (indiferenciadas) não apresentam conteúdo detectável de fatores reguladores da miogênese (SMITH et al., 1994). O *MyoD* é o primeiro gene expresso na diferenciação muscular. Sua expressão resulta no aumento da expressão de *p21*, inibidor da proliferação, culminando com a saída da célula do ciclo celular. Nesse momento, a célula adquire morfologia semelhante a de um fibroblasto, sendo denominada de *mioblasto*. Em seguida, o processo de diferenciação muscular é caracterizado pela expressão de *miogenina* e fusão dos *mioblastos* para formação dos *miotubos*. *Miotubos* primários se fundem com *miotubos* secundários que irão amadurecer e expressar proteínas musculares específicas como *miosina*, *creatina-quinase*, *troponina*, *miomesina*, *desmina* entre outras somente após a expressão do *Myf-6*.

Figura 2 - Ativação do programa miogênico em células-tronco musculares (células satélites).

Fonte: Pinheiro (2012).

1.3 Envolvimento de outras células-tronco na regeneração muscular

Além das células-tronco residentes no músculo, células-tronco de outros sítios também participam da regeneração muscular. A contribuição de células-tronco não musculares na regeneração do músculo esquelético foi descrita primeiramente por Ferrari et al. (1998). Esses autores demonstraram que células-tronco de medula óssea obtidas de camundongos transgênicos que expressam β -galactosidase quando transplantadas em animais que sofreram mieloablação, reconstituíam a medula óssea e migravam para o músculo esquelético lesionado por miotoxina. Após 3 semanas, haviam células do doador (β -gal⁺) no tecido muscular que havia sido lesionado por cardiotoxina. LaBarge e Blau (2002) também demonstraram um papel fisiológico das células-tronco de medula no *turnover* das células-tronco residentes no músculo esquelético. Nesse estudo, células-tronco de medula óssea expressando a proteína verde fluorescente (GFP; *Green fluorescent protein*) foram transplantadas em animais imunodeficientes. Após submeter esses animais ao exercício físico excêntrico, esses autores demonstraram que cerca de 3,5% dos mionúcleos eram GFP⁺ e as células marcadas apresentavam características morfológicas de células satélites, localização estratégica próxima ao sarcolema e expressão de marcadores moleculares específicos. Em seguida, isolaram clones dessas células satélites GFP⁺ e re-injetaram no tibial anterior lesionado por miotoxina em outros animais (segundo receptor). Com esse procedimento os autores demonstraram a formação de novas fibras contendo a GFP. Nesse estudo ficou

demonstrado que há um papel das células-tronco de medula óssea na renovação da população de células satélites no músculo esquelético sendo que o transplante dessas células também poderia ser estratégia promissora na regeneração muscular em miopatias graves.

O mecanismo quimioatraente envolvido na migração de células tronco de medula óssea para o músculo lesionado tem sido relacionado à expressão do *stromal derived factor 1* (SDF-1). O SDF-1 é expresso no músculo esquelético e na medula óssea. As células que possuem o receptor CXCR4 na membrana celular migram para o local onde o SDF-1 está expresso (MORIMOTO et al., 2007). Demonstrou-se que camundongos com expressão deficiente de CXCR4 apresentam miogênese defeituosa (ODEMIS et al., 2007). O CXCR4 e outra isoforma desse receptor, o CXCR2, são importantes para migração de progenitores endoteliais (CD133⁺) e promoção da angiogênese no tecido lesionado (HRISTOV et al., 2007). Dessa maneira, o eixo SDF-CXCR4 tem um papel importante na migração (*homing*) das células-tronco hematopoiéticas para o músculo esquelético após lesão e para a medula óssea após transplante mielóide (RATAJCZAK et al., 2003).

Figura 3 - Envolvimento de células-tronco musculares (células satélites) e células-tronco de medula óssea na miogênese, reparo e hipertrofia muscular.

Wnt - original de *Wingless*, descoberto primeiramente na *Drosophila*, são proteínas responsáveis pela regulação do destino (miogênico, adipogênico, osteogênico e fibrogênico) em células-tronco adultas. **MyoD** – *Myogenic differentiation factor* é um fator de transcrição com papel fundamental na diferenciação muscular. Pertence à família dos fatores de regulação miogênicos e é expresso em mioblastos. **Myf5** – *Myogenic factor 5* também é um fator de transcrição do programa miogênico, está associado a quiescência da célula satélite. **Pax7** – *Paired-box 7* é um fator de transcrição necessário derivar à célula satélite de células-tronco não-musculares (isto é, encontradas em outros tecidos). **MyoG** - *Myogenin* e **MRF4** – *Myogenic factor 6* (Myf6) são fatores de transcrição miogênicos envolvidos na coordenação da fusão de mioblastos e diferenciação terminal da fibra muscular, respectivamente. **Shh** - *Sonic hedgehog homolog* é uma de três proteínas na via de sinalização de mamíferos chamado *hedgehog*. Possui papel no controle da divisão celular em células tronco adultas. **Eya2** - *Eyes absent homolog 2* é uma proteína que age como co-fator para ativar genes alvos de *Six*, como *MyoD* e *MyoG*. **Six1** - *The sine oculis-related homeobox 1* é considerada o ápice da cascata que direciona progenitores dermomiotomais para a linhagem miogênica. **DACH2** - *dachshund homolog 2* – codifica uma proteína similar à *dachshund*, um fator transcricional envolvido no destino da célula. **Notch** – é uma via de sinalização celular para a morfogênese tecidual durante o desenvolvimento, mas também é envolvido na manutenção e reparo tecidual no adulto. **BMP** – *Bone morphogenetic protein* é um fator de crescimento se liga a receptores específicos traduzindo sinais para o núcleo celular.

Fonte: Adaptado de Parker et al. (2003).

1.4 Laceração muscular

Dentre os tipos de lesão muscular, as lacerações são consideradas de tratamento difícil em traumatologia. Além de resultar na necrose de grande quantidade de fibras adultas, esse tipo de lesão também danifica a lâmina basal atingindo as células satélites residentes. Observa-se que a laceração experimental no músculo gastrocnêmio de ratos tem regeneração incompleta sendo que, após 1 mês da indução da lesão, a força muscular desses animais é bem inferior aquela observada no grupo controle (MENETREY et al., 1999). A laceração resulta em regeneração lenta, fibrogênese intensa e recuperação incompleta da função muscular (CHAN et al., 2003; GARRETT et al., 1984; KÄÄRIÄINEN et al., 1998; MENETREY et al., 1999). A laceração é acompanhada por regeneração incompleta, diferentemente do que se observa em modelos de lesão muscular por toxinas onde mesmo sem tratamento o músculo esquelético se recupera espontaneamente (ARSIC et al., 2004; MENETREY et al., 1999). O processo de regeneração muscular em modelos experimentais pode ser estudado em diferentes períodos de tempos após a lesão através de técnicas histológicas e *western blotting* para marcadores específicos da miogênese e fibrogênese e por testes de função muscular (BORNEMANN e SCHMALBRUCH, 1992; BROCKS et al., 1991; HURME et al., 1991; HURME e KALIMO, 1992; LI et al., 2007; MENETREY et al., 1999; NEGISHI et al., 2005; STRATOS et al., 2007).

1.5 Terapia celular em lesões musculares

Nos últimos anos, as células-tronco tem sido utilizadas em diversos estudos em medicina regenerativa. O uso dessas células apresenta vantagens e desafios no tratamento de miopatias. Além da possibilidade de fornecer células contendo um genoma normal e com potencial miogênico para pacientes com distrofia muscular, também há a possibilidade de fornecer maior quantidade dessas células a fim de promover tratamento de lesões musculares graves que apresentam regeneração lenta e incompleta onde não há recuperação total da força muscular. Entretanto, o sucesso desse tipo de procedimento terapêutico ainda carece de evidências científicas nesse tipo de lesão muscular.

O potencial terapêutico das células-tronco adultas na regeneração muscular foi estudado por alguns grupos. Na medula óssea encontramos as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais ou de estroma (também encontradas no tecido adiposo e no tecido do cordão umbilical) (SECCO et al., 2008). As células-tronco mesenquimais são o tipo celular com maior pluripotencialidade presente na medula óssea e podem originar fibras musculares sob

certas condições experimentais *in vitro* (WAKITANI et al., 1995). No entanto, a migração desse tipo mais pluripotente de célula-tronco de medula óssea para o músculo esquelético não é observado *in vivo* em condições outras que não o transplante intravascular (PROCKOP, 1997). Quando injetadas em músculos lesionados, as células-tronco mesenquimais melhoram a regeneração do tecido por mecanismos ainda não totalmente elucidados (FERRARI et al., 1998). Esse tipo de transplante tem demonstrado benefícios também em diversos modelos experimentais de doenças.

Já em relação à terapia com células-tronco musculares, nos primeiros trabalhos foi avaliado o transplante alogênico em pacientes com Distrofia Muscular do tipo Duchenne (GUSSONI et al., 1992, 1997; MENDELL et al., 1995). Esses autores demonstraram que as células do doador se fundem com mioblastos do receptor e aumentam a expressão de distrofina no tecido muscular. Todas as células-tronco musculares, exceto as células periféricas CD45⁺, mostraram fusão eficiente com o músculo esquelético do receptor quando transplantadas em ratos distróficos (BACHRACH et al., 2006). Já, o transplante de mesoangioblastos foi o único que resultou em melhora funcional nos modelos experimentais de distrofia muscular (RANDO e BLAU, 1994; SAMPAOLESI et al., 2003). Entretanto, no transplante alogênico de células-tronco musculares, observaram-se algumas limitações como a baixa sobrevivência e baixa capacidade de migração das células transplantadas o que desencorajou a condução de estudos clínicos em pacientes com Distrofia Muscular (FAN et al., 1996; GUSSONI et al., 1997; MENDELL et al., 1995; MILLER et al., 1997; PARTRIDGE et al., 1998; QU et al., 1998; TREMBLAY et al., 1993). As dificuldades observadas na terapia celular com células satélites foram atribuídas à imuno-rejeição do transplante e à baixa capacidade de migração dessas células, uma vez que na Distrofia de Duchenne todo o músculo está comprometido. Recentemente, demonstrou-se que células satélites CXCR4⁺, assim como células-tronco hematopoiéticas que também expressam esse receptor, podem migrar para sítios de lesão no músculo esquelético. Entretanto, o efeito da terapia celular em lacerações musculares ainda não foi claramente demonstrado.

1.6 Ácidos graxos e funções celulares

Os lipídeos e as gorduras consistem de uma classe numerosa de compostos que incluem os monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos triacilglicerídeos, fosfatídeos, cerebrosídeos, esteróis, terpenos e ácidos graxos. Os ácidos graxos (AGs) consistem de elementos como carbono, hidrogênio e oxigênio que estão dispostos em uma cadeia linear de esqueleto de carbono de tamanhos variáveis e com um grupo carboxila em uma das extremidades. Os AGs podem ser

saturados (sem nenhuma dupla ligação), monoinsaturados ou MUFA (uma única dupla ligação) ou poliinsaturados ou PUFA (com duas ou mais duplas ligações) sendo essenciais para funções metabólicas e estruturais nas células (CHOW, 2007).

Os AGs são importantes constituintes e determinantes da fluidez da membrana celular (DAS, 2008, 2010). Os PUFA podem dar origem a prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos que possuem atividades biológicas importantes (DAS, 2006a, b). Dessa maneira, esses AGs geram precursores de moléculas pro e anti-inflamatórias que podem interferir na fisiopatologia de doenças crônicas. Em adição a isso, em processos inflamatórios, a nitração de AGs insaturados leva a formação de nitrolipídeos que estimulam o relaxamento da musculatura lisa vascular, inibição da função de neutrófilos e supressão da inflamação (DAS, 2006a, b). Nos últimos anos, várias evidências (CHOW, 2007; DAS, 2002, 2006a, b) da ação modulatória de AGs na função de diversos tipos celulares vem sendo reportada e esses efeitos estão associados à alteração da fluidez da membrana celular ação como segundo-mensageiros; ação mediada por PPAR, melhora da produção endotelial de óxido nítrico, inibição da ativação de leucócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina 6 e fator de necrose tumoral (TNF) alfa; prevenção da agregação plaquetária e regulação do comprimento dos telômeros (DAS, 2006a, b).

1.7 Os ácidos graxos podem ter efeito modulador na miogênese e na regeneração muscular?

Há poucos trabalhos sobre o envolvimento dos ácidos graxos na miogênese ou na regeneração muscular. Sabe-se que a diferenciação muscular é acompanhada por alterações metabólicas importantes como aumento da expressão genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e transporte de aminoácidos (MORAN et al., 2002). Alguns nutrientes como aminoácidos e creatina estimulam a miogênese (DELDICQUE et al., 2007; KIMBALL et al., 1999). Pediconi et al. (1992) observaram aumento no conteúdo total de fosfolipídios durante a diferenciação muscular. Sauro e Strickland (1987) observaram que os mioblastos sintetizam predominantemente triacilgliceróis, enquanto que os miotubos sintetizam predominantemente fosfolipídeos. Fusão de mioblastos também pode ser regulada por fatores que alteram a fluidez da membrana, tais como temperatura e / ou composição lipídica (PRIVES e SHINITZKY, 1977; VAN DER BOSCH et al., 1973).

Comparativamente a oxidação de AGs é significativamente maior em miotubos do que em mioblastos sendo que a biogênese mitocondrial parece necessária para a diferenciação do músculo esquelético (DUGUEZ et al., 2002; JAHNKE et al., 2009; SAURO e STRICKLAND, 1987). O conteúdo de triacilgliceróis diminui em mais de 50% durante as miogênese

(PEDICONI et al., 1992) e a inibição da respiração mitocondrial prejudica a diferenciação miogênica e a formação de miotubos (HAMAI et al., 1997; HERZBERG et al., 1993).

Também há evidências de que os AGs podem interferir no processo de regeneração do músculo esquelético. Camundongos obesos ob/ob (deficientes em leptina), por exemplo, apresentam regeneração muscular falha (NGUYEN et al., 2011). A dieta hiperlipídica também prejudica a regeneração muscular em camundongos (HU et al., 2010). Isso pode ser sugestivo do envolvimento de AGs, principalmente os saturados nesse efeito. O presente trabalho de doutorado foi motivado pelo trabalho previamente publicado por Hurley et al. (2006). Esses autores demonstraram que o tratamento com ácido oléico estimula o aumento da atividade da creatina quinase (utilizada por esses autores como marcador de diferenciação muscular) durante a miogênese em mioblastos L6. Mas os autores não avaliaram o efeito do ácido graxo sobre os genes que de fato regulam a miogênese e nem descartaram o possível efeito isolado do ácido graxo na expressão da creatina quinase. Em seguida, Lee et al. (2009) demonstraram que os ácidos oléico e linoléico estimulam a diferenciação em mioblastos C2C12. Nenhum dos dois grupos avaliou o efeito do tratamento com ácido oléico nas sinalizações Notch e da Beta-catenina e estudaram os efeitos em cultura permanente de mioblastos, células já pré-diferenciadas e imortalizadas. Este fato despertou o nosso interesse em investigar o efeito desse AG como agente modulador da miogênese em células-tronco musculares e do efeito da terapia celular na regeneração do músculo esquelético lesionado por laceração.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do tratamento com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais na laceração muscular assim como o possível efeito modulador da suplementação com ácido oleico no tratamento.

2.2 Específicos

- Avaliar alterações na composição de ácidos graxos em células-tronco musculares durante a diferenciação miogênica.
- Investigar o efeito do tratamento com ácido oleico nas sinalizações Notch e Beta-catenina que regulam a proliferação e a miogênese em células-tronco musculares.
- Avaliar o efeito do tratamento com ácido oleico na expressão dos fatores reguladores da miogênese e marcadores terminais de diferenciação muscular *in vitro*.
- Quantificar a enxertia do transplante autólogo de células-tronco musculares (células não cultivadas) e mioblastos (células cultivadas) no músculo lacerado.
- Investigar o efeito do transplante autólogo de células-tronco musculares na função (produção de força), massa muscular e marcadores histológicos e moleculares de regeneração e fibrose no músculo esquelético lacerado.
- Quantificar a enxertia e o efeito do transplante autólogo de células-tronco mesenquimais na função (produção de força), massa muscular e marcadores histológicos e moleculares de regeneração e fibrose no músculo esquelético lacerado.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com ácido oleico na enxertia do transplante autólogo de células-tronco musculares e de células-tronco mesenquimais no músculo esquelético lacerado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos bioéticos

Os procedimentos e métodos utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) tendo sido respeitados todos os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo registrado sob o nº 114, fl 36 do livro 2, foi aprovado em 19 de setembro de 2006.

3.2 Animais

Foram utilizadas ratas albinas singênicas Wistar Kyoto (8-12 semanas) para indução da lesão muscular e ratos Wistar Kyoto para isolamento de células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais. Todos os animais foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os camundongos C57BL/10 (24 semanas) e *mdx* (24 semanas) foram obtidos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) na Universidade de São Paulo (USP). Os camundongos transgênicos para o gene GFP (*Green fluorescent protein*) foram cedidos gentilmente pela Profa Dra Eugenia Costanzi Strauss (ICB-USP). Camundongos C57BL/6 foram obtidos do biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB-USP. Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libitum*. Foram alojados em número de 4 por gaiola e foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12-12 horas e temperatura ambiente de 23 ± 2 °C.

3.3 Indução da lesão muscular

Foi utilizado o modelo experimental de laceração descrito por Menetrey et al. (1999) para camundongos e adaptado para ratos em nosso laboratório. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (75 mg/kg) por única injeção intraperitoneal. Foi feita tricotomia da região posterior da panturrilha e assepsia com iodo polividona (PVPI) a 10 %. Uma incisão de 2 cm foi feita na pele e, após divulsionamento do tecido subcutâneo, o ventre do músculo gastrocnêmio foi exposto. Com auxílio de uma lâmina cirúrgica (nº 23) esterilizada, foi realizado um corte transversal correspondendo a 75% da largura, 50% de profundidade e na altura do ponto médio do comprimento longitudinal do gastrocnêmio. Após laceração, o corte na pele foi suturado com

fio de monofilamento de nylon 3-0 e a assepsia local foi feita com PVPI. Previamente à laceração, 24 horas antes, foi realizada profilaxia com antibiótico gentamicina (80 mg/Kg i.p.). A pata contralateral foi submetida aos mesmos procedimentos descritos acima com exceção da laceração no gastrocnêmio. Para a realização desses procedimentos, foi utilizado somente material cirúrgico esterilizado em autoclave.

Para demonstração da lesão, alguns animais receberam injeção de solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%) contendo corante azul de Evans a 2% por via intraperitoneal. O corante absorvido cai na circulação sanguínea e se liga à albumina. Quando da lesão no gastrocnêmio, o aumento na permeabilidade vascular faz com que o corante se difunda para o interstício do músculo. Após 24 horas da laceração, os animais foram eutanasiados e o gastrocnêmio foi retirado e o seu peso determinado. A lesão muscular também foi avaliada através de atividade da creatina quinase (CK) no plasma após 24 horas. Essa enzima é liberada para o sangue quando há lesão no músculo esquelético

3.4 Isolamento de células-tronco musculares para cultivo

As células-tronco musculares foram isoladas a partir dos músculos quadríceps, isquiotibiais, tibial anterior, extensor digital longo (EDL), sóleo e gastrocnêmio. O material biológico foi extraído com o auxílio de instrumentação cirúrgica esterilizada. Em seguida, foi colocado em meio DMEM (sem soro) e homogeneizado com tesoura. O homogenato foi digerido em solução contendo collagenase a 2%, durante 90 minutos, a 37 °C sob agitação constante. Em seguida, passou por outra digestão em solução contendo collagenase a 2,5%, tripsina e DNase, durante 30 minutos, a 37 °C também sob agitação constante. O homogenato foi centrifugado a 1000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C e, em seguida, 15 mL de DMEM (com Soro Fetal Bovino a 20%) foram adicionados a solução para neutralização da tripsina. A solução foi novamente centrifugada a 1000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O material foi ressuspensão em meio DMEM contendo 20% de soro fetal bovino em de pH 7,2 e lavado três vezes para retirada do soro remanescente. Detalhes do método foram descritos por Rando e Blau (1994) e Sacco et al. (2008).

Em seguida as células foram plaqueadas em poços pré-tratados com *Matrigel*TM e deixadas por 3 horas para separação dos fibroblastos (células com adesão rápida ao *Matrigel*TM). O meio contendo as células não-aderidas foi colocado em novas placas de cultivo contendo poços pré-tratados com *Matrigel*TM. As células-tronco musculares foram então cultivadas sob estímulo de proliferação em DMEM (contendo 20% soro fetal bovino - SFB) por 48 horas e após esse

período o meio de fusão celular (DMEM contendo 2% de soro de cavalo em pH de 7,2) foi adicionado para indução da miogênese.

3.5 Ensaio de proliferação celular

A capacidade proliferativa foi avaliada através da incorporação de [2-¹⁴C]-Timidina no DNA das células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais. Resumidamente, as células-tronco foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino contendo antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L de meio). Após centrifugação, as células foram cultivadas em placas de 96 *wells*, contendo $2,5 \times 10^4$ células por *well* e incubadas a 37 °C e atmosfera de 95% ar / 5% CO₂ por 24 horas.

No início da cultura, as células-tronco musculares foram estimuladas com soro fetal bovino a 20% na presença ou ausência de ácido oléico. [2-¹⁴C]-timidina (0,02 µCi / por *well*) foi adicionada ao meio e as células incubadas por 18 horas. Após esse período, foi realizada a coleta automática das células utilizando coletor múltiplo Skatron Combi Multiple Cell Harvester (Sulfolk, UK). Os discos de papel contendo as células com a radiatividade incorporada foram contados em 1 mL de líquido de cintilação em contador Beckman-LS 5000TD (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

3.6 Tratamento com ácido oléico em cultura celular

O ácido oléico foi adicionado ao meio de cultivo celular 6 horas após o plaqueamento definitivo das células-tronco nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µM dissolvido em etanol 0,05% e foi mantido, com reposição das doses a cada troca do meio, até o sétimo dia de diferenciação. Essas concentrações não se revelaram tóxicas pelos ensaios de atividade da lactato-desidrogenase no meio de cultura.

3.7 Determinação da composição de ácidos graxos em cultura de células-tronco musculares e células musculares esqueléticas diferenciadas

Células-tronco musculares indiferenciadas e células musculares diferenciadas tratadas e não tratadas com ácido oléico foram submetidas a análise da composição de ácidos graxos. Estes foram separados dos lipídios totais segundo Miyasaka et al. (2001). Os ácidos graxos foram derivatizados com 4-bromometil-7 cumarina e analisados em um sistema de HPLC (LC-10A,

Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando uma coluna C8 (25 cm x 4.6 id, 5 mM), 1 mL/min de acetonitrila / água (77:23 fluxo) e detector de fluorescência (Ex 325/395 nm / EM) conforme descrito por Martins et al. (2004).

3.8 Análise da ativação do fator de transcrição NF- κ B pelo ensaio de mobilidade eletroforética retardada (EMSA) em gel de poliacrilamida

A atividade do fator de transcrição NF- κ B foi avaliada por EMSA após 24 horas de cultivo em meio de proliferação celular na presença de ácido oléico (100 μ M). Neste ensaio, o extrato protéico nuclear é incubado com um oligonucleotídeo dupla fita de DNA contendo a sequência consenso do fator de transcrição e marcado radiativamente. O fator de transcrição ativo se liga ao oligonucleotídeo e, após eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-denaturantes, pode ser quantificado, uma vez que, sob essas condições, o complexo oligo- NF κ B apresenta mobilidade menor que o oligo não ligado ao fator de transcrição.

A sequência dupla fita utilizada no ensaio para avaliar a ativação do NF κ B está descrita abaixo:

5'- AGTTGAGGGGACTT*TTCCCAGGC- 3'

Os oligonucleotídeos foram marcados por fosforilação da extremidade 5' com [γ^{32} P]-ATP (GE Healthcare Life Sciences, EUA) catalisada pela enzima T4 polinucleotídeo quinase (Life Technologies, Inc.). A reação, que continha 10 pmol de oligonucleotídeo, 15 pmol de [γ^{32} P]-ATP, 1 U de T4 quinase e tampão de enzima 1X, foi incubada a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de tampão TE (Tris HCl (10 mM), EDTA (1 mM), pH 8,0) contendo NaCl (0,1 M) e o excesso de [γ^{32} P]-ATP foi removido por centrifugação do volume da reação utilizando colunas MicroSpin S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

O extrato celular foi centrifugado a 700 x g por 10 minutos a 4 °C e o sedimento foi lavado com 1 mL de tampão HBS (Hepes (25 mM) pH 7,6; NaCl (15 mM)) por duas vezes. Em seguida, o sedimento foi lavado uma vez com tampão RBI (KCl (100 mM); MgCl₂ (5 mM); EGTA (5 mM); Na₄P₂O₇ (5 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 μ g/mL); leupeptina (2 μ g/mL)) e incubado por 5 minutos com 1 mL do mesmo tampão. Após a incubação, o sedimento foi lavado e incubado por 5 minutos com 1 mL de tampão RBII (KCl (50 mM); MgCl₂ (5 mM); EGTA (1 mM); Na₄P₂O₇ (1 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 μ g/mL); leupeptina (2 μ g/mL)). Em seguida, o sedimento foi incubado com tampão LBS (Tris (25 mM) pH 7,5; MES (25 mM);

Triton X-100 (0,1%); DTT (1 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 µg/mL); leupeptina (2 µg/mL)) por 30 minutos no gelo. O lisado foi centrifugado a 900 x g por 10 minutos e o sedimento restante contendo as proteínas nucleares foi ressuspense em tampão de extração (Hepes (20 mM) pH 7,6; NaCl (0,45 M); EDTA (2,5 mM); glicerol (25 %); DTT (2,5 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 µg/mL) e leupeptina (2 µg/mL)). Após incubação por 30 minutos a 4 °C sob agitação, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 4 °C na rotação máxima e o sobrenadante contendo as proteínas nucleares foi armazenado a -70 °C. As proteínas nucleares foram quantificadas conforme descrito por Bradford (1976).

Para a formação dos complexos proteína-DNA, as reações (volume final 20 µL) foram preparadas em gelo, contendo 5 µg de extrato nuclear, 1,5 µg de Poli dI-dC, 1 pmol de oligonucleotídeo marcado e 6 µL de tampão de ligação (Hepes (60 mM) pH 7,6; glicerol (10%); KCl (150 mM); EDTA (0,6 mM), DTT (3 mM). As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, as amostras foram aplicadas em gel contendo 6% de poliacrilamida (30:1) em tampão TBE (Tris base (45 mM), ácido bórico (45 mM) e EDTA (1 mM) e submetidas à eletroforese a 150 V por 2 horas. Após a realização de eletroforese, o gel foi seco a vácuo a 80 °C e exposto em um filme de raio-X por uma semana. Os resultados foram analisados por densitometria utilizando o equipamento STORM 840 (Dynamic Molecular, Sunnyvale, USA).

3.9 Obtenção das células-tronco musculares para transplante

Após a etapa de separação dos fibroblastos, o meio contendo as células foi centrifugado a 1000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e ressuspense em solução tampão fosfato (pH 7,2) com glicose (5,5 mM). Esse procedimento foi realizado 3 vezes para lavagem do precipitado e retirada do soro remanescente. Após essa etapa, o precipitado foi ressuspense em solução salina com glicose e a análise a viabilidade celular foi feita com solução contendo Trypan a 1% e as células-tronco musculares não-cultivadas foram injetadas nas bordas da lesão 72 horas após sua indução. Outro grupo de animais com laceração recebeu apenas a injeção com salina no local da lesão.

As células-tronco musculares isoladas foram plaqueadas em poços pré-tratados com *Matrigel*TM e a população foi expandida por 48h em garrafas de cultivo celular, mantidas a 37 °C em estufa úmida na presença de 5% de CO₂. Nesse período as células expressam o gene MyoD (myogenic differentiation gene) (RANDO e BLAU, 1994; SACCO et al., 2008).

3.10 Suplementação com ácido oléico

O ácido oléico foi administrado por gavagem na dose de 0,45 g/kg de peso corporal. O ácido graxo foi administrado por 20 dias em camundongos *mdx* e C57BL/10.

3.11 Rastreamento das células-tronco transplantadas no tecido muscular lesionado

As células-tronco musculares e mioblastos de animais machos foram transplantadas no músculo esquelético de fêmeas. Para o rastreamento das células dos doadores foi realizada análise da expressão do gene SRY, específico do cromossomo Y, por PCR em tempo real (técnica que será descrita a seguir). As análises foram feitas 7 e 28 dias após a laceração muscular. Células-tronco mesenquimais transplantadas foram rastreadas 28 dias após a laceração muscular. Em camundongos C57BL/6 com lesão muscular, células-tronco musculares isoladas de camundongos GFP (*green fluorescent protein*) foram injetadas após 72 h da indução da lesão e rastreadas através de imunohistoquímica das secções histológicas.

3.12 Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea

As cavidades medulares do fêmur e da tíbia de ratos singenéticos jovens foram aspiradas e homogeneizadas. As células mononucleares foram separadas através do gradiente de Ficoll-Hypaque. Em seguida, foram plaqueadas e cultivadas em meio de cultura DMEM acrescido de 20% de soro fetal bovino, suplementado com L-glutamina (2 mM), penicilina e estreptomicina (0,1%), e mantidas a 37°C em estufa úmida na presença de 95% de O₂ e 5% de CO₂ durante sete dias. Após três dias, o meio de cultura foi substituído e apenas as células aderidas foram cultivadas até a confluência.

3.13 Obtenção das células-tronco mesenquimais de medula óssea para transplante

Após a quarta passagem, as garrafas de cultura foram tratadas com tripsina-EDTA a 0,25%. O meio coletado foi centrifugado a 1000 rpm, durante 20 minutos, a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em 15 mL de solução tampão fosfato (PBS) contendo glicose a 5 mM e pH de 7,2. Em seguida, a solução foi centrifugada a 1000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C. Esse procedimento foi realizado 3 vezes para lavagem do precipitado e retirada do soro remanescente. Após essa etapa, o precipitado foi ressuspensão em solução salina com glicose e a análise a

viabilidade celular foi realizada com solução contendo Trypan a 1% e $4,5 \times 10^6$ foram injetadas nas bordas da lesão 72 horas após sua indução. Outro grupo de animais com laceração recebeu apenas a injeção com salina no local da lesão. A expressão de marcadores mesenquimais (CD90 e CD105) e marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34) foram avaliados por PCR em tempo real conforme descrito previamente (PINHEIRO et al., 2011). Após a quarta passagem, as células expressavam CD90 e CD105 e não apresentaram expressão detectável de CD34 e CD45. A capacidade de diferenciação para linhagem adiopogênica e osteogênica também foi avaliada (PINHEIRO et al., 2011).

3.14 *Análise da força muscular*

Após 28 dias da laceração, os animais foram submetidos ao teste de função muscular. Para isso, foram anestesiados com pentobarbital sódico e a pele da pata foi excisada. Em seguida, o nervo ciático foi localizado e um eletrodo de platina foi colocado neste. A articulação do joelho foi estabilizada mecanicamente. O tendão calcâneo foi conectado a uma haste metálica acoplada a um transdutor de força isométrica. Contrações intensas foram induzidas através de eletroestimulação a 100 Hertz, com duração de pulso de 0,5 s para registro da força tetânica. Previamente, a amplitude máxima dos abalos musculares foi encontrada através do comprimento muscular ideal dado por tração mecânica e pela voltagem máxima capaz de gerar aumento na força de contração. Os dados foram captados pelo transdutor e enviados a um computador. A aquisição dos dados foi feita com o auxílio do *software* AqDados (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda). Os dados foram analisados com o auxílio dos *softwares* AqAnalysis (LYNX - Tecnologia Eletrônica Ltda) e Microcal Origin™ (Microcal Software, Inc.). Após o teste, os animais foram imediatamente eutanasiados por deslocamento cervical os músculos removidos.

3.15 *Análise gravimétrica do músculo esquelético*

O músculo retirado 28 dias após a indução da lesão teve o peso úmido determinado em balança de precisão. Em seguida, foi colocado em estufa aquecida, durante 72 horas, a 37 °C, para evaporação do conteúdo líquido. Após esse período, o músculo teve o seu peso seco determinado.

3.16 *Extração e quantificação de proteínas totais*

A quantificação de proteínas totais em extrato de células musculares esqueléticas foi realizada através do método espectrofotométrico proposto por Bradford (1976). Após a extração as proteínas da amostra são complexadas ao corante azul de coomassie brilhante G-250. A reação colorimétrica resulta em produto com absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância obtidos em cada amostra foram lançados em uma equação da reta obtida por curva-padrão de concentrações crescentes de BSA. A concentração padrão de albumina foi aferida em espectrofotômetro Ultrospec® 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) antes de realizar diluições crescentes e o valor de absorbância obtido em 280 nm foi dividido por 0,66.

3.17 *Extração e quantificação de RNA total*

O músculo gastrocnêmio foi homogeneizado em TRIZOL® seguindo instruções do fabricante. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio em cada amostra que em seguida foram centrifugadas à 12 000 g, durante 5 minutos, à 4 °C. Após essa etapa, a fase aquosa contendo o RNA total foi transferida para outro tubo onde foram acrescentados 500 µL de isopropanol gelado, e em seguida as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas à 12 000 g por 10 minutos à 4 °C. O precipitado de RNA formado nessa etapa foi lavado com solução de etanol a 75% e em seguida centrifugado à 12 000 g, à 4 °C durante 5 minutos. Com o término dessa etapa de lavagem do RNA, o precipitado de cada amostra foi submetido à secagem em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspensão em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), sendo então armazenadas à temperatura de -80 °C. A quantificação do RNA total extraído foi realizada por espectrofotometria utilizando uma alíquota de cada amostra. Foi utilizado o comprimento de onda de 260 nm onde a absorbância (A_{260}) com valor igual a 1 corresponde à uma concentração de 40 µg/mL de RNA total. O grau de pureza do RNA foi determinado pela razão de absorbância nos comprimentos de onda de 260/280 nm (A_{260}/A_{280}) onde uma razão entre 1,8 e 2 indica grau aceitável de pureza.

3.18 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 4 µg de RNA total extraídos de cada amostra. Inicialmente, o RNA foi tratado com desoxirribonuclease (Kit DNase), adicionando-se 1 µL de solução tampão da DNase 10X (Tris-HCl 100mM, pH 7,5, MgCl₂ 25 mM, e CaCl₂ 1mM) e 1 µL de desoxirribonuclease tipo 1 (DNase 1). Em seguida, o volume de cada amostra foi completado para 10 µL utilizando água DEPC. Após essa etapa, as amostras foram incubadas à 25 °C por 15 minutos. Foi realizada a inibição da DNase pela adição de 1 µL de solução contendo EDTA 25 mM e incubação por 10 minutos à 65 °C para desnaturação do RNA. Foram adicionados então 146 ng de *random primers* em cada amostra, as quais foram submetidas a uma nova incubação por 10 minutos à 70 °C seguida por resfriamento em gelo. O experimento prosseguiu com a adição de 6 µL de tampão para a enzima transcriptase reversa 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 250 mM, MgCl₂ 20 mM e DTT 50 mM) e dNTP 0,5 mM. A mistura foi incubada, por 10 minutos, à 25 °C e por 2 minutos à 42 °C, respectivamente. Por fim, foram adicionados 200 U da enzima transcriptase reversa *RevertaidTM M-MuLV Reverse Transcriptase[®]* com incubações subsequentes de 50 minutos à 42 °C e de 15 minutos à 70 °C. O cDNA obtido nesse processo de síntese foi armazenado à -20 °C.

3.19 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A análise da expressão dos genes SRY, PCNA, Ciclina D1, Hes-1, Desmina e Miosina Neonatal foi analisada por PCR em tempo real, utilizando o aparelho ROTOR GENE 3000 de fabricação da Corbett Research (Mortlake, Austrália) e o reagente *SYBR green[®]* (Promega Corporation - Madison, WI, USA) como marcador fluorescente. Todas as reações foram realizadas em 25 µL de uma mistura contendo 1 µL de cDNA de cada amostra, 0,5 µL de cada *primer sense* (S) e *anti sense* (AS) diluídos em uma solução estoque de 10 µM, 10,5 µL de água DEPC e 12,5 µL do reagente *Platinum[®] SYBR[®] green qPCR SuperMix UDG*. A reação de PCR em tempo real foi realizada nas seguintes condições: primeiro ciclo (único) à 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos com fases de desnaturação à 95 °C por 1 minuto, hibridação à temperatura específica de cada *primer* por 1 minuto e extensão à 70 °C por 1 minuto. Além dos genes acima citados, também foi avaliada a expressão gênica do GAPDH ou Alfa-tubulina os quais foram utilizados como controle para normalização dos dados obtidos nas reações de amplificação. Os oligonucleotídeos utilizados neste ensaio, suas respectivas seqüências e temperatura de hibridação

estão listados na tabela 1. A quantificação da expressão gênica relativa ao GAPDH foi realizada utilizando o *software* qBase v1.34 (<http://medgen.ugent.be/qbase/>).

Tabela 1 - *Primers* utilizados na reação de RT-PCR em tempo real. *Primer sense* (S); *Primer antisense* (AS).

Oligonucleotídeos	Seqüência
Miosina Neonatal	S 5'-AGAAGGCCAARAARGCCAT-3' AS 5'-AGTCAGCAGTGGGAGAAAAG-3'
Desmina	S 5'-GAC GCA GTG AAC CAG GAG TT-3' AS - 5'-ATC ATC TCC TGC TTG GCT TG -3'
Delta-9-dessaturase	S 5'-TGG GAA AGT GAA GCG AGC AAC CG 3 AS 5' AGA GGG GCA CCT TCT TCA TCTTCT C 3'
PCNA	S 5'-ACGTCTCCTTAGTGCAGCTTACTCT-3' AS 5'- TAATGATGTCTTCATTACCAGCACAT-3'
Ciclina D1	S 5'-CCCTCCGTATCTTACTTCAA-3' AS 5'-GATGGTCTGCTTGTTCTCAT-3'
SRY	S 5'-AGATCTTGATTTTTAGTGTTTC-3' AS 5'-TGCAGCTCTACTCCAGTCTTG-3'
GAPDH	S 5'-TGCCATCACTGCCACTC-3' AS 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

Fonte: Pinheiro (2012).

3.20 Extração e quantificação de proteínas específicas por *Western Blotting*

O músculo gastrocnêmio foi homogeneizado no Polytron em solução tampão para extração de proteínas (1% SDS, 100 mM de Tris [pH 7,4], 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 100 mM de ortovanadato de sódio e 250 mM de cloreto de sódio). O homogenato foi incubado em gelo por 10-60 minutos e em seguida centrifugado à 10 000 g por 20 minutos para remoção do material insolúvel. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para quantificação de proteínas totais através da espectrofotometria pelo método de Bradford (Biorad, CA, EUA). O restante do sobrenadante foi diluído em tampão Laemmli (1:5 v/v) contendo o reagente ditiotretol 100 mM e submetido a incubação por 10 minutos à 96 °C. Após essa etapa, o material foi congelado à -80 °C para posterior separação eletroforética das proteínas. A separação eletroforética foi feita em gel de poliacrilamida a 8%

(%T) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad, CA, EUA). As membranas foram bloqueadas com solução de BSA (ou leite desnatado em pó) a 5% por 2 horas em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários *overnight*, à 4 °C. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário associado à peroxidase (Amershan Pharmacia, UK) e reagentes de detecção do kit ECL de quimiluminescência (Amershan Pharmacia, UK). As membranas foram expostas durante períodos de tempo variados a filmes de raios-X e depois revelados. Por fim, as bandas foram quantificadas através da análise de densitometria óptica utilizando o software de domínio público *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.21 *Análise estatística*

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados pelo teste t de *student* (para comparação entre dois grupos) ou por análise de variância (*one-way* ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey (para comparação entre três ou mais grupos). As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 *A miogênese é acompanhada de alterações na composição de ácidos graxos em miotubos derivados de células-tronco musculares*

A primeira etapa do presente trabalho foi avaliar se a miogênese estaria associada à alterações na composição de ácidos graxos. Dessa maneira, a composição de ácidos graxos em células-tronco musculares indiferenciadas e em miotubos diferenciados em cultura primária foi determinada. Em células-tronco musculares indiferenciadas, os ácidos graxos mais abundantes foram: esteárico (31%), palmítico (28%) e linoléico (14%) seguido por ácidos oléico (5%), DHA (4%), linolênico (4%), palmitoléico (3,5%), araquidônico (3%), mirístico (3%), láurico (2%) e EPA (1%). Os ácidos cáprico, capríico e caprílico não foram detectados. O conteúdo total de ácidos graxos saturados na composição dos miotubos foi reduzida em 14% (Figura 4A) e o conteúdo total de ácidos graxos insaturados aumentou em 24% durante a diferenciação muscular (Fig. 4B). O índice de insaturação também aumentou (27%) (Figura 4C).

Figura 4 - Alteração da composição total de ácidos graxos saturados e insaturados e índice de insaturação em células-tronco musculares durante a miogênese.

O extrato de células foi obtido imediatamente após a fase de separação dos fibroblastos por pré-plaqueamento e após 7 dias da indução da diferenciação miogênica. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

O conteúdo dos ácidos palmítico e esteárico foi reduzido em 19% e 12%, respectivamente (Fig. 5A). Não ocorreram alterações significativas no conteúdo dos ácidos láurico, linoleico e mirístico durante a miogênese (Fig. 5A). A proporção de ácido oleico aumentou em 66% e não foram observadas alterações significativas no conteúdo de ácido palmitoléico (ômega 7) durante a miogênese (Fig. 5B).

Figura 5 - Alteração da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) em células-tronco musculares durante a miogênese.

O extrato de células foi obtido imediatamente após a fase de separação dos fibroblastos por pré-plaqueamento e após 7 dias da indução da diferenciação miogênica. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

O índice de atividade delta-9-dessaturase avaliado pela razão do produto (ácido oléico) pelo substrato (ácido esteárico) aumentou assim como aumentou a expressão do mRNA dessa enzima sugerindo aumento da síntese ácido oléico durante a diferenciação muscular (Fig. 6).

Figura 6 - Aumento do índice de atividade e expressão gênica da delta-9-dessaturase em células-tronco musculares durante a miogênese.

O extrato de células foi obtido imediatamente após a fase de separação dos fibroblastos por pré-plaqueamento e após 7 dias da indução da diferenciação miogênica. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

4.2 O tratamento com ácido oléico acelera a diferenciação miogênica e inibe a sinalização Notch em células-tronco musculares

O aumento do conteúdo de ácido oléico durante a miogênese sugeriu um possível envolvimento desse ácido graxos nos mecanismos que regulam a miogênese, o que nos coube investigar. Para isso, a toxicidade desse ácido graxo em células-tronco musculares foi investigada *in vitro*. Doses de ácido oléico até 100 μ M demonstram não serem tóxicas para células-tronco musculares (Fig.7).

Figura 7 - Efeito do tratamento com ácido oléico sobre a viabilidade de células-tronco musculares *in vitro*.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do azul de Trypan. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

A seguir, nosso objetivo foi avaliar se o tratamento com ácido oléico a partir do momento da indução da diferenciação miogênica aceleraria esse processo. Como resultado, o diâmetro dos miotubos aumentou durante a diferenciação de células-tronco musculares tratadas com ácido oléico (Fig. 8). Em três dias de diferenciação, o tratamento com ácido oleico aumentou a expressão de MyoD em 1,5 e 2 vezes a 75 μ M e 100 μ M, respectivamente. A expressão de miogenina foi aumentada em 2,3 e 2,9 vezes e a expressão de Myf-6 aumentou em 1,3 e 1,6 vezes a 75 μ M e 100 μ M, respectivamente (Fig. 9). Durante 7 dias de tratamento com ácido oleico, houve aumento do conteúdo de miosina de cadeia pesada (Fig. 10). Nenhum no diâmetro dos miotubos efeito foi observado quando as células foram tratadas com ácido araquidônico, EPA ou DHA (Dados não mostrados).

Figura 8 - Aumento do diâmetro dos miotubos em 3 e 7 dias de diferenciação durante tratamento com ácido oléico.

C

D

O diâmetro das células foi avaliado após 3 (A) e 7 (B) dias da indução da diferenciação miogênica. Morfologia das células musculares esqueléticas diferenciadas (7 dias) tratado com etanol (C) e ácido oleico 100μM (D). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 9 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo de fatores reguladores da miogênese (MyoD, miogenina e Myf-6) em miotubos após 3 dias de diferenciação.

A

B

C

O extrato de células foi obtido após 3 dias da indução da diferenciação miogênica. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.
 Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 10 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo de cadeia pesada da miosina em miotubos após 7 dias de diferenciação.

O extrato de células foi obtido após 7 dias da indução da diferenciação miogênica. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

Como era esperado, o aumento do conteúdo de ácido oleico na composição de células-tronco musculares e miotubos tratados com esse ácido graxo também foi observado (Fig.11)

Figura 11 - Tratamento com ácido oléico aumenta seu próprio conteúdo em células-tronco musculares e miotubos.

O extrato de células foi obtido após 24 horas de proliferação e após 7 dias da indução da diferenciação miogênica na ausência e presença de ácido oleico (100 µM). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

Em prosseguimento à investigação do efeito do ácido oléico na miogênese, investigamos o efeito desse ácido graxo em células-tronco musculares indiferenciadas mantidas sob proliferação em meio contendo soro fetal bovino. O soro fetal bovino contém fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular e reprimem a miogênese. É bem demonstrado que inibição do ciclo celular induz diferenciação de mioblastos (GUO et al., 1995; GUO e WALSH, 1997). Observamos que a proliferação de células-tronco musculares foi reduzida pelo tratamento com ácido oleico (Fig. 12A). Para abordar o mecanismo pelo qual o ácido oleico estimulou a diferenciação miogênica, a influência deste ácido graxo na sinalização Notch durante a fase de proliferação foi avaliada. Células-tronco musculares proliferaram em DMEM contendo 20% FBS na presença ou ausência de ácido oleico. Os experimentos foram realizados usando 100 µM de ácido oleico, dose máxima onde foi observado efeito no diâmetro dos miotubos. Células-tronco musculares tratadas com ácido oléico apresentaram diminuição da proliferação e expressão de marcadores de ciclo celular (PCNA e ciclina D1) quando comparado com células não tratadas (Fig. 12). O tratamento com ácido oleico não alterou o conteúdo da Delta-like-1, ligante endógeno do Notch. O conteúdo de Notch clivado permaneceu inalterado após o tratamento com ácido oleico. O conteúdo de Hes-1, efetor da sinalização Notch foi reduzido pelo tratamento com ácido oleico (Fig. 13). Não foi observada alteração no conteúdo de Numb,

inibidor endógeno do Notch. O tratamento com ácido oleico diminuiu em 72% o conteúdo de HES-1 (Fig. 13) e aumentou a atividade do NFkB (Fig. 14), sem alterar o conteúdo do Notch clivado, Delta-like-1 ou Numb. O tratamento com ácido oléico também aumentou o teor de β -catenina em 187% (Fig. 15) sem alterar o conteúdo de Wnt-3a e Wnt-5a (Fig. 17). A GSK-3 β ativa fosforila beta-catenina, levando à sua degradação (BRACK et al., 2008). A fosforilação da GSK-3 β em Ser-9 inativa a enzima e o ácido oléico aumentou (47%) a fosforilação da GSK-3 β em Ser-9 levando a sua inibição (Fig. 16).

Figura 12 - Tratamento com ácido oléico diminui a taxa de proliferação de células-tronco musculares *in vitro*.

O extrato celular foi obtido após 24 horas de proliferação na ausência e presença de ácido oleico (100 μM). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student (B e C) e *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey (A).
Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 13 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo de proteínas reguladoras da sinalização Notch em células-tronco musculares *in vitro*.

O extrato celular foi obtido após 24 horas de proliferação na ausência e presença de ácido oleico (100 μM). Os resultados estão apresentados como média ± erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 14 - Efeito do ácido oléico na atividade nuclear do fator de transcrição NF-kappa B em células-tronco musculares.

As células foram incubadas com meio de proliferação contendo ácido oléico (100 μ M) dissolvido em etanol. O extrato nuclear foi obtido após 24 horas de proliferação. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student. Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 15 - Efeito do tratamento com ácido oléico no conteúdo total de Beta-Catenina em células-tronco musculares *in vitro*.

O extrato celular foi obtido após 24 horas de proliferação na ausência e presença de ácido oleico (100 µM). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 16 - Tratamento com ácido oléico inibe GSK3-beta em células-tronco musculares *in vitro*.

O extrato celular foi obtido após 24 horas de proliferação na ausência e presença de ácido oleico (100 μ M). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 17 - Tratamento com ácido oléico não altera o conteúdo de proteínas da sinalização Wnt em células-tronco musculares *in vitro*.

O extrato celular foi obtido após 24 horas de proliferação na ausência e presença de ácido oleico (100 μM). Os resultados estão apresentados como média ± erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

4.3 Terapia com células-tronco musculares melhora a regeneração do músculo esquelético lesionado por laceração

Antes de determinar um possível efeito do ácido oléico, através de pré-tratamento *in vitro* previamente ao transplante em músculo lesionado, sobre a capacidade regenerativa das células-tronco, o efeito do transplante de células-tronco musculares e mesenquimais de medula óssea foi na regeneração do músculo lesionado foi investigada. A lesão muscular foi induzida por laceração no músculo gastrocnêmio de ratas isogênicas. A presença da lesão foi caracterizada por aumento da atividade da creatina quinase no plasma e exsudação do azul de Evans conforme descrito nos métodos (Figuras 18).

Figura 18 - Marcadores de lesão e demonstração regeneração incompleta no músculo gastrocnêmio lacerado.

No painel A, a seta indica a incisão cutânea e a laceração no músculo gastrocnêmio. No painel B, é apresentado o resultado da atividade da creatina quinase no plasma após 24 h após a lesão e no painel C o músculo (direita) contendo o corante extravasado, indicador de aumento da permeabilidade vascular. (D), Morfologia da lesão após 28 dias da indução da lesão, demonstrando regeneração muscular incompleta e presença de fibrose intensa. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student (B).

Fonte: Pinheiro (2012).

As células-tronco musculares foram isoladas por digestão e centrifugação seriada. Após 72 horas, foram injetadas 10^6 ; $2,5 \times 10^6$ e $4,5 \times 10^6$ células nas bordas da laceração. Vinte e oito dias pós-lesão, as células transplantadas foram rastreadas através da expressão do gene SRY. O sinal de expressão do gene SRY foi diretamente proporcional ao número de células transplantadas (Figura 19).

Figura 19 - Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas à lesão muscular e transplante de células-tronco musculares de machos.

No painel A, estão os resultados de expressão gênica dos músculos lesionados e tratados com células-tronco. As células foram transplantadas 72h após a lesão muscular. No painel B, é apresentado o resultado da expressão do gene SRY em músculo de ratos machos e a ausência de expressão em fêmeas. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. GAPDH = gliceraldeído fosfato desidrogenase. SRY = *sex-determining region Y*.

Fonte: Pinheiro (2012).

Em seguida, avaliamos comparativamente o transplante de células-tronco musculares (indiferenciadas) e mioblastos (células pré-diferenciadas após 24 h em cultura) (Figura 20). Os músculos lesionados tratados com $4,5 \times 10^6$ células-tronco musculares apresentaram expressão do gene SRY 7 e 28 dias pós-lesão. Já os que foram tratados com $4,5 \times 10^6$ mioblastos apresentaram expressão detectável após 7 dias sendo que não houve sinal de expressão do gene SRY 28 dias pós-lesão (Figura 21).

Figura 20 - Morfologia e conteúdo de MyoD em células-tronco musculares e mioblastos.

O painel A ilustra células-tronco musculares recém-isoladas. Observa-se baixo conteúdo de MyoD. O painel B ilustra mioblastos (células-tronco musculares pré-diferenciadas e MyoD positivas) obtidos após 48h de cultura. Imagens visualizadas por microscopia óptica com aumento de 100X. MyoD = *myogenic differentiation 1*.
Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 21 - Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas lesão muscular e transplante de células-tronco musculares ou mioblastos de machos.

GAPDH = gliceraldeído fosfato desidrogenase. SRY = *sex-determining region Y*. Foram injetados 4×10^6 mioblastos e células-tronco musculares 72h após a lesão muscular. O extrato celular foi obtido 7 e 28 dias após a lesão. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações.
Fonte: Pinheiro (2012).

Os músculos lesionados apresentaram menor peso úmido e peso seco 28 dias pós-lesão. Essa diminuição do peso muscular foi revertida pelo tratamento com $4,5 \times 10^6$ células-tronco musculares (Figura 22). O transplante de células-tronco em músculos não lesionados não exerceu qualquer efeito sobre o peso muscular ($p>0,05$).

Figura 22 - Efeito da terapia com células-tronco musculares na massa muscular esquelética após 28 dias da lesão.

Foram injetadas $4,5 \times 10^6$ células-tronco musculares em salina (placebo). No painel A, estão apresentados os resultados da análise do peso úmido e, no painel B, os resultados da análise do peso seco. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e comparação coluna-a-coluna pelo teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

A força muscular dos animais lesionados foi 25% do valor produzido pelo grupo controle. A terapia celular aumentou para 75% a força muscular nos animais lesionados e não teve qualquer efeito nos animais não lesionados. (Figura 23).

Figura 23 - Efeito da terapia com células-tronco musculares na força muscular (tetânica) após 28 dias da lesão.

Foram injetadas $4,5 \times 10^6$ células-tronco musculares em salina (placebo). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e comparação coluna-a-coluna pelo teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

O conteúdo de miosina neonatal e expressão de desmina (marcadores de regeneração muscular) também aumentou nos músculos lesionados e tratados com células-tronco musculares (Figura 24).

Figura 24 - Efeito da terapia com células-tronco musculares na nos marcadores de regeneração muscular após 28 dias da lesão.

Foram injetadas $4,5 \times 10^6$ células-tronco musculares em salina (placebo). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e comparação coluna-a-coluna pelo teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

4.4 Terapia com células-tronco mesenquimais melhora a regeneração do músculo esquelético lesionado por laceração

Expressão do gene SRY também foi detectada no músculo esquelético lesionado após 28 dias do transplante de células-tronco mesenquimais, embora em menor expressão quando comparado com o transplante da mesma quantidade de células-tronco musculares (Fig 25).

Figura 25. Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas lesão muscular e transplante de células-tronco musculares ou células-tronco mesenquimais de machos.

GAPDH = gliceraldeído fosfato desidrogenase. SRY = *sex-determining region Y*. Foram injetados 4×10^6 células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais 72h após a lesão muscular. O extrato celular foi obtido após 28 dias após a lesão. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

O tratamento com $4,5 \times 10^6$ células-tronco mesenquimais também recuperou a massa muscular (Figura 26) e a força (Fig. 27).

Figura 26 - Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais na massa muscular esquelética após 28 dias da lesão.

Foram injetadas $4,5 \times 10^6$ células-tronco em salina (placebo). No painel A, estão apresentados os resultados da análise do peso úmido, e no painel B, os resultados da análise do peso seco. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e comparação coluna-a-coluna pelo teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 27 - Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais na força muscular (tetânica) após 28 dias da lesão.

Foram injetadas $4,5 \times 10^6$ células-tronco em salina (placebo). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e comparação coluna-a-coluna pelo teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

O conteúdo de miosina neonatal e expressão de desmina (marcadores de regeneração muscular) também aumentou nos músculos lesionados e tratados com células-tronco mesenquimais (Figura 28).

Figura 28 - Efeito da terapia com células-tronco mesenquimais na nos marcadores de regeneração muscular após 28 dias da lesão.

Foram injetadas $4,5 \times 10^6$ células-tronco mesenquimais em salina (placebo). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e comparação coluna-a-coluna pelo teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

O processo regenerativo e a recuperação incompleta da função contrátil muscular no músculo lacerado estão associados à formação de um processo fibrótico intenso (Fig 29B). Tanto o tratamento com células-tronco musculares quanto o com células-tronco mesenquimais diminuiu a área de fibrose (tecido conjuntivo) no músculo esquelético lacerado (Fig 29C e Fig. 29D, respectivamente).

Figura 29 - Efeito da terapia com células-tronco musculares e mesenquimais na morfologia muscular após 28 dias da lesão.

(A) Corte histológico transversal, coloração com hematoxilina e eosina, de músculo não-lesionado (controle) visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X). (B) Corte histológico transversal, coloração com hematoxilina e eosina, de músculo lacerado e não-tratado visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X) 28 dias após a lesão. (C) Corte histológico transversal, coloração com hematoxilina e eosina, de músculo lacerado e tratado com células-tronco musculares visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X) 28 dias após a lesão. (D) Corte histológico transversal, coloração com hematoxilina e eosina, de músculo lacerado e tratado com células-tronco mesenquimais visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X) 28 dias após a lesão. Observa-se a diminuição da área de fibrose nos músculos lacerados tratados com células-tronco musculares e células-tronco mesenquimais. Fonte: Pinheiro (2012).

4.5 Pré-tratamento com ácido oleico diminui o enxerto de células-tronco musculares e não tem efeito no enxerto de células-tronco mesenquimais

Figura 30 - Desenho experimental para estudo do efeito do ácido oléico na terapia celular em ratos.

Fonte: Pinheiro (2012).

No entanto, o pré-tratamento *in vitro* com ácido oléico (100 µM) diminuiu o enxerto do transplante, avaliado pela expressão do gene SRY, em 2 vezes (Fig. 31). O pré-tratamento com ácido oleico não exerceu efeito no enxerto de células-tronco mesenquimais transplantadas no músculo lacerado (Fig. 31). *In vitro*, o tratamento com diferentes doses de ácido oléico também não alterou a proliferação dessas células (Fig. 32).

Figura 31 - Expressão do gene SRY em músculo esquelético de fêmeas submetidas lesão muscular e transplante de células-tronco musculares e mesenquimais de machos.

GAPDH = gliceraldeído fosfato desidrogenase. SRY = *sex-determining region Y*. As células foram pré-tratadas com ácido oléico por 18h e em seguida tripsinizadas e transplantadas no músculo lesionado após contagem do número de células viáveis utilizando o azul de Trypan. O extrato celular foi obtido após 28 dias após a lesão. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e comparação coluna-a-coluna pelo teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 32 - Efeito do ácido oleico na proliferação de células-tronco mesenquimais *in vitro*.

As células-tronco mesenquimais foram incubadas por 18 horas com ácido oléico. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: Pinheiro (2012).

Foi observada menor expressão de marcadores de ativação (Hes-1) e proliferação (Pax7 e PCNA) no músculo esquelético 48 horas após o transplante celular de células-tronco musculares pré-tratadas com ácido oléico (100 μM) por 18h (Fig 33). Não houve alteração no consumo alimentar (Dados não mostrados).

Figura 33 - Expressão de marcadores de ativação de células-tronco musculares 48 horas após o transplante celular.

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.
 Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 34 - Desenho experimental para investigação do efeito do ácido oléico no enxerto e efeito do tratamento com células-tronco musculares na regeneração do músculo esquelético.

As células-tronco musculares ($4,5 \times 10^6$ células) foram isoladas de camundongos transgênicos GFP (*green fluorescent protein*) machos (20 semanas) e transplantadas no músculo esquelético (gastrocnêmio) de camundongos selvagens (C57BL/6) machos (20 semanas).

Fonte: Pinheiro (2012).

Fibras musculares esqueléticas positivas para GFP foram observadas nas secções histológicas obtidas do músculo esquelético de camundongos selvagens que receberam terapia celular (Fig 35B). Corroborando com os achados obtidos em ratos, o pré-tratamento da células-tronco musculares com ácido oléico diminuiu o enxerto dessas células no músculo esquelético lesionado como pôde ser observado pelo menor número de fibras musculares GFP+ no nas secções histológicas do músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL/6 (Fig. 35C e 35D).

Figura 35 - Presença de fibras musculares esqueléticas expressando a GFP no músculo esquelético lesionado de camundongos selvagens que receberam terapia com células-tronco musculares pré-tratadas ou não com ácido oléico.

A) Corte histológico transversal, colo de músculo não-lesionado (controle) visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X). Pode-se observar autofluorescência do tecido muscular esquelético. (B) Corte histológico transversal de músculo lacerado e não-tratado com GFP marcada (fibras musculares em verde mais acentuado) por imunohistoquímica e visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X) 28 dias após a lesão. (C) Corte histológico transversal de músculo lacerado e tratado com células-tronco musculares pré-tratadas com ácido oléico (100 μ M) com GFP marcada (não detectadas nesse corte) por imunohistoquímica e visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X) 28 dias após a lesão. (D) Outro corte histológico transversal de músculo lacerado e tratado com células-tronco musculares pré-tratadas com ácido oléico (100 μ M) com GFP marcada (setas) por imunohistoquímica e visualizado com aumento de 100X (objetiva de 10X) 28 dias após a lesão. Observa-se o menor enxerto de células-tronco musculares GFP pré-tratadas com ácido oléico.

Fonte: Pinheiro (2012).

Com auxílio da imunohistoquímica com dupla marcação para GFP e miosina neonatal (expressa apenas em fibras musculares regeneradas; não é expressa em fibras musculares maduras) o enxerto celular foi quantificado. Menor número de fibras musculares esqueléticas GFP+/Miosina neonatal+ foi observado no músculo esquelético lesionado que recebeu células-tronco musculares pré-tratadas com ácido oléico (Fig. 36A). O ganho na recuperação funcional do músculo lacerado observado após o transplante de células-tronco musculares não foi observado quando as células foram pré-tratadas com ácido oléico (Fig. 36B).

Figura 36 - Efeito do pré-tratamento com ácido oléico (100 μ M) no enxerto e efeito do transplante de células-tronco musculares na recuperação funcional do músculo esquelético lacerado.

Fonte: Pinheiro (2012).

Em camundongos com distrofia muscular suplementados com ácido oleico por 20 dias, houve diminuição do número de fibras com o mionúcleo centralizado, diâmetro das fibras musculares e também da expressão de Hes-1, Pax7 e PCNA (Tabela 2, Figs 37 e 38). A suplementação com ácido oleico por 28 dias em ratos e 20 dias em camundongos mdx não alterou o consumo alimentar e o ganho de peso corporal (Dados não mostrados).

4.6 Suplementação diminui a capacidade regenerativa do músculo esquelético em camundongos com distrofia muscular

Tabela 2 - Efeito da suplementação com ácido oléico no diâmetro de fibras musculares e fibras com núcleo centralizado (marcador de regeneração) no músculo tibial anterior de camundongos distróficos *mdx*.

	C57BL	Mdx Controle	Mdx Ácido Oléico
Área de secção transversa (μm^2)			
Média $\pm$ EP	12148 $\pm$ 165	11189 $\pm$ 261	10080 $\pm$ 236
Intervalo de Confiança de 95%	11824 - 12472	10676 – 11702*	9617 - 10543*#
Fibras com núcleos não-periféricos (%)			
Média $\pm$ EP	0.25 $\pm$ 0.03	81.79 $\pm$ 1.65*	75 $\pm$ 1.70*#

* Diferença significativa vs. C57BL/10, # Diferença significativa vs. Mdx Controle (tratado apenas com água).
Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 37 - Efeito da suplementação com ácido oléico 0,45g/kg na morfologia e área de secção transversa do músculo tibial anterior em camundogos *mdx*.

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de seis observações.
 Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 38 - Efeito da suplementação com ácido oléico na sinalização Notch, Pax7 e PCNA no músculo esquelético de camundogos *mdx*.

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão de doze observações. Os dados foram analisados estatisticamente através do teste t de Student.

Fonte: Pinheiro (2012).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que a miogênese é acompanhada de alterações na composição de ácidos graxos em células-tronco musculares (células satélites). Durante a miogênese *in vitro* observou-se diminuição do conteúdo total de AGs saturados e aumento do conteúdo total de AGs insaturados com consequente aumento no índice de insaturação. Dentre os AGs saturados, os ácidos palmítico e esteárico tiveram seu conteúdo diminuído durante a miogênese. Já entre os AGs insaturados, o conteúdo dos ácidos oléico e araquidônico aumentou. Houve também aumento da expressão e do índice de atividade da delta-9-dessaturase que converte ácido esteárico em ácido oléico. O tratamento de células-tronco musculares, 6 horas após o plaqueamento, com ácido oléico aumentou o diâmetro dos miotubos em 3 e 7 dias após a indução da miogênese *in vitro* de maneira dose dependente. O tratamento com ácido oléico também aumentou o conteúdo de fatores reguladores da miogênese (MyoD, miogenina e myf-6) em 3 dias e o conteúdo de cadeia pesada da miosina em 7 dias de diferenciação com o máximo efeito observado na dose de 100 μ M. Antes da indução da diferenciação, o tratamento com ácido oléico (100 μ M) diminuiu a taxa de proliferação de células-tronco musculares que foi avaliada pela incorporação de timidina marcada com carbono-14 e expressão de PCNA e ciclina D1. A sinalização Notch, que regula a proliferação e reprime a diferenciação nessas células, foi diminuída pelo tratamento com ácido oléico (100 μ M) como pode ser observado pela diminuição do conteúdo de Hes-1, sem alterações no conteúdo do ligante do Notch delta-like 1, na clivagem do receptor Notch (ausência de efeito no conteúdo de Notch clivado) e do inibidor endógeno Numb. Houve também aumento do conteúdo de beta-catenina, proteína estimuladora da miogênese, e inibição da GSK3-beta que fosforila a beta-catenina para degradação. Resumidamente, esses resultados sugerem que o aumento de ácido oléico durante a miogênese em células-tronco musculares pode estar associado a aceleração da diferenciação por inibição da sinalização Notch e consequentemente do ciclo celular. O transplante autólogo local (nas bordas da lesão) de células-tronco musculares (não-cultivadas) de ratos machos melhorou a regeneração do músculo gastrocnêmio de fêmeas lesionado por laceração. O enxerto celular avaliado por expressão do gene SRY, 25 dias após o transplante e 28 dias após a lesão, foi diretamente proporcional ao número de células-tronco transplantadas. Houve melhora parcial no ganho de força muscular (força tetânica) e aumento de marcadores de regeneração muscular como miosina neonatal e desmina. Já o transplante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos machos melhorou a regeneração do músculo gastrocnêmio de fêmeas restaurou a força muscular (força tetânica) e aumento de marcadores de regeneração muscular como miosina neonatal e desmina indicando ter sido mais efetivo no tratamento desse tipo de

lesão. Comparativamente, houve maior expressão do gene SRY (indicando maior enxerto celular) após o transplante de células-tronco musculares ($4,5 \times 10^6$ células) do que após o transplante da mesma quantidade de células-tronco mesenquimais sugerindo que parte dos efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais nesse modelo pode ter ocorrido por mecanismos independentes do enxerto celular, possivelmente por modulação do microambiente pós-lesão. Houve menor enxerto células-tronco musculares nos músculos lesionados de animais suplementados com ácido oléico (de 24 horas até 28 dias pós lesão) quando comparado aos animais tratados com água (placebo). Nenhum efeito foi observado no enxerto de células-tronco mesenquimais nos músculos lacerados. A expressão de PCNA e Hes-1 foi avaliada nos músculos lacerados de animais tratados com água ou com ácido oléico 48 horas após o transplante de células-tronco musculares. Observou-se que nos músculo de animais tratados com água e que receberam terapia celular houve aumento da expressão de Hes-1 e PCNA sugerindo ativação e proliferação das células transplantadas no tecido. Esse aumento não ocorreu nos animais tratados com ácido oléico. O tratamento com ácido oléico também foi administrado a camundongos com distrofia muscular por deficiência de distrofina. Após 20 dias de suplementação, houve diminuição do número de fibras musculares com mionúcleo centralizado (marcador de fibras recém-formadas) e do diâmetro das fibras musculares do tibial anterior assim como menor expressão de Hes-1 e PCNA também foram observadas no músculo desses animais. Conclui-se que a ativação das células-tronco musculares transplantadas é importante para o efeito da terapia com esse tipo de células na laceração muscular. A associação de terapia com células-tronco musculares e suplementação com ácido oléico, já na fase aguda pós-lesão, diminui o enxerto celular por diminuir a sinalização Notch e consequentemente a proliferação celular.

Poucos estudos reportam o efeito do ácido oléico na diferenciação de células musculares. Hurley et al. (2006) demonstraram que o tratamento com ácido oléico aumenta a atividade da creatina quinase (uma enzima muscular específica) em todas as concentrações testadas em mioblastos L6. Baseados nesse achado, esses autores inferiram que o ácido oléico tem efeito modulador na diferenciação miogênica. Entretanto, somente a análise da atividade da creatina quinase não nos permite concluir que o ácido graxo modula a miogênese naquele modelo. A diferenciação miogênica é um fenômeno complexo e precisamente regulado que se inicia com a expressão de MyoD (redução da proliferação celular), miogenina (formação de miotubos) e Myf-6 (expressão de miosina, creatina quinase e outras proteínas musculares (MAK et al., 1992; WYZYKOWSKI et al., 2002). Dentre os eventos precoces da miogênese, está a diminuição da proliferação celular que ocorre como resposta ao aumento do conteúdo de MyoD. A diferenciação de células-tronco musculares é inibida pela atividade dos complexos ciclina /

ciclina-quinase dependente (Cdks) (GUO e WALSH, 1997). O MyoD é um fator de transcrição envolvido na regulação da miogênese sendo que células-tronco musculares MyoD-deficientes tem baixo potencial de diferenciação (SABOURIN et al., 1999). Quando expresso, resulta em inibição das atividades dos complexos ciclina/Cdks devido à indução do aumento de p21 (GUO et al., 1995; PURI et al., 1997). No presente estudo, o ácido oléico reduziu a proliferação de células-tronco muscular, provavelmente, por estimular a expressão dos fatores reguladores da miogênese.

Esse efeito do ácido oléico na sinalização do Notch tem implicação na aceleração da diferenciação miogênica uma vez que o Hes-1 reprime a miogênese por apresentar efeito inibitório na expressão de MyoD (BRACK et al., 2008). Maior conteúdo de ácido oléico e maior atividade da delta-9-desaturase sugerem um envolvimento desse ácido graxo na regulação da miogênese. A sinalização do Notch está envolvida na regulação da proliferação celular e determinação do destino das células-tronco musculares sendo que a ativação dessa sinalização inibe a diferenciação miogênica (SHAWBER et al., 1996). Em mioblastos C2C12, a diferenciação miogênica é marcadamente inibida pela expressão ectópica de Notch-clivado, mas não pela expressão do receptor Notch e o co-cultivo das células C2C12 com os ligantes do Notch (Delta-1 e Jagged-1) também inibem a miogênese (JARRIAULT et al., 1995; KATO et al., 1997; KOPAN et al., 1994). O receptor Notch, quando clivado, rapidamente induz a expressão de Hes-1 que leva a inibição da diferenciação miogênica pela inibição da expressão do MyoD e supressão da atividade transcricional do MyoD (BRACK et al., 2008; JARRIAULT et al., 1995). No presente trabalho, o tratamento com ácido oléico reduziu o conteúdo de Hes-1 em células-tronco musculares, mas não alterou o conteúdo de Delta-1, Notch-clivado e Numb. Durante a miogênese, há inibição da sinalização Notch e via ativação da sinalização Wnt / β -catenina através da inibição da GSK3 β (BRACK et al., 2008). GSK3 β é ativa em células-tronco indiferenciadas, momento em que a sinalização Notch está ativa (CONBOY e RANDO, 2002). A inibição da GSK3 β através da sua fosforilação em serina 9 aumenta a estabilização da β -catenina e é importante para o processo de miogênese uma vez que a atividade transcricional dos fatores miogênicos e expressão de miosina de cadeia pesada são aumentadas pela β -catenina (BRACK et al., 2008; PAN et al., 2005, 2006). O tratamento de progenitores miogênicos *in vitro* com cloreto de lítio (LiCl) ativa a sinalização canônica do Wnt e inibe a GSK3 β resultando em aumento do conteúdo de β -catenina e em resposta à esse efeito há aumento da expressão de MyoD, Miogenina e Myf-5 indicando que o acúmulo de β -catenina acelera a miogênese (YANG et al., 2011). No presente estudo, células-tronco musculares tratadas com ácido oleico exibiram maior fosforilação da GSK3 β em serina 9 e aumento do conteúdo de β -catenina. Bloqueio de delta-9-desaturase por *knockdown* está associado a diminuição da fosforilação da GSK3 β em serina 9

(SCAGLIA e IGAL, 2008). No presente trabalho, não foram observadas alterações na expressão de Wnt3a e Wnt5a sugerindo ausência do envolvimento dessas vias no efeito modulador do ácido oléico na miogênese. Entretanto as Wnts são proteínas que podem ser modificadas estruturalmente por lipídeos (por exemplo; por palmitoilação) e tem-se demonstrado que essas alterações são importantes para secreção dessas proteínas (armazenada em vesículas) e para interação com o receptor frizzled (para revisão ver MIKELS e NUSSE, 2006). Dessa maneira, admite-se que ácidos graxos possam modular a via de sinalização Wnt.

Figura 39 - Envolvimento da β -Catenina na regulação da função de células-tronco musculares (células satélites).

A β -Catenina tem duas funções: adesão célula-célula (através da formação de um complexo com α -Catenina e caderinas) e modulação da expressão gênica. Quando conjugada à caderinas, a β -Catenina pode regular o ciclo celular (inibindo-o) quando da interação célula-célula. Entretanto, a substituição de aminoácidos na molécula e a prevenção da formação do complexo com a α -Catenina não exerce nenhum efeito na miogênese indicando que a função de adesão celular não é importante para diferenciação de células-tronco musculares (KIM et al., 2008). A estimulação da miogênese pela β -Catenina é mediada por aumento na atividade transcritorial do MyoD (KIM et al., 2008). A β -Catenina também está envolvida na auto-renovação de células-tronco musculares (PEREZ-RUIZ et al., 2008).

Fonte: Pinheiro (2012).

Figura 40 - Mecanismo proposto para o efeito do ácido oléico na modulação da proliferação e diferenciação de células-tronco musculares.

O ácido oléico estimula a fosforilação de GSK3 β em serina 9 (inibição) o que resulta no aumento do conteúdo total de β -Catenina sugerindo tanto aumento da forma complexada com caderinas (função de adesão celular) quanto na forma livre com migração nuclear (ação genômica). Esse efeito do ácido oléico poderia ser mediado por maior sensibilidade das vias de sinalização que inibem a GSK3 β incluindo as sinalizações Wnt, insulina/IGF-1 e mTOR. NICD = Domínio intracelular do Notch.

Fonte: Pinheiro (2012).

O efeito do ácido oleico na aceleração do processo de diferenciação muscular poderia potencializar o efeito da terapia celular na laceração muscular, uma vez que essa lesão que apresenta regeneração incompleta. Demonstramos que o transplante de células-tronco musculares melhora a regeneração do músculo esquelético lesionado por laceração. Após a lesão por laceração, o músculo esquelético regenera-se lentamente e de forma incompleta sendo acompanhado por fibrose intensa e recuperação parcial da função muscular (MENETREY et al.,

1999). O cultivo de células-tronco é uma etapa importante na preparação das células no período pré-transplante uma vez que a expansão da população de células *in vitro* é um fator importante para o sucesso da terapia celular. Embora os mioblastos possam se fundir com fibras musculares necrosadas e prevenir a degeneração de algumas fibras no local da lesão (HUARD et al., 1994), o cultivo de células-tronco musculares diminui a sua capacidade de enxertia e eficiência em reparar a lesão muscular diferentemente do transplante de células-tronco muscular não-cultivadas (SACCO et al., 2008) corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho. Isso pode ser parcialmente explicado pela baixa resistência dos mioblastos à apoptose devido a expressão do MyoD nessas células (ASAKURA et al., 2007). Células-tronco modificadas para não expressar o gene MyoD sobrevivem mais tempo após o transplante no músculo esquelético em regeneração (ASAKURA et al., 2007). Entretanto, essas células possuem baixa capacidade de diferenciação miogênica (SABOURIN et al., 1999). No presente estudo, demonstramos originalmente que o transplante de células-tronco musculares melhora a recuperação da função muscular avaliada *in vivo* assim como aumenta os marcadores de regeneração no músculo esquelético lesionado por laceração. Entretanto, o transplante de células-tronco musculares não foi mais efetivo que o transplante de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em restaurar a produção de força máxima no músculo em regeneração. Embora a força muscular tenha sido restaurada após o transplante de células-tronco mesenquimais, o enxerto celular foi maior após o transplante de células-tronco musculares. Nos últimos anos, vários autores (BITTNER et al., 1999; BRAZELTON et al., 2000; FERRARI et al., 1998, 2001; FUKADA et al., 2002; GUSSONI et al., 1999; JACKSON et al., 2001; KRAUSE et al., 2001; LAGASSE et al., 2000; MEZEY et al., 2000; ORLIC et al., 2001) demonstraram que o transplante de células-tronco derivadas da medula óssea para o tratamento da lesão em diferentes tecidos (incluindo o coração, cérebro, músculo esquelético e fígado) de animais de laboratório é acompanhado do aumento da expressão de proteínas específicas de cada tecido. Em relação à capacidade de enxertia e efeito terapêutico no músculo esquelético, evidências (FERRARI et al., 1998, 2001; FUKADA et al., 2002; GUSSONI et al., 1999) foram obtidas em modelos de distrofia muscular ou lesão muscular induzida por miotoxinas. Na laceração muscular, demonstramos que o transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea foi efetivo em restaurar a função e aumentar os marcadores de regeneração no músculo esquelético lesionado por laceração. A descrição dos efeitos da terapia celular nesse tipo de modelo ainda é escassa na literatura. Shi et al. (2009) demonstraram que o transplante de células-tronco CD133+ foi efetivo em melhorar a regeneração do músculo esquelético após laceração melhorando principalmente a formação de novos vasos sanguíneos.

Admite-se que as células-tronco mesenquimais após serem transplantadas na lesão muscular se transdiferenciam em células satélites e regeneram o tecido. Entretanto, LaBarge e Blau (2002) indicam que apenas uma pequena população dessas células realmente se diferencia em células musculares. É possível que essas células estimulem a regeneração espontânea do tecido por ações parácrinas como a estimulação direta de células-tronco residentes no tecido, efeito imuno-modulador e estimulação da neoangiogênese. Essa hipótese poderia explicar a grande melhora na recuperação da força após o transplante de células-tronco mesenquimais da medula óssea quando comparado com células-tronco musculares uma vez que esperávamos que as primeiras se transdiferenciassem nas segundas. Observamos também em trabalho (PINHEIRO et al., 2011) publicado recentemente que o transplante de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo restaurou a força muscular em camundongos distróficos. Entretanto, a grande recuperação funcional foi acompanhada por modesto aumento nos marcadores de miogênese (miogenina) e regeneração (fibras com mionúcleo centralizado) indicando que o efeito terapêutico estaria associado a outras ações dessas células. Houve nesses animais grande diminuição de marcadores inflamatórios (TNF-alfa e IL-6), do estresse oxidativo e da sinalização para fibrose (TGF-beta1) ao passo que também houve aumento do estímulo para neoangiogênese e preservação da massa muscular.

Observamos também que a associação da suplementação com ácido oléico e a terapia celular reduz o enxerto de células-tronco muscular ao passo que não altera o enxerto de células-tronco mesenquimais indicando que esse ácido graxo pode reduzir os efeitos da terapia com células-tronco musculares em miopatias. Nossos resultados *in vitro* demonstraram que o ácido oléico acelera a miogênese por reduzir a sinalização Notch via diminuição da expressão de Hes-1 promovendo a saída das células do ciclo celular e retirando o efeito repressor desse fator de transcrição na miogênese. A avaliação da expressão de marcadores de ativação de células-tronco musculares no músculo receptor mostrou diminuição de Hes-1 e PCNA sugerindo menor proliferação das células transplantadas nos animais lesionados suplementados com ácido oléico. Camundongos distróficos suplementados com ácido oléico apresentaram menor conteúdo de fibras musculares com mionúcleo centralizado (indicando menor regeneração) associado a menor expressão de Hes-1 e PCNA e também diminuição do diâmetro das fibras musculares. Menor ativação da sinalização Notch, devido a elevação do conteúdo de TNF-alfa e atividade do NF-kB, em camundongos mdx prejudica o reparo do tecido muscular nesses animais (ACHARYYA et al., 2010). No presente estudo, o tratamento com ácido oleico diminuiu a expressão de Hes-1 e aumentou a atividade do NF-kB em células-tronco musculares. *In vitro*, o ácido oléico não teve

efeito na proliferação de células-tronco mesenquimais de medula óssea assim como não repercutiu sobre o efeito do transplante dessas células no músculo lesionado.

6 CONCLUSÃO

- Durante a miogênese *in vitro* observou-se diminuição do conteúdo total de AGs saturados e aumento do conteúdo total de AGs insaturados, incluindo o ácido oleico, e aumento no índice de instauração.
- A miogênese também é acompanhada de aumento da expressão e do índice de atividade da delta-9-dessaturase que converte ácido esteárico em ácido oléico.
- O tratamento de células-tronco musculares aumentou o diâmetro dos miotubos em 3 e 7 dias após a indução da miogênese *in vitro* de maneira dose dependente. O tratamento com ácido oléico também aumentou o conteúdo de fatores reguladores da miogênese (MyoD, miogenina e myf-6) em 3 dias e o conteúdo de cadeia pesada da miosina em 7 dias de diferenciação.
- Antes da indução da diferenciação, o tratamento com ácido oleico diminuiu a taxa de proliferação de células-tronco musculares.
- A sinalização Notch, que regula a proliferação e reprime a diferenciação nessas células, foi diminuída pelo tratamento com ácido oleico como pôde ser observado pela diminuição do conteúdo de Hes-1, sem alterações no conteúdo do ligante do Notch delta-like 1, na clivagem do receptor Notch (ausência de efeito no conteúdo de Notch clivado) e do inibidor endógeno Numb. Também aumentou o conteúdo de beta-catenina, proteína estimuladora da miogênese, e inibição da GSK3-beta que fosforila a beta-catenina para degradação.
- O transplante autólogo e local de células-tronco musculares melhorou a regeneração do músculo gastrocnêmio lesionado por laceração. O enxerto celular avaliado por expressão do gene SRY, 25 dias após o transplante e 28 dias após a lesão, foi diretamente proporcional ao número de células-tronco transplantadas. Houve melhora parcial no ganho de força muscular (força tetânica) e aumento de marcadores de regeneração muscular como miosina neonatal e desmina.
- O transplante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos machos melhorou a regeneração do músculo gastrocnêmio de fêmeas restaurou a força muscular (força tetânica) e aumento de marcadores de regeneração muscular como miosina neonatal e desmina indicando ter sido mais efetivo no tratamento desse tipo de lesão.

- Comparativamente, houve maior expressão do gene SRY (indicando maior enxerto celular) após o transplante de células-tronco musculares ($4,5 \times 10^6$ células) do que após o transplante da mesma quantidade de células-tronco mesenquimais sugerindo que parte dos efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais nesse modelo pode ter ocorrido por mecanismos independentes do enxerto celular, possivelmente por modulação do microambiente pós-lesão.

- Houve menor enxerto células-tronco musculares pré-tratadas com ácido oléico nos músculos lesionados. Nenhum efeito do pré-tratamento foi observado no enxerto de células-tronco mesenquimais nos músculos lacerados.

- Observou-se que nos músculo de animais que receberam terapia celular houve aumento da expressão de Hes-1, Pax7 e PCNA sugerindo ativação e proliferação das células transplantadas no tecido. Esse aumento não ocorreu com o transplante de células pré-tratadas com ácido oléico. O tratamento com ácido oléico também foi administrado *in vivo* a camundongos com distrofia muscular por deficiência de distrofina. Após 20 dias de suplementação, houve diminuição do número de fibras musculares com mionúcleo centralizado (marcador de fibras recém-formadas) e do diâmetro das fibras musculares do tibial anterior assim como menor conteúdo de Hes-1 e PCNA e menor expressão de Pax7 também foram observadas no músculo desses animais.

Conclui-se que a ativação das células-tronco musculares transplantadas é importante para o efeito da terapia com esse tipo de células na lesão muscular. O pré-tratamento com ácido oléico diminui o enxerto celular por inibir a sinalização do Notch e consequentemente a proliferação celular embora tenha um efeito estimulador na diferenciação por diminuir a expressão de Hes-1, gene repressor da miogênese.

REFERÊNCIAS*

- ACHARYYA, S.; SHARMA, S. M.; CHENG, A. S.; LADNER, K. J.; HE, W.; KLINE, W.; WANG, H.; OSTROWSKI, M. C.; HUANG, T. H.; GUTTRIDGE, D. C. TNF inhibits Notch-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy. **PLoS One**, v. 5, p. e12479, 2010.
- ARSIC, N.; ZACCHIGNA, S.; ZENTILIN, L.; RAMIREZ-CORREA, G.; PATTARINI, L.; SALVI, A.; SINAGRA, G.; GIACCA, M. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. **Mol. Ther.**, v. 10, p. 844-854, 2004.
- ASAKURA, A.; SEALE, P.; GIRGIS-GABARDO, A.; RUDNICKI, M. A. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. **J. Cell Biol.**, v. 159, p. 123-134, 2002.
- ASAKURA, A.; HIRAI, H.; KABLAR, B.; MORITA, S.; ISHIBASHI, J.; PIRAS, B. A.; CHRIST, A. J.; VERMA, M.; VINERETSKY, K. A.; RUDNICKI, M. A. Increased survival of muscle stem cells lacking the MyoD gene after transplantation into regenerating skeletal muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 104, p. 16552-16557, 2007.
- BACHRACH, E.; PEREZ, A. L.; CHOI, Y. H.; ILLIGENS, B. M.; JUN, S. J.; DEL NIDO, P.; MCGOWAN, F. X.; LI, S.; FLINT, A.; CHAMBERLAIN, J.; KUNKEL, L.M. Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. **Muscle Nerve**, v. 34, p. 44-52, 2006.
- BITTNER, R. E.; SCHOFER, C.; WEIPOLTSHAMMER, K.; IVANOVA, S.; STREUBEL, B.; HAUSER, E.; FREILINGER, M.; HOGER, H.; ELBE-BURGER, A.; WACHTLER, F. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. **Anat. Embryol. (Berl.)**, v. 199, p. 391-396, 1999.
- BORNEMANN, A.; SCHMALBRUCH, H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. **Muscle Nerve**, v. 15, p. 14-20, 1992.
- BRACK, A. S.; CONBOY, I. M.; CONBOY, M. J.; SHEN, J.; RANDO, T. A. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. **Cell Stem Cell**, v. 2, p. 50-59, 2008.
- BRAZELTON, T. R.; ROSSI, F. M.; KESHET, G. I.; BLAU, H. M. From marrow to brain. **Science**, v. 290, p. 1775-1779, 2000.
- BROCKS, L.; JAP, P. H.; RAMAEKERS, F. C.; STADHOUDERS, A. M. Vimentin and desmin expression in degenerating and regenerating dystrophic murine muscles. **Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, v. 61, p. 89-96, 1991.
- CARLSON, B. M.; FAULKNER, J. A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 15, p. 187-198, 1983.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHAKRAVARTHY, M. V.; ABRAHA, T. W.; SCHWARTZ, R. J.; FIOROTTO, M. L.; BOOTH, F. W. Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 35942-35952, 2000.

CHAN, Y. S.; LI, Y.; FOSTER, W.; HORAGUCHI, T.; SOMOGYI, G.; FU, F. H.; HUARD, J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, p. 771-780, 2003.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHOW, C. K. **Fatty Acids in Foods and their Health Implications**, Third Edition, CRC Press, New York, N.Y. Chapter 10, 2007.

CONBOY, I. M.; RANDO, T. A. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. **Dev. Cell.**, v. 3, p. 397-409, 2002.

CRISCO, J. J.; JOKL, P.; HEINEN, G. T.; CONNELL, M. D.; PANJABI, M. M. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. **Am. J. Sports Med.**, v. 22, p. 702-710, 1994.

DAS, U. N. **A perinatal strategy for preventing adult diseases**: the role of longchain polyunsaturated fatty acids. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.

DAS, U. N. Essential fatty acidsda review. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 7, p. 467-482, 2006a.

DAS, U. N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology, and pathology. **Biotechnology J.**, v. 1, p. 420-439, 2006b.

DAS, U. N. Leucocyte activation in coronary heart disease: but how and why? **Eur. Heart J.**, v. 29, p. 2317-2318, 2008.

DAS, U. N. Obesity: genes, brain, gut, and environment. **Nutrition**, v. 26, p. 459-473, 2010.

DELDICQUE, L.; THEISEN, D.; BERTRAND, L.; HESPEL, P.; HUE, L.; FRANCAUX, M. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 293, p. C1263-C1271, 2007.

DUGUEZ, S.; FÉASSON, L.; DENIS, C.; FREYSSINET, D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 282, p. E802-9, 2002.

FAN, Y.; MALEY, M.; BEILHARZ, M.; GROUNDS, M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. **Muscle Nerve**, v. 19, p. 853-860, 1996.

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

FERRARI, G.; STORNAIUOLO, A.; MAVILIO, F. Failure to correct murine muscular dystrophy. **Nature**, v. 411, p. 1014-1015, 2001.

FUKADA, S.; MIYAGOE-SUZUKI, Y.; TSUKIHARA, H.; YUASA, K.; HIGUCHI, S.; S. ONO, S.; TSUJIKAWA, K.; TAKEDA, S.; YAMAMOTO, H. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 1285–1293, 2002.

FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; USAS, A.; RIANO, F.; FU, F.; HUARD, J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. **Am. J. Sports Med.**, v. 29, p. 394–402, 2001.

GARRETT, W. E.; JR SEABER, A. V.; BOSWICK, J.; URBANIAK, J. R.; GOLDNER, J. L. Recovery of skeletal muscle after laceration and repair. **J. Hand Surg. [Am].**, v. 9, p. 683–692, 1984.

GUO, K.; WANG, J.; ANDRÉS, V.; SMITH, R. C.; WALSH, K. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 3823–3829, 1995.

GUO, K.; WALSH K. Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 791–797, 1997.

GUSSONI, E.; PAVLATH, G. K.; LANCTOT, A. M.; SHARMA, K. R.; MILLER, R. G.; STEINMAN, L.; BLAU, H. M. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. **Nature**, v. 356, p. 435–438, 1992.

GUSSONI, E.; BLAU, H. M.; KUNKEL, L. M. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. **Nat. Med.**, v. 3, p. 970–977, 1997.

GUSSONI, E.; SONEOKA, Y.; STRICKLAND, C. D.; BUZNEY, E. A.; KHAN, M. K.; FLINT, A. F.; KUNKEL, L. M.; MULLIGAN, R. C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**, v. 401, p. 390–394, 1999.

JACKSON, K. A.; MAJKA, S. M.; WANG, H.; POCIUS, J.; HARTLEY, C. J.; MAJESKY, M. W.; ENTMAN, M. L.; MICHAEL, L. H.; HIRSCHI, K. K.; GOODELL, M. A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 1395–1402, 2001.

JAHNKE, V. E.; SABIDO, O.; FREYSSINET, D. Control of mitochondrial biogenesis, ROS level, and cytosolic Ca²⁺ concentration during the cell cycle and the onset of differentiation in L6E9 myoblasts. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 296, p. C1185–C1194, 2009.

HAMAÏ, N.; NAKUMURA, M.; ASANO, A. Inhibition of mitochondrial protein synthesis impaired C₂C₁₂ myoblast differentiation. **Cell Struct. Funct.**, v. 22, p. 421–431, 1997.

HANNAFIN, J. A. et al. Pathophysiology and healing of musculoskeletal tissues. In: GRIFFIN, L. Y. **Orthopaedic knowledge update: sports medicine**. Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994. p. 17–33.

HERZBERG, N. H; ZWART, R.; WOLTERMAN, R. A.; RUITER, J. P.; WANDERS, R. J.; BOLHUIS, P. A.; VAN DEN BOGERT, C. Differentiation and proliferation of respiration-deficient human myoblasts. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1181, p. 63-67, 1993.

HRISTOV, M.; ZERNECKE, A.; BIDZHEKOV, K.; LIEHN, E. A.; SHAGDARSUREN, E.; LUDWIG, A.; WEBER, C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. **Circ. Res.**, v. 100, p. 590-597, 2007.

HU, Z.; WANG, H.; LEE, I. H.; MODI, S.; WANG, X.; DU, J.; MITCH, W. E. PTEN inhibition improves muscle regeneration in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, v. 59, p. 1312-1320, 2010.

HUARD, J.; VERREAULT, S.; ROY, R.; TREMBLAY, M.; TREMBLAY, J. P. High efficiency of muscle regeneration following human myoblast clone transplantation in SCID mice. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 586-599, 1994.

HURME, T.; KALIMO, H.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 23, p. 801-810, 1991.

HURME, T.; KALIMO, H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 24, p. 197-205, 1992.

HURLEY, M. S.; FLUX, C.; SALTER, A. M.; BRAMELD, J. M. Effects of fatty acids on skeletal muscle cell differentiation in vitro. **Br. J. Nutr.**, v. 95, p. 623-630, 2006.

JARRIAULT, S.; BROU, C.; LOGEAT, F.; SCHROETER, E. H.; KOPAN, R.; ISRAEL, A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. **Nature**, v. 377, p. 355-358, 1995.

KÄÄRIÄINEN, M.; KÄÄRIÄINEN, J.; JÄRVINEN, T. L.; SIEVÄNEN, H.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. **J. Orthop. Res.**, v. 16, p. 197-206, 1998.

KATO, H.; TANIGUCHI, Y.; KUROOKA, H.; MINOGUCHI, S.; SAKAI, T.; NOMURAOKAZAKI, S.; TAMURA, K.; HONJO, T. Involvement of RBP-J κ in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. **Development**, v. 124, p. 4133-4141, 1997.

KIM, C. H.; NEISWENDER, H.; BAIK, E. J.; XIONG, W. C.; MEI, L. Beta-catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity. **Mol. Cell Biol.**, v. 28, p. 2941-2951.

KIMBALL, S. R.; SHANTZ, L. M.; HORETSKY, R. L.; JEFFERSON, L. S. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 11647-11652, 1999.

KOPAN, R.; NYE, S. J.; WEINTRAUB, H. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. **Development**, v. 120, p. 2385-2396, 1994.

KRAUSE, D. S.; THEISE, N. D.; COLLECTOR, M. I.; HENEGARIU, O.; S. HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S. J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, p. 369–377, 2001.

LABARGE, M. A., BLAU, H. M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. **Cell**, v. 111, p. 589-601, 2002.

LAGASSE, E.; CONNORS, H.; AL-DHALIMY, M.; REITSMA, M.; DOHSE, M.; OSBORNE, L.; WANG, X.; FINEGOLD, M.; WEISSMAN, I. L.; GROMPE, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. **Nat. Med.**, v. 6, p. 1229–1234, 2000.

LEE, J. H.; TACHIBANA, H.; MORINAGA, Y.; FUJIMURA, Y.; YAMADA, K. Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids. **Life Sci.**, v. 84, p. 415-420, 2009.

LI, Y.; LI, J.; ZHU, J.; SUN, B.; BRANCA, M.; TANG, Y.; FOSTER, W.; XIAO, X.; HUARD, J. Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. **Mol. Ther.**, v. 15, p. 1616-1622, 2007.

LUO, D.; RENAULT V. M.; RANDO T. A. The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 612-622, 2005.

MAK, K. L.; TO, R. Q.; KONG, Y.; KONIECZNY, S. F. The MRF4 activation domain is required to induce muscle-specific gene expression. **Mol. Cell Biol.**, v. 12, p. 4334-4346, 1992.

MARTINS, E. F.; MIYASAKA, C. K.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Changes of fatty acid composition in incubated rat pancreatic islets. **Diabetes Metab.**, v. 30, p. 21-27, 2004.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 9, p. 493-495, 1961.

MENDELL, J. R.; KISSEL, J. T.; AMATO, A. A.; KING, W.; SIGNORE, L.; PRIOR, T. W.; SAHENK, Z.; BENSON S.; MCANDREW, P. E; RICE, R. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, p. 832-838, 1995.

MENETREY, J.; KASEMKIJWATTANA, C.; FU, F. H.; MORELAND, M. S.; HUARD J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. **Am. J. Sports Med.**, v. 27, p. 222-229, 1999.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA, G.; MAKI, R. A.; MCKERCHER, S. R. Turning blood into brain. **Science**, v. 290, p. 1779–1782, 2000.

MIKELS, A. J.; NUSSE, R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. **Oncogene.**, v. 25, p. 7461-7468, 2006.

MILLER, R. G; SHARMA, K. R; PAVLATH, G. K; GUSSONI, E.; MYNHIER, M.; LANCTOT, A. M.; GRECO, C. M.; STEINMAN, L.; BLAU, H. M. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. **Muscle Nerve**, v. 20, p. 469-478, 1997.

MIYASAKA, C. K.; MENDONCA, J. R.; NISHIYAMA, A.; DE SOUZA, J. A.; PIRES DE MELO, M.; PITHON-CURI, T. C.; CURT, R. Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes. **Life Sci.**, v. 69, p. 1739-1751, 2001.

MORAN, J. L.; LI, Y.; HILL, A.A.; MOUNTS, W.M.; MILLER, C.P. Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. **Physiol. Genomics**, v. 10, p. 103-111, 2002.

MORIMOTO, H.; TAKAHASHI, M.; SHIBA, Y.; IZAWA, A.; ISE, H.; HONGO, M.; HATAKE, K.; MOTOYOSHI, K.; IKEDA, U. Bone marrow-derived CXCR4+ cells mobilized by macrophage colony-stimulating factor participate in the reduction of infarct area and improvement of cardiac remodeling after myocardial infarction in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 171, p. 755-766, 2007.

NEGISHI, S.; LI, Y.; USAS, A.; FU, F. H.; HUARD J. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries. **Am. J. Sports Med.**, v. 33, p. 1816-1824, 2005.

NGUYEN, M. H.; CHENG, M.; KOH, T. J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. **Scientific World Journal**, v. 11, p. 1525-1535, 2011.

ODEMIS, V.; BOOSMANN, K.; DIETERLEN, M. T.; ENGELE, J. The chemokine SDF1 controls multiple steps of myogenesis through atypical PKCzeta. **J. Cell Sci.**, v. 120, p. 4050-4059, 2007.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S. M.; LI, B.; PICKEL, J.; MCKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D. M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701-705, 2001.

PAN, W.; JIA, Y.; WANG, J.; TAO, D.; GAN, X.; TSIOKAS, L.; JING, N.; WU, D.; LI, L. Beta-catenin regulates myogenesis by relieving I-mfa-mediated suppression of myogenic regulatory factors in P19 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, p. 17378-17383, 2005.

PAN, W.; JIA, Y.; HUANG, T.; WANG, J.; TAO, D.; GAN, X.; LI, L. Beta-catenin relieves I-mfa-mediated suppression of LEF-1 in mammalian cells. **J. Cell. Sci.**, v. 119, p. 4850-4856, 2006.

PARKER, M. H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, p. 497-507, 2003.

PARTRIDGE, T.; LU, Q. L.; MORRIS, G.; HOFFMAN, E. Is myoblast transplantation effective? **Nat. Med.**, v. 4, p. 1208-129, 1998.

PEDICONI, M. F.; POLITI, L. E.; BOUZAT, C. B.; DE LOS SANTOS, E. B.; BARRANTES, F. J. Myogenic differentiation of the muscle clonal cell line BC3H-1 is accompanied by changes in its lipid composition. **Lipids**, v. 27, p. 669-675, 1992.

PEREZ-RUIZ, A.; ONO, Y.; GNOCCHI, V. F.; ZAMMIT, P. S. beta-Catenin promotes self-renewal of skeletal-muscle satellite cells. **J. Cell Sci.**, v. 121, p. 1373-1382, 2008.

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.; CURT, R. 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.**, 2011. [In Press]

PRIVES, J.; SHINITZKY, M. Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells. **Nature**, v. 268, p. 761-763, 1977.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, p. 71-74, 1997.

PURI, P. L.; BALSANO, C.; BURGIO, V.L.; CHIRILLO, P.; NATOLI, G.; RICCI, L.; MATTEI, E.; GRAESSMANN, A.; LEVRERO, M. MyoD prevents cyclinA/cdk2 containing E2F complexes formation in terminally differentiated myocytes. **Oncogene**, v. 14, p. 1171-1184, 1997.

QU, Z.; BALKIR, L.; VAN DEUTEKOM, J. C.; ROBBINS, P. D.; PRUCHNIC, R.; HUARD, J. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. **J. Cell Biol.**, v. 142, p. 1257-1267, 1998.

RANDO, T. A.; BLAU, H. M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. **J. Cell Biol.**, v. 125, p. 1275-1287, 1994.

RATAJCZAK, M. Z.; MAJKA, M.; KUCIA, M.; DRUKALA, J.; PIETRZKOWSKI, Z.; PEIPER, S.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. **Stem Cells**, v. 21, p. 363-37, 2003.

REIMANN, J.; BRIMAH, K.; SCHRÖDER, R.; WERNIG, A.; BEAUCHAMP, J. R.; PARTRIDGE, T. A. Pax7 distribution in human skeletal muscle biopsies and myogenic tissue cultures. **Cell Tissue Res.**, v. 315, p. 233-242, 2004.

SABOURIN, L. A.; GIRGIS-GABARDO, A.; SEALE, P.; ASAKURA, A.; RUDNICKI, M. A. Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. **J. Cell Biol.**, v. 144, p. 631-643, 1999.

SACCO, A.; DOYONNAS, R.; KRAFT, P.; VITOROVIC, S.; BLAU, H. M. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. **Nature**, v. 456, p. 502-506, 2008.

SAMPAOLESI, M.; TORRENTE, Y.; INNOCENZI, A.; TONLORENZI, R.; D'ANTONA, G.; PELLEGRINO, M. A.; BARRESI, R.; BRESOLIN, N.; DE ANGELIS, M. G.; CAMPBELL, K. P.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. **Science**, v. 301, p. 487-492, 2003.

SAURO, V. S.; STRICKLAND, K. P. Changes in oleic acid oxidation and incorporation into lipids of differentiating L6 myoblasts cultured in normal or fatty acid-supplemented growth medium. **Biochem J.**, v. 244, p. 743-748, 1987.

SCAGLIA, N.; IGAL, R. A. Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. **Int. J. Oncol.**, v.33, p. 839-850, 2008.

SHAWBER, C.; NOFZIGER, D.; HSIEH, J. J. D.; LINDSELL, C.; BOGLER, O.; HAYWARD, D.; WEINMASTER, G. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a Cbfl-independent pathway. **Development**, v. 122, p.3765–3773, 1996.

SECCO, M.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; FOGAÇA, L. L.; CERQUEIRA, A.; CARVALHO, M. D.; JAZEDJE, T.; OKAMOTO, O.K.; MUOTRI, A. R.; ZATZ, M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, v. 26, p. 146-150, 2008.

SERRANO, A. L.; BAEZA-RAJA, B.; PERDIGUERO, E.; JARDÍ, M.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. **Cell Metab.**, v. 7, p. 33-44, 2008.

SHI, M.; ISHIKAWA, M.; KAMEI, N.; NAKASA, T.; ADACHI, N.; DEIE, M.; ASAHARA, T.; OCHI, M. Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. **Stem Cells**, v. 27 , p. 949-960, 2009.

SMITH, C. K.; JANNEY, M. J.; ALLEN, R. E. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 159, p. 379–385, 1994.

STRATOS, I.; ROTTER, R.; EIPEL, C.; MITTLMEIER, T.; VOLLMAR, B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 103, p. 1857-1863, 2007.

TREMBLAY, J. P.; MALOUIN, F.; ROY, R.; HUARD, J.; BOUCHARD, J. P.; SATOH, A.; RICHARDS, C. L. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. **Cell Transplant.**, v. 2, p. 99-112, 1993.

YANG, Y.; YANG, J.; LIU, R.; LI, H.; LUO, X.; YANG, G. Accumulation of β -catenin by lithium chloride in porcine myoblast cultures accelerates cell differentiation. **Mol. Biol. Rep.**, v. 38, p. 2043-2049, 2011.

WAKITANI, S.; SAITO, T.; CAPLAN, A. I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. **Muscle Nerve**, v. 18, p. 1417-1426, 1995.

WYZYKOWSKI, J. C.; WINATA, T. I.; MITIN, N.; TAPAROWSKY, E. J.; KONIECZNY, S. F. Identification of novel MyoD gene targets in proliferating myogenic stem cells. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 6199-6208, 2002.

VAN DER BOSCH, J.; SCHUDT, C.; PETTE, D. Influence of temperature, cholesterol, dipalmitoyllecithin and Ca^{2+} on the rate of muscle cell fusion. **Exp. Cell Res.**, v. 82, p. 433-438, 1973.

ZAMMIT, P. S.; RELAIX, F.; NAGATA, Y.; RUIZ, A. P.; COLLINS, C. A.; PARTRIDGE, T. A.; BEAUCHAMP, J. R. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 1824-1832, 2006.