

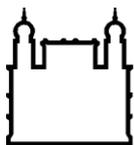
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS, DERIVADOS  
DA MATRIZ EXTRACELULAR PARA TRATAMENTO DE CAMUNDON-  
GOS DISTRÓFICOS

SAMUEL IWAO MAIA HORITA

Rio de Janeiro  
AGOSTO DE 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*SAMUEL IWAO MAIA HORITA*

Avaliação de peptídeos biologicamente ativos, derivados da matriz extracelular para tratamento de camundongos distróficos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientadora :** Prof. Dr. Andrea Henriques Pons

**RIO DE JANEIRO**

Agosto de 2018

Iwao Maia Horita, Samuel.

AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS, DERIVADOS DA MATRIZ EXTRACELULAR PARA TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS / Samuel Iwao Maia Horita. - Rio de Janeiro, 2018.

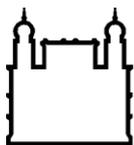
88 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Andrea Henriques Pons.

Bibliografia: f. 81-88

1. Distrofias. 2. Matriz Extracelular. 3. Laminina. 4. Peptídeos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: SAMUEL IWAO MAIA HORITA***

### **AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS, DERIVADOS DA MATRIZ EXTRACELULAR, PARA TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS DIS- TRÓFICOS**

**ORIENTADORA : Prof. Dr. Andrea Henriques Pons**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Ingo Riederer - Presidente** (IOC-Fiocruz)

**Prof. Dra. Cláudia dos Santos Mermelstein** (Instituto de Ciências Biomédicas -UFRJ)

**Prof. Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz** (IOC-Fiocruz)

**Prof. Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira** (IOC-Fiocruz)

**Prof. Dra. Tais Hanae Kasai Brunswick** (Instituto de Biofísica-UFRJ)

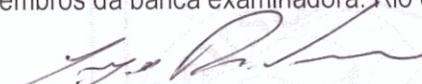
Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2018

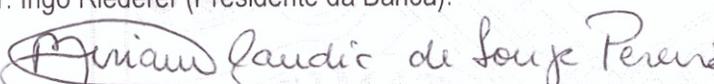


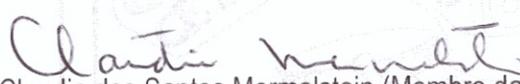
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular de **Samuel Iwao Maia Horita**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Andrea Henriques Pons. Ao trigésimo primeiro dia do mês de agosto de dois mil e dezoito, realizou-se às nove horas, no Auditório do Museu da Vida/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **“Avaliação de peptídeos biologicamente ativos , derivados da matriz extracelular para tratamento de camundongos distróficos”** No programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Imunofarmacologia. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Ingo Riederer - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Mirian Claudia de Souza Pereira - IOC/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Claudia dos Santos Mermelstein - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Tais Hanae Kasai Brunswick – UFRJ/RJ e Dr<sup>a</sup>. Daniella Arêas Mendes da Cruz – IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2018..

  
Dr. Ingo Riederer (Presidente da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Mirian Claudia de Souza Pereira (Membro da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Claudia dos Santos Mermelstein (Membro da Banca):

  
Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

## AGRADECIMENTOS

Ao terminar essa jornada tão intensa, devo agradecer a todos que contribuíram para isso, pois ninguém consegue fazer nada só. Quando terminei o curso de Biomedicina e iniciei o mestrado, achei que somente ia aumentar conhecimento e executar uma dissertação. Porém, conheci pessoas incríveis, aprendi a cozinhar, compreendi o tempo, aumentei minha empatia, aprendi morar sozinho e acompanhado. Não imaginei que mudaria tanto em tão pouco tempo, me sinto mais maduro, confiante e resiliente. Era como um progenitor muscular, indiferenciado, perdido, sem saber sua missão e seu lugar. Hoje me sinto um miotubo, diferenciado, forte, sabendo o motivo pelo qual estou aqui e onde devo estar. Ainda preciso crescer mais, porém já me comprometi com a linhagem miogênica e isso não tem volta...

Preciso agradecer minha irmã Juliana Maia que sempre me cedeu forças e contribuições. Revigora a minha alma com suas músicas, poemas e seu encanto peculiar pelo o Castelo Mourisco. Foi a pessoa que me trouxe a Fiocruz pela primeira vez, ouvindo "Velha Infância" na Avenida Brasil me encorajou a seguir a carreira científica. Agradeço minha irmãzinha Tainá pelo grande carinho, empatia e amor. Sempre sinto sua falta! Seu coração é tão grande que não cabe no mundo. Agradeço ao meu avô japonês e minhas queridas avós, tão dóceis e serenos. Agradeço meus tios, Jair e Célia, pelo interesse, o amor e contribuição. Mesmo longe, sinto vocês torcendo por mim!

Meu pai, Ivan Horita, sempre forte, habilidoso e com a paciência oriental. Me ensinou a ser calmo e que o silêncio é precioso. Sempre me apoiando na minha jornada. Minha mãe que me ensinou a biologia e cultivou o amor por essa. Foi sempre orgulhosa por seguir seus passos e ter uma didática como ela. Obrigado pela sua atenção e suas orações por mim e meus amigos, sem elas talvez não conseguiria seguir. Sinto tanto em estar longe de vocês durante esse período importante, me doía muito! Guardo no meu coração os momentos que passei com vocês. E tenho certeza que sempre vou me desabar em chorar quando nos distanciarmos de novo, mas tenho convicção que minha alma dará uma festa em nosso reencontro.

Nessa incrível jornada, tive o privilégio de ser guiado por duas pesquisadoras incríveis, a doutora Andrea Pons e a doutora Daniela Beghini. No início, não queria fazer mestrado, pois, achava minha letra feia, minha mesa bagunçada e minha postura irreverente. Essas características descartavam a carreira científica da minha cabeça porque não me achava um cientista "perfeito". A Andrea me disse que não existia esse perfil profissional e que meu sorriso persistente e minha força superavam tudo isso. Ela me ofereceu orientação prometendo me aprimorar. Muito obrigado por me salvar, estava prestes a me distanciar do que mais gosto

de fazer, pesquisa científica. Me sinto orgulhoso em ser seu aluno, uma pessoa tão querida e competente me nossa instituição. Por osmose, me ensinou saber se uma célula está "feliz" ou "triste" e sem empatia por células é quase impossível fazer ciência. Quando decidi seguir com o mestrado, a Daniela de forma delicada me convidou para participar de seu projeto, um incrível tesouro. Muito obrigado por esse presente, não me sentia digno de tanta honra. Ela é uma pessoa delicada e forte, sempre com conselhos e boas vibrações. Agradeço por estar ao meu lado e sempre comemorar com os resultados, isso me incentivava a seguir. Me senti acolhido por você e pela sua família, vocês são especiais demais.

Ao sair do interior, precisei ser abrigado na metrópole. Durante todo processo seletivo do mestrado meus amigos, Carlos e Danusa, cederam o lar para me hospedar. Sou eternamente grato pela amizade. Também passei alguns dias na agência funerária de meu amigo querido Renato, uma pessoa de caráter indescritível! Agradeço a hospitalidade e as risadas. Minha amiga Renata Franco e seus pais também forneceram abrigo e transporte a mim, agradecido! Muito obrigado ao Kei e sua mãe Anuciata pela moradia no começo do mestrado na Ilha do Governador. Agradeço ao apartamento da felicidade, no qual morei com 11 pessoas e a incrível Ana. Passei bons momentos e experiências inesquecíveis. Agradeço aos integrantes da minha moradia atual e especialmente a Santusa que me acolheu e me presenteou com sua amizade. Agradeço os meus amigos que conheci no Rio de Janeiro, Isabelly, Maykon e João Victor, vocês iluminaram meu caminho.

Executei meu projeto no Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, onde conheci pessoas incríveis. Agradeço aos servidores Dra. Tânia Araújo, Dra. Cynthia Cascabulho, Dr. Paulo Stefans, Dr. Marcelo Meuser, Dra. Luciana Garzoni e Dra. Viviane Fragoso pelo incalculável apoio. Meus companheiros e alunos do laboratório, Laura Coelho, Beatriz Gonzaga, Juliana Guimarães, Natália Vaccani, Renata Machado, Jade Maia, Matheus Menezes e Raíssa Bantim, muito obrigado pelo companheirismo, comprometimento e pela troca de conhecimento. Em especial, agradeço à Natália pela preocupação e por me acompanhar durante a iniciação científica. Renata, obrigado pela sua verdade, espontaneidade, amizade e competência, sinto muito orgulho de você. Minha querida Juliana, minha alma se misturou tanto com a sua que não me lembro quando te conheci, parece que faz anos. A sua força me inspira todos os dias, portanto, não desista! E nesse laboratório acolhedor, conheci uma japonesa com quem morei, trabalhei, aprendi e fui amigo. Não tem como agradecer o que você e sua família fez por mim, LÍndice! Sinto muito sua falta e torço demais pelo seu sucesso. Agradeço à Thabata Duque pela amizade e pelos conselhos preciosos para uma vida acadêmica saudável.

Fui privilegiado de ser aluno do programa de Biologia Celular e Molecular que me proporcionou disciplinas incríveis, eventos e congressos. Além de alta qualidade de ensino, esse possui um corpo docente com muita empatia e carinho pelos alunos. Agradeço em especial, a secretária Julimar que é muito querida por mim, pelos alunos e orientadores do meu laboratório. Através dos cursos de verão descobri minha capacidade didática, muito obrigado aos coordenadores e a pós-graduação. Nesse trajeto acadêmico conheci meus amigos, Natássia Araújo, Vinícius Guerra, Thyago Leal e Marianne Rocha, obrigado pelo presente da amizade de vocês! Sempre me cedendo favores e companhia. Em memória, agradeço ao aluno Carlos Araújo pela luz e alegria, lamento muito sua perda.

No trajeto do meu projeto na área de miologia me deparei com grupos de pesquisa que me ajudaram bastante. Inicialmente conheci a aluna Yuli Maia e seus orientadores do laboratório de patologia, agradeço por me ajudarem tanto, sempre felizes e disponíveis! Agradeço também ao Dr. Daniel Adesse e sua aluna Paloma do laboratório da Dra Helene Barbosa, vocês foram gentis e me cederam conhecimentos sobre o cultivo de mioblastos. Eterno agradecimentos ao Dr. Ingo e seu grupo: Dra. Mariela, Dr. Arnon, Aline Processi, Rafaella Reis e Camila Sanches. Me senti extremamente acolhido por vocês. No Japão em Tokyo, fui recepcionado pelo Dr. Takeda e pelo Dr. Negishi e seus grupos, muita gratidão por essa experiência.

Nada seria possível sem a colaboração de outros institutos como ICTB e COGIC que fornecem modelos animais e infraestrutura, respectivamente. Agradeço também ao apoio pre-dial, a portaria e a secretaria do Cardosos Fontes e outros pavilhões. Em especial, o Sr. Edgar, o Cristhian, o André e a Jaqueline, sempre sorridentes e servis. Ao DATT, agradeço a Andrea da esterilização e o Manoel que me cedeu espaço em um ultra congelador para abrigar minhas amostras de músculo. Agradeço ao apoio financeiro do meus pais, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e do Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES). Agradeço também a banca avaliadora pela disposição e competência.

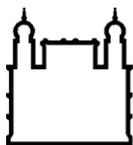
Agradeço a Deus que me guia e me ilumina todos os dias!

Tão satélite,  
Tanto quanto a Lua  
Na órbita do imponente músculo  
Adormecida sobre o leito de sarcolema  
Ingênua entre lençóis da lâmina basal  
A paz que sente deixa-a quiescente

Em súbito o forte músculo  
Com suas vestes rasgadas roga por socorro  
Então ela desabrocha como atalaia despertando na guerra  
Mãe fértil! Gera filhas que dançam pelos cacos de vida  
Bailarinas alinhadas formando braços capazes de abraçar a perda

Assim, o mal se passa  
E uma filha leva toda herança  
Guarda-a em seu peito  
Deleita sobre seu berço  
E aguarda um futuro próximo  
Onde "perder" é sinônimo de "regenerar"

Samuel Horita



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

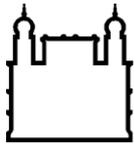
## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Avaliação de peptídeos biologicamente ativos, derivados da matriz extracelular, para tratamentos de camundongos distróficos**

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) atinge 1 a cada 3600 a 600 meninos nascidos vivos e é uma doença genética ligada ao cromossomo X. Ela é causada por mutações no gene da distrofina, levando ao comprometimento na expressão da distrofina, proteína que estabiliza o sarcolema durante a contração. Na DMD, ocorre uma degeneração e fraqueza muscular progressiva, resultando na perda da função muscular, complicações cardiorrespiratórias e a morte em torno aos 20 anos de idade. A laminina-111 (LAM-111) foi proposta para DMD como uma efetiva terapia baseada em proteína, prevenindo a patologia em camundongos mdx, modelo animal da doença. Uma proteólise parcial de proteínas da matriz extracelular, como a laminina-111, produz peptídeos chamados matricinas e vários deles são capazes de modular atividades celulares. Nesse estudo avaliamos o efeito biológico dos peptídeos derivados da LAM-111 em mioblastos e do peptídeo SIKVAV ou da LAM-111 em músculos distróficos de mdx. Para avaliar a adesão de mioblastos, nós incubamos a linhagem celular C2C12 em placas pré-tratadas com 1 µg de LAM-111 ou seus peptídeos e bloqueada com BSA. O peptídeo AG73 foi capaz de promover a adesão assim como a LAM-111. Depois disso, avaliamos a migração de mioblastos com ensaio de *Transwell*, a LAM-111 e seus peptídeos foram incubados com 1, 50 ou 100 µg na câmara inferior. Na parte superior colocamos as células em meio sem soro. Depois de 16 horas, contamos as células migrantes. O AG73 e a LAM-111 promoveram a adesão como o controle positivo de migração com soro. Para avaliar a diferenciação, nós cultivamos mioblastos C2C12 em placas tratadas com 10 µg de LAM-111 e seus peptídeos e induzimos a diferenciação por três dias. Interessantemente, o AG73 aumentou a hipertrofia dos miotubos, o que não foi observado em outras condições. Para avaliação de proliferação nos tempos de 24 e 48 horas, os mioblastos foram incubados em placas tratadas com 1 ou 10 µg de LAM-111 ou peptídeos. Não foram observadas diferenças entre os grupos. Devido aos efeitos biológicos relevantes do peptídeo SIKVAV descritos na literatura, avaliamos o efeito protetor desse fragmento ou da LAM-111 *in vivo* no modelo animal da DMD com ou sem o dano induzido por CTX. Para isso, camundongos mdx de 3 a 4 semanas receberam 100 µL de peptídeo SIKVAV (0,1 µg/mL) ou LAM-111 (100 µM) nas patas direitas e nas patas esquerdas, tampão fosfato (PBS). Depois de três dias, os músculos foram coletados para análise ou foram exacerbados em dano com 100 µL de cardiotoxina (CTX) (10 µM), e depois outras coletas foram realizadas, no quarto e no décimo dia após à injúria. Os tratamentos foram capazes de reduzir os linfócitos no quarto dia após a CTX. A fibrose é um importante evento patológico da doença, o tratamento com LAM-111 foi capaz de reduzir a fibrose no décimo dia após a CTX e o dano seguido de regeneração no quarto dia. Em suma, o peptídeo AG73 demonstrou *in vitro* efeitos biológicos relevantes a fisiologia muscular. E o peptídeo SIKVAV não mostrou efeito protetor em músculos distróficos danificados com CTX.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Evaluation of laminin-111-derived peptides in treatment for dystrophic mice.**

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) affects 1 in 3600 to 6000 male births and is an X-linked recessive disorder. It is caused by mutations in the dystrophin gene, leading to the lack of dystrophin expression, a protein that stabilizes the sarcolemma during muscle contraction. In DMD, there is a progressive muscle weakness and wasting, resulting in loss of motor function, cardiorespiratory complications and death in the 20s. Laminin-111(LAM-111) was proposed as an effective protein-based therapy for DMD, as it prevents the pathology in mdx mice, a murine model for the disease. Furthermore, it improved myoblast transplantation therapy in mdx mice. Partial proteolysis of matrix extracellular proteins, as LAM-111, produces peptides called matrikines and many of them can modulate cell activity. In this study, we investigate the biological effect of laminin-derived peptides or LAM-111 in myoblasts *in vitro* and the treatment in dystrophic muscles of mdx mice with LAM-111 or SIKVAV peptide *in vivo*. To evaluate the myoblast adhesion, C2C12 cell line was incubated in a plate with 1µg of LAM-111 or its derived peptides with BSA blocking. The peptide AG73 was able to promote the myoblast adhesion as LAM-111. Next, we evaluated the myoblast migration using Transwell assay, the LAM-111 or peptides were incubated 1, 50 or 100 µg in the bottom chamber. On the upper chamber, we incubated C2C12 with serum free medium. After 16 hours, we counted the cells in the lower part of membrane. The peptide AG73 and LAM-111 improved myoblast migration as the positive control with serum. To evaluate the myogenic differentiation, we seeded C2C12 cell line in a plate coated with 10µg LAM-111 or peptides and we induced differentiation until the third day. Interestingly, the peptide AG73 enhanced the myotube's diameter but not the other conditions. Next, we cultivate the myoblasts in a plate coated with 1 or 10µg of LAM-111 or peptides for evaluation of proliferation after 24 and 48 hours. We did not observe any differences between the groups. Due the biological effects of SIKVAV described in literature, we evaluate the protective effect of this peptide or laminin-111 in mdx muscles damaged or not with cardiotoxin (CTX). For this, mdx mice with 3 to 4 weeks of age received 100µL of SIKVAV (0,1µg/mL) or LAM-111 (100µM) in right side legs, in other side they received phosphate buffered saline (PBS). After three days, a group of muscles was harvested, and the other groups was injected with 100µL of CTX (10µM), the muscles were collected at 4 or 10 days after CTX-induced injury. The treatments reduced the lymphocytes population in muscles in the fourth day after CTX-induced injury. Fibrosis is an important hallmark in DMD and the treatment of LAM-111 was able to reduce excessive collagen deposition at 10 days after CTX-induced damage. Furthermore, LAM-111 improved the muscle damage followed by regeneration in fourth day after CTX. In conclusion, AG73 peptide demonstrated important biological effects in myoblasts and SIKAV does not have a protective effect in dystrophic muscles damaged with CTX.

# ÍNDICE

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Tecido muscular .....	16
1.2 Fisiopatologia da DMD.....	20
1.3 Estratégias terapêuticas para DMD .....	24
1.3.1 Terapias Gênicas .....	25
1.3.2 Terapia celular .....	26
1.3.3 Terapias farmacológicas .....	27
1.4 Lamininas e o controle da DMD.....	29
1.4.1 LAM-111 .....	30
1.4.2 Fragmentos crípticos ou matricinas.....	30
2 OBJETIVOS .....	34
2.1 Objetivos gerais .....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1 Cultivo celular .....	35
3.2 Peptídeos sintéticos .....	35
3.3 Ensaio de adesão .....	36
3.4 Ensaio de migração celular .....	36
3.5 Índice hipertrófico de miotubos.....	37
3.6 Ensaio de proliferação celular .....	38
3.6.1 Contagem manual.....	38
3.6.2 Quantificação por cristal violeta .....	38
3.7 Animais .....	39
3.8 Tratamento <i>in vivo</i> de LAM-111 e SIKVAV .....	39
3.9 Dano induzido por cardiotoxina .....	40
3.10 Histologia.....	40
3.10.1 Hematoxilina e Eosina e Sirius Red .....	40
3.10.2 Imunohistoquímica de células inflamatórias .....	41
3.10.3 Imunohistoquímica de eMyHC .....	42
3.11 Dosagem de citocinas .....	43
3.12 Análise estatística .....	43
4 Resultados .....	44
4.1 Padronização do cultivo celular de mioblastos da linhagem C2C12.....	44

4.2	Avaliação da adesão de mioblastos em substratos de LAM-111 ou peptídeos.....	46
4.1	4.2 Avaliação do efeito da LAM-111 ou seus peptídeos na migração de mioblastos.....	48
4.3	Avaliação do efeito da LAM-111 ou seus peptídeos na diferenciação de mioblastos.....	50
4.4	Avaliação do efeito da LAM-111 na proliferação de mioblastos.....	52
4.5	Padronização do congelamento de músculos esqueléticos.....	54
4.2	4.6 Padronização do dano induzido por cadiotoxina no <i>tibialis anterior</i> e avaliação da área de infiltrado inflamatório:.....	56
4.3	4.7 Avaliação da modulação inflamatória com tratamento preventivo de LAM-111 ou SIKVAV mediante ao dano induzido por CTX.....	58
4.4	4.8. Caracterização do infiltrado inflamatório muscular.....	61
4.4.1	4.8.1. Quantificação de linfócitos no infiltrado inflamatório muscular.....	61
4.4.2	4.8.2 Quantificação de macrófagos no infiltrado inflamatório muscular....	65
4.5	4.9 Avaliação da fibrose nos músculos tratados.....	68
4.6	4.10 Caracterização do perfil de citocinas dos músculos tratados.....	69
4.7	4.16 Avaliação da regeneração muscular mediante aos tratamentos.....	71
5	5 DISCUSSÃO.....	74
6	6 CONCLUSÃO.....	80
7	7 REFERÊNCIAS.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura do músculo estriado esquelético.....	17
Figura 1.2 Processos celulares envolvendo a miogênese..	19
Figura 1.3 Esquema ilustrativo do complexo distroglicano..	20
Figura 1.4 Patogênese da DMD.....	24
Figura 1.5 Esquema da estrutura da LAM-111 e a localização de seus peptídeos.....	33
Figura 4.1 Morfologia celular da linhagem C2C12.....	45
Figura 4.2 Ensaio de adesão de mioblastos em LAM-111 e seus peptídeos. ....	47
Figura 4.3 Ensaio de migração de mioblastos com LAM-111 e seus peptídeos.....	49
Figura 4.4 Ensaio de diferenciação de mioblastos sobre a LAM-111 e seus peptídeos como substrato.....	51
Figura 4.5 Ensaio de proliferação de mioblastos sobre a LAM-111 e seus peptídeos como substrato por contagem manual. ....	53
Figura 4.6 Ensaio de proliferação de mioblastos sobre a LAM-111 e seus peptídeos como substrato.....	54
Figura 4.7 Padronização do congelamento de músculo esquelético. ....	55
Figura 4.8 Desenho experimental para avaliar o efeito da CTX. ....	56
Figura 4.9 Administração de CTX e aumento na área inflamatória.....	57
Figura 4.10 Desenho experimental para avaliação do tratamento preventivo ao desafio com CTX. ....	58
Figura 4.11 Efeito protetor da LAM-111 e peptídeo SIKVAV (10 e 50 µg) após indução de dano muscular por cardiotoxina. ....	60
Figura 4.12 Desenho experimental do tratamento com LAM-111 e SIKVAV.....	62
Figura 4.13 Infiltrado de linfócitos T (CD3+) no músculo de camundongos tratados do LAM-111 ou SIKVAV. ....	63
Figura 4.14 Infiltração inflamatória por linfócitos após tratamento com LAM-111 ou SIKVAV e dano induzido por CTX. ....	64
Figura 4.15 Infiltrado de macrófagos nos músculos tratados com LAM-111 e SIKVAV.....	66
Figura 4.16 . Infiltrado de macrófagos nos músculos tratados com LAM-111 e SIKVAV mediante ao dano induzido por CTX.....	67
Figura 4.17 Efeito do tratamento com LAM-111 ou SIKVAV sobre a fibrose. ....	69
Figura 4.18 Perfil de citocinas secretadas mediante ao tratamento intramuscular de LAM-111 .....	70
Figura 4.19 Efeito do tratamento da LAM-111 ou o peptídeo SIKVAV sobre o dano e a regeneração muscular induzido pela CTX.....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL: microlitros

μm: micrometros

AON: oligonucleotídeos antisense

CK: Creatinoquinase

CTX: Cardiotoxina

DAMP: Padrões associados a dano

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne

eMyHC: Cadeia pesada de miosina embrionária

HGF: Fator de crescimento do hepatócito

IFN-γ: Interferon do tipo gama

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-10: Interleucina-10

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos 1

MEC: Matriz extracelular

mm: milímetros

MMP: Metalopeptidases

MRF4: Fator de regulação miogênica

Myf-5: fator miogênico tipo 5

MyoD: myogenic differentiation

NF-κB: O fator de nuclear kappa B

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

OCT: Solução criopreservante

Pax-7: Proteína de caixa dupla

PRR: receptores de reconhecimento de padrões

SUS: Sistema Único de Saúde

TGF-β: Fator de crescimento tecidual do tipo beta

TGF-β: fator de crescimento tecidual do tipo beta

TIMP: inibidores teciduais de metalopeptidases de matriz

TLRs: receptores do tipo *toll*

TNF-α: Fator de necrose tumoral

# 1 INTRODUÇÃO

As distrofias musculares são doenças de caráter hereditário caracterizadas por fraqueza e degeneração muscular progressiva com grande variabilidade de distribuição e gravidade. A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é forma mais comum dentre elas, acomete 1 a cada 3600-6000 meninos nascidos vivos (BUSHBY e colab., 2010; RYDER e colab., 2017) e é uma doença rara ligada ao cromossomo X. Os pacientes apresentam dificuldades motoras e a força muscular se deteriora de forma progressiva. Ocorrem complicações cardíacas, ortopédicas e respiratórias, com a morte em torno da maioridade (BUSHBY e colab., 2010; EMERY, 1994).

A etiologia da doença é baseada em mutações que afetam a expressão da distrofina, proteína do citoesqueleto que proporciona a ligação entre a matriz extracelular e a maquinaria contrátil no interior da célula. Geralmente, o início dos sintomas aparece entre 2 e 5 anos de idade com alterações sutis, como dificuldades de subir escadas e marcha peculiar. Em seguida, ocorre extensa degeneração muscular, resultando na perda progressiva de função motora. Durante a adolescência aumentam-se complicações cardíacas e respiratórias e normalmente aos 12 anos o uso da cadeira de rodas é necessário por decréscimo na ambulação. Alterações ortopédicas, cognitivas e digestivas também são relatadas. Algumas intervenções cardiorrespiratórias se propõem a aumentar a estimativa de vida dos pacientes (LIANG e colab., 2018).

Alguns sinais contribuem para a suspeita clínica da DMD como atraso psicomotor, fraqueza muscular, pseudo-hipertrofia das panturrilhas, aumento das dosagens séricas de transaminases ou creatinoquinase. O primeiro exame é determinação da creatinoquinase (CK) no soro que é um dos indicadores de dano sistêmico. Uma vez apresentando valores altos, são requisitados os testes confirmatórios a fim de detectar a mutação genética ou a ausência da distrofina pela biópsia do músculo (ARAUJO e colab., 2017).

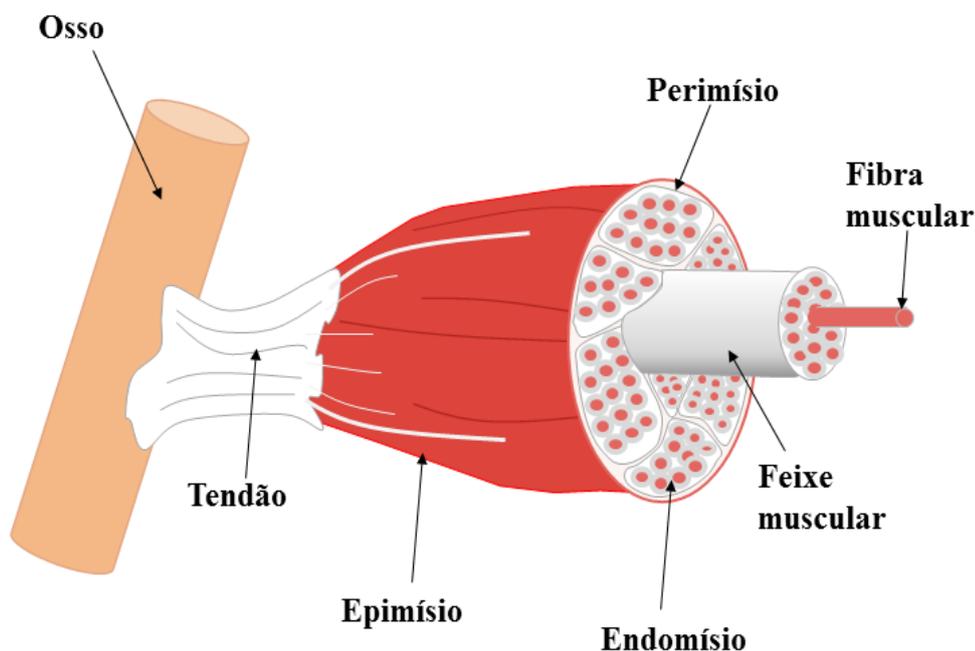
Ainda não há cura para a doença, porém o tratamento farmacológico utilizando corticosteroides pode atrasar o curso da doença. A fisioterapia motora e pulmonar também contribui para a melhora do quadro do paciente. Para isso, um diagnóstico eficaz e antecipado é necessário. No Brasil, o período entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico final é longo em comparação a outros países, comprometendo o planejamento familiar e o prognóstico dos pacientes (PRUFER DE QUEIROZ e colab., 2004).

## 1.1 Tecido muscular

De forma vital, os organismos vertebrados dependem da contração voluntária e imediata da musculatura esquelética. Em movimentos de caráter involuntários, tais como o batimento cardíaco e o peristaltismo do intestino são requisitados a musculatura cardíaca e a musculatura lisa, respectivamente (ALBERTS e colab., 2008)

A estrutura muscular apresenta uma projeção dos tendões que se estende por sua estrutura que é chamada de epimísio. Essa bainha abrange todo o corpo do músculo, o subdividindo em fascículos ou feixes envolvidos por sua própria camada de tecido conjuntivo, denominada como perimísio. Cada fascículo é um conjunto de fibras musculares (células) que são circundadas por uma camada, o endomísio, e a membrana celular das fibras é chamada de sarcolema (RAHIMOV e KUNKEL, 2013) (Figura 1.1).

O músculo esquelético é composto por muitas fibras (células musculares) que variam de diâmetro: de 10 a 80  $\mu\text{m}$ . Essas fibras são constituídas por filamentos chamados de miofibrilas em seu citoplasma (sarcoplasma), aproximadamente, 1500 filamentos de miosina e 3000 filamentos de actina. Ambos os filamentos são grandes moléculas poliméricas e ao interagirem proporcionam a contração muscular (HALL e GUYTON, 2011).



**Figura 1.1 Estrutura do músculo estriado esquelético.** O tendão se projeta sobre músculo formando o epimísio. O perimísio envolve os feixes musculares e o endomísio, as fibras musculares. Autoria própria.

Além dos componentes celulares do tecido muscular, temos a matriz extracelular (MEC), não somente como um suporte físico às células, mas também participando de processos bioquímicos e biomecânicos como morfogênese, diferenciação e homeostase. Os componentes da MEC são divididos em dois grupos, proteínas estruturais fibrosas e proteoglicanos. Nas proteínas fibrosas estruturais temos o colágeno, fibronectina e lamininas. Já nos proteoglicanos, estão presentes as decorinas, sindecanos e glicosaminoglicanos (FRANTZ e colab., 2010).

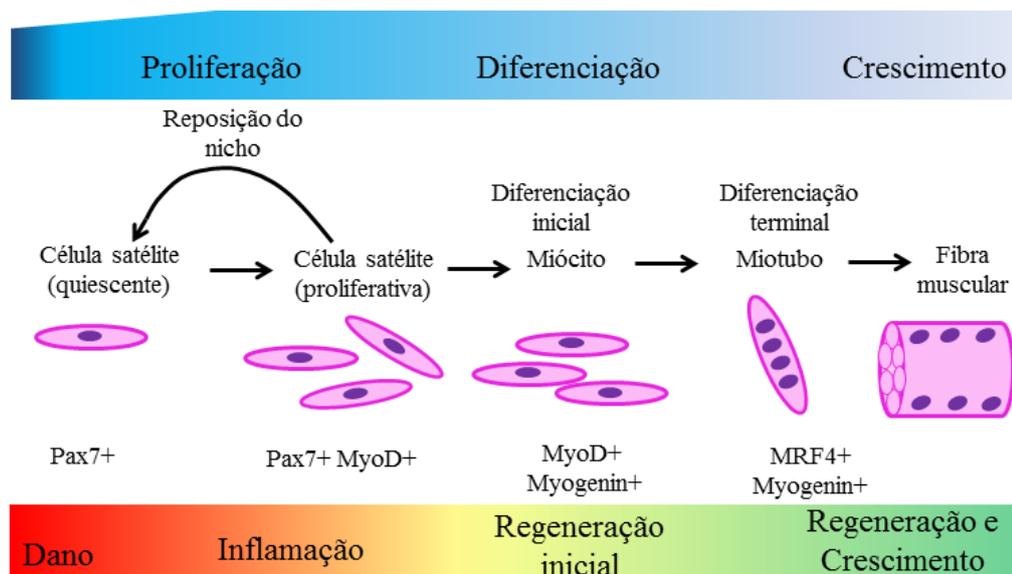
Os componentes da MEC são sítio-específicos e possuem grande variabilidade entre tecidos. Mesmo com grande contribuição da parte contrátil para a funcionalidade do músculo, devemos considerar os integrantes não contráteis, como vasos sanguíneos, nervos e tecido conectivo. A MEC interfere na função fisiológica do músculo, na sua capacidade adaptativa ao dano e na manutenção da regeneração muscular (GILLIES e LIEBER, 2012).

O músculo é um tecido bastante plástico e adaptável, e durante danos fisiológicos e patológicos do músculo o remodelamento da MEC é presente, no qual há um balanço entre a síntese de componentes e sua degradação. As metalopeptidases de matriz (MMP) participam da clivagem, sendo que as mais secretadas no microambiente muscular são a MMP-2 e a MMP-9. A fim de inibir a atividade dessas enzimas, os inibidores teciduais de metalopeptidases de matriz (TIMPs) são secretados se ligando as MMPs para manter sua forma inativa. Esses conjuntos de fatores contribuem para homeostase muscular (GILLIES e LIEBER, 2012).

As fibras musculares são de caráter pós-mitótico, ou seja, são incapazes de se dividir e gerar outras células similares. Considerando que essas são constantemente danificadas, há a necessidade de regeneração. A principal célula progenitora adulta responsável por esse evento é a célula satélite. Essa célula miogênica é mononucleada, descrita inicialmente por Mauro (1961), e é localizada anatomicamente entre a lâmina basal e o sarcolema. Em um ambiente muscular livre de injúria, essas células se encontram em estado de quiescência (repouso). O fator de transcrição predominante nessa fase é o *paired box-7* (Pax-7). Em cada fase temos diferentes fatores, modulando geneticamente o fenótipo celular (TEDESCO e colab., 2010). As células satélites sendo ativadas expressam além do Pax7, o MyoD e o Myf5 que não são observados no estado de quiescência. Se essas continuarem a diferenciação há um aumento de miogenina e posteriormente MRF4 diminuindo o Pax7. Todas essas alterações são intrínsecas da célula muscular, porém fatores extrínsecos durante o processo de regeneração como células inflamatórias, hormônios e influências do tecido nervoso podem contribuir no ambiente regenerativo (Figura 1.2) (KARALAKI e colab., 2009; TIDBALL e colab., 2014).

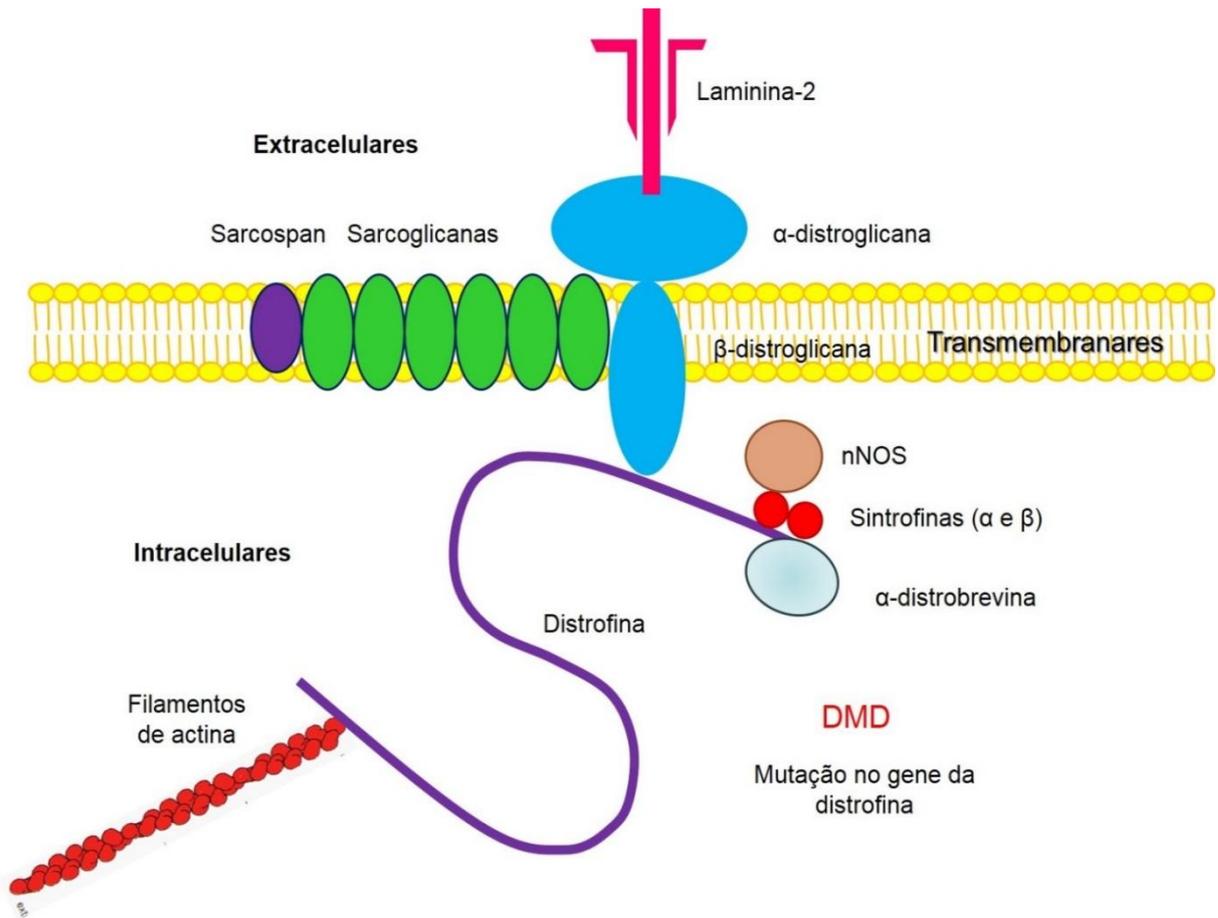
Em caso de dano muscular por trauma, agentes miotóxicos ou doenças como a DMD, as células satélites são ativadas entrando no ciclo celular. Vários componentes podem induzir

a ativação, como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o óxido nítrico (NO). Cada célula-filha pode ter dois destinos, distanciar da proliferação evoluindo para diferenciação terminal ou repor a população de células satélites para situações de regeneração futuras. Ao diferenciar, essas alcançam o fenótipo de miócitos fusionado entre si para formar miotubos multinucleados que no final resultam em fibras musculares (TEDESCO e colab., 2010; TIDBALL e colab., 2014).



**Figura 1.2 Processos celulares envolvendo a miogênese.** Durante estágios iniciais de dano e inflamação, ocorre a ativação das células satélites, que começam a proliferar e expressar fatores de transcrição específicos de músculo, como o MyoD e o Pax-7. Esse último é essencial para diferenciação inicial. Para repor a população de células satélites, após a ativação, algumas células retornam ao fenótipo quiescente com expressão de Pax-7. Em contrapartida, as demais saem do ciclo celular se comprometendo com a diferenciação mais avançada. Os miócitos expressam os genes miogenina e MyoD, que aumentam a fusão celular formando os miotubos, que são sincícios celulares que expressam MRF4 e miogenina. Esses seguem para diferenciação terminal formando fibras musculares. Adaptado de (TIDBALL e colab., 2014).

A distrofina é uma proteína intracelular em forma de cauda e com papel essencial ao músculo. Juntamente com ela, as proteínas associadas à distrofina formam o complexo distroglicano. Esse conjunto não só mantém a integridade celular, mas também auxilia na resposta ao estresse. Ele é composto por proteínas intracelulares, transmembranares e extracelulares (Figura 1.3) (KHURANA e DAVIES, 2003) (DURBEEJ e CAMPBELL, 2002) (BLAKE e colab., 2002) (KLINGLER e colab., 2012).



**Figura 1.3 Esquema ilustrativo do complexo distroglicano.** Na parte interna do sarcolema é encontrada a enzima óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS), as sintrofinas ( $\alpha 1$  e  $\beta 1$ ), a  $\alpha$ -distrobrevina e a distrofina. As proteínas transmembranares são as sarcoglicanas, a  $\beta$ -distroglicana e o sarcospan. Os componentes extracelulares são a  $\alpha$ -distroglicana e a laminina-2. Adaptado de (FAIRCLOUGH e colab., 2013).

## 1.2 Fisiopatologia da DMD

Com a ausência da proteína distrofina, o complexo de proteínas associadas a ela é perdido, fomentando ainda mais as alterações fisiológicas, bioquímicas e imunológicas no tecido muscular. Em estágios iniciais da doença, as biópsias apresentam grande degeneração com a presença massiva de células inflamatórias, no entanto, mesmo nesse contexto de dano, a regeneração é presente, recuperando parcialmente as fibras perdidas. Já nos períodos mais avançados, a capacidade regenerativa reduz e ocorre depósito de tecido conectivo caracterizando a fibrose. Em vista disso, o cerne da fisiopatologia da DMD está no desequilíbrio entre a necrose e a regeneração dos mioblastos (Figura 1.4)(DECONINCK e DAN, 2007).

De forma integrada, a fisiopatologia da DMD é dividida em anormalidades celulares e teciduais. A nível celular, temos, fragilidade da membrana, proteólise excessiva, homeostase de cálcio comprometida, estresse oxidativo e morte celular. Em relação ao tecido, temos, regeneração muscular afetada, problemas vasculares, inflamação e fibrose (BLAKE e colab., 2002).

A distrofina proporciona a ligação entre componentes contráteis no interior da célula com a MEC estabilizando o sarcolema. Em sua ausência, a contração fica excêntrica aumentando a suscetibilidade de dano ao sarcolema, como dito anteriormente. Nesse caso, ocorre a entrada de proteínas séricas (albumina e imunoglobulinas, por exemplo) e saída de enzimas intracelulares obrigatórias a níveis séricos, como a CK. Esses achados patológicos são comuns na doença (DUNCAN, 1989; RAHIMOV e KUNKEL, 2013; STRAUB e colab., 1997).

O músculo distrófico, comparado ao normal, apresenta maior depósito de cálcio, o que indica um comprometimento da homeostase de cálcio. Há duas hipóteses sobre o aumento de influxo de cálcio no músculo: a primeira aponta para o rompimento da membrana como porta de entrada desse íon e a segunda retrata que a ausência da distrofina compromete os canais de cálcio facilitando o vazamento.

Com maior influxo de cálcio, proteases aumentam suas atividades. Isso ocorre, porque algumas dessas são dependentes de cálcio. As calpaínas são as mais comuns, degradando componentes celulares que fomentam a patogênese. As MMPs têm maior expressão em pacientes DMD e camundongos mdx, sendo que a MMP-2 é predominante em estágios mais tardios de regeneração e a MMP-9 em momentos de extenso dano e inflamação. No ambiente hostil do músculo, o citoesqueleto, a membrana e os componentes da MEC são degradados pela proteólise excessiva que é um evento patológico característico da DMD (BANI e LAGROTA-CANDIDO, 2008; BRIGUET e colab., 2015; CHEN, Xiaoping e LI, 2009).

A distrofina participa de processos de sinalizações celulares de extrema importância. Na sua ausência, o complexo distroglicano se desfaz, impossibilitando o acoplamento da nNOS. Uma vez dispersa no citoplasma, essa enzima diminui sua atividade, comprometendo o óxido nítrico (NO) disponível. O NO é essencial para vasodilatação da microcirculação do músculo durante a contração. Sendo assim, a vasoconstrição predomina resultando em lesões por hipóxia ou estresse metabólico (ENNEN e colab., 2013).

O estresse oxidativo em músculos distróficos é muito relevante e esse evento é apontado como causa primária da degeneração muscular. O influxo exacerbado de cálcio nas mitocôndrias contribui para formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), e esses provocam peroxidação lipídica antes mesmo do aparecimento de necrose no tecido. O fator de nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é estimulado pela presença de altos níveis de ROS. Essa via quando

ativada favorece o aumento de citocinas pró-inflamatórias aumentando ainda mais o ROS e o recrutamento de células inflamatórias. Além disso células inflamatórias infiltradas são capazes de produzir ROS no tecido, porém há uma deficiência de NO para sequestra-los devido à baixa atividade da nNOS (WHITEHEAD e colab., 2006).

Sabe-se que durante o desenvolvimento da doença ocorrem ciclos de dano e regeneração. Esse processo ativa as células satélites estimulando-as a se dividirem dando origem aos mioblastos que irão se fundir e reparar sítios necróticos das fibras distróficas. Os músculos de pacientes DMD, em estágios iniciais da doença, apresentam um terço das fibras com expressão de cadeia pesada de miosina embrionária (eMyHC) que é um marcador de fibras recém-regeneradas no tecido. Ou seja, os mecanismos regenerativos são muito requisitados em estágios iniciais (DECARY e colab., 2000).

As células satélites de pacientes DMD comparadas com as de pacientes saudáveis possuem um encurtamento do telômero, devido à grande demanda no músculo distrófico. Os telômeros são regiões no final do cromossomo e seu tamanho pode ser mensurado e inferido como um "histórico replicativo" da célula avaliada. O comprometimento progressivo da regeneração é explicado pela exaustão dessas células (DECARY e colab., 2000). Através do cultivo das células isoladas de pacientes DMD jovens foi possível avaliar a funcionalidade dessas. Comparando com células de indivíduos normais, as células satélites de distróficos apresentam uma capacidade proliferativa muito inferior. A desmina é um marcador específico para citoesqueleto de células musculares e indica miogenicidade de células isoladas. Os mioblastos oriundos de pacientes DMD apresentaram miogenicidade baixa e até mesmo nula (RENAULT e colab., 2000).

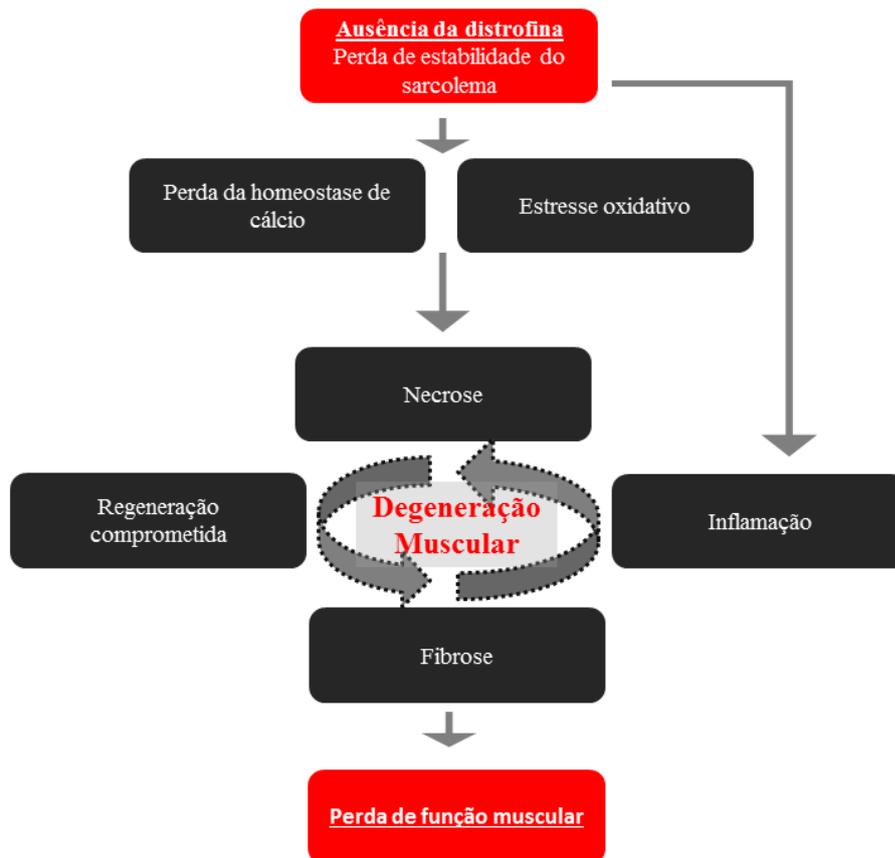
Em virtude do sarcolema lesionado, componentes intracelulares são externalizados sinalizando ao sistema imune sinal de perigo. Os padrões associados à dano (DAMPs) que são reconhecidos por receptores de padrões moleculares (PPR), sendo que no músculo distrófico os receptores do tipo *toll* (TLRs) são os mais requisitados. Esses receptores ativados, juntamente com outros eventos da patogênese, o aumento de ROS e o influxo exacerbado de cálcio intracelular, induzem a ativação de NF- $\kappa$ B que participa de forma central na inflamação da DMD. Esse fator de transcrição inibe genes anti-inflamatórios e ativa genes inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, atraindo células inflamatórias para o músculo distrófico (MIYATAKE e colab., 2016).

Do repertório de células infiltradas no músculo, os tipos celulares encontrados são majoritariamente macrófagos e poucos linfócitos T. Macrófagos do tipo M1 são de caráter pró-inflamatório e estão presentes nas fases iniciais da doença, promovendo digestão de restos celulares e degeneração muscular, secretando interferon do tipo gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de ne-

crose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Já os macrófagos M2 são de perfil anti-inflamatório, participam da resolução da inflamação em fases mais avançadas e são capazes de inibir a citotoxicidade mediada pelos macrófagos M1, produzindo interleucina do tipo 10 (IL-10) e fator de crescimento tecidual do tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (CASCABULHO e colab., 2012; VILLALTA e colab., 2009).

Tipos celulares menos abundantes podem ter fortes efeitos na patogênese. As células T reguladoras (Tregs) foram apontadas como moduladoras na resposta e na polarização de macrófagos. A depleção das Tregs compromete a secreção de IL-10, aumentando a presença de macrófagos M1 que agravam a doença. O linfócito T gama delta, uma subpopulação de linfócitos capazes de reconhecer antígenos diretamente, quando presentes no infiltrado inflamatório no coração de camundongos mdx, têm um papel imunomodulador, diminuindo o infiltrado de macrófagos (CASCABULHO e colab., 2016; VILLALTA e colab., 2015).

Por fim, em estágios mais avançados, a regeneração reduz, restando o mecanismo de reparo, a fibrose. Essa se caracteriza pelo depósito de componentes da MEC de forma desregulada comprometendo a função do órgão. Além da disfunção muscular, esse evento patológico contribui para diminuição de ação de alguns agentes terapêuticos. Na DMD, o TGF- $\beta$  é o fator pró-fibrogênico mais importante, induzindo à secreção de colágeno por fibroblastos. Os macrófagos M2 foram apontados como fonte de TGF- $\beta$  e conseqüentemente responsáveis pela fibrose muscular. O TGF- $\beta$  também inibe a degradação da MEC, comprometendo a atividade das MMPs (KHARRAZ e colab., 2014).



**Figura 1.4 Patogênese da DMD.** Com a ausência da distrofina, o complexo distroglicano fica comprometido aumentando a suscetibilidade de lesão no sarcolema induzida pela contração muscular. Com isso, ocorre um aumento no influxo de cálcio ativando as proteases dependentes de cálcio. Há um aumento de espécies reativas de oxigênio pela baixa atividade da nNOS e o tecido muscular se degenera em constantes ciclos de necrose, inflamação e regeneração. Ocorre depósito de tecido conectivo, fibrose, devido à capacidade regenerativa reduzida do músculo distrófico. Por último, há perda de funcionalidade muscular. Adaptado de (GUIRAUD e DAVIES, 2017).

### 1.3 Estratégias terapêuticas para DMD

Ainda não há cura para DMD e nem tratamento eficaz disponível. As estratégias terapêuticas são divididas em terapias gênicas, transplante celular e intervenções farmacológicas. Vale lembrar que as duas primeiras ainda são inacessíveis, dispendiosas ou estão em estudos pré-clínicos. Em relação aos fármacos disponíveis, há os glicocorticoides, que possuem efeitos anti-inflamatório, anabolizante e estabilizador da homeostase do cálcio (KHURANA e DAVIES, 2003).

A fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes e de aprimorar o entendimento sobre a doença, muitos ensaios clínicos são realizados. A maioria desses está em fases iniciais e de recrutamento, restando poucos em fases mais avançadas e conclusivas. As propostas principais dessas intervenções são restaurar a expressão proteica da distrofina; estabilizar o sarcolema e/ou com aumento de proteínas de adesão que compensam a proteína ausente; diminuir a inflamação e/ou aumentar a regeneração muscular (MAH, 2016).

Para o estudo da doença e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, o camundongo mdx vem sendo amplamente utilizado. Esse camundongo é resultante de uma mutação espontânea numa colônia de camundongos C57BL/10 que apresentou níveis de CK séricos elevados apontando uma possível manifestação similar à DMD humana. O gene da distrofina nesses camundongos possui um ponto de parada prematura no éxon 23 resultando no comprometimento da expressão proteica. As manifestações da doença são relevantes e queda da sobrevivência é de 20%. Apesar de sua similaridade, seu fenótipo é mais brando em relação à doença humana. Para a avaliação de novas estratégias terapêuticas preventivas são necessárias técnicas que exacerbam o fenótipo, como exercícios e miotoxinas (BULFIELD e colab., 1984; KORNEGAY e colab., 2014).

### **1.3.1 Terapias Gênicas**

Há duas formas de induzir a expressão da distrofina, a edição gênica e a entrega do gene. O intuito das terapias gênicas é desenvolver um gene, inseri-lo em células de interesse e integrá-lo ao genoma do hospedeiro. Uma grande dificuldade da entrega do gene da distrofina, é o seu tamanho. O adenovírus é comumente utilizado como um vetor, infectando as células do paciente para disponibilizar o gene da distrofina. Para utilizar esse vetor, é necessário reduzir o gene da distrofina deixando-o menor com partes essenciais apenas (microdistrofina) ou fracionar regiões e administrar separadamente. Em modelos animais, essa terapia mostrou uma melhora na força muscular, porém em pacientes a expressão da microdistrofina é baixa (CRISPI e MATSAKAS, 2018; FAIRCLOUGH e colab., 2013).

Para expressão de um gene, uma fita molde de RNA<sub>m</sub> é formada e partir dela os ribossomos sintetizam a proteína de interesse. Alguns pacientes possuem um ponto de parada prematura no meio do gene, impossibilitando a expressão correta da distrofina. O Atularen é um aminoglicosídeo, seu mecanismo é permitir a leitura em pontos de parada possibilitando a expressão de uma distrofina funcional. Apesar de promissor, ensaios com este composto em humanos mostram baixa eficácia (FAIRCLOUGH e colab., 2013).

Antes da formação do mRNA, o pré-mRNA é formado com íntrons e éxons. No processamento, os íntrons são retirados e os éxons são unidos. Pacientes com deleções no gene da

distrofina podem perder regiões referentes a éxons importantes na leitura da tradução da proteína. Por exemplo, alguns pacientes não possuem a região do éxon 50 e os éxons 49 e 51 não formam quadro de leitura. Os oligonucleotídeos antisense (AONs) possibilitam a retirada de éxon indesejados durante o *splicing* possibilitando a leitura. O *morpholino phosphorodiamidate oligonucleotide* (PMO), um AON, foi capaz de recuperar a expressão da distrofina em pacientes (CRISPI e MATSAKAS, 2018).

Mesmo sendo muito promissoras, alguns fatores negativos estão presentes nessas terapias. O alto custo, a baixa disponibilidade, o espectro de atuação reduzido (algumas mutações não são atendidas) e toxicidade. Porém, a resposta imune do hospedeiro contra os vetores e a proteína que passaria a ser expressa estão sendo discutidos em terapias gênicas, pois os pacientes apresentam resposta contra o vírus adenoassociado, diminuindo a eficácia. Esses também possuem fibras revertentes para a expressão da distrofina sendo expostos a esse antígeno. Considerando esses efeitos indesejados, algumas tentativas de imunossupressão para diminuir a resposta mediada por células T e anticorpos já foram realizados (SETO e colab., 2014).

### **1.3.2 Terapia celular**

As células-tronco têm a capacidade de se multiplicar mantendo o fenótipo indiferenciado e de se diferenciar em diversas linhagens celulares. A medicina regenerativa consiste na utilização desse tipo celular como tratamento. Essa proporcionou possibilidades de tratamento para doença de Alzheimer, infarto no miocárdio e esclerose amiotrófica lateral. Essa estratégia terapêutica é uma das mais promissoras para tratamento da DMD e pode ser feita de duas formas diferentes: as próprias células do paciente editadas geneticamente a fim de repôr a expressão da distrofina ou o transplante alógeno com células de um doador saudável (SIENKIEWICZ e colab., 2015).

De forma geral, existem dois tipos de células tronco: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas, e vários tipos podem ser miogênicos sendo eleitos para terapias. O uso autólogo de células-tronco hematopoiéticas adultas da medula óssea já foi realizado em ensaios clínicos, aumentando a força muscular e qualidade de vida dos pacientes. Outro método estudado é o uso de células-tronco pluripotentes induzidas. Essa célula é reprogramada a partir de um fibroblasto da pele tornando-se indiferenciada. Assim, é possível forçar a expressão de fatores de transcrição miogênicos (Pax-7 ou MYOD) diferenciando-a em fibras musculares (LEE, 2007; MIYAGOE-SUZUKI e TAKEDA, 2017; SHARMA e colab., 2013).

As células satélites, em situação de dano muscular, têm a capacidade de dar origem a mioblastos que se fusionam regenerando o músculo. Devido a essa peculiaridade, o transplante desse tipo celular foi apontado como uma intervenção terapêutica para a DMD. Utilizando

camundongos mdx, Partridge e colaboradores (1989) realizaram um transplante de mioblastos que formaram fibras quiméricas, ou seja, sincícios celulares com núcleos de células do receptor e do doador, possibilitando a expressão da distrofina.

Os experimentos com modelos animais mostrando benefícios fomentaram os testes clínicos em pacientes distróficos. Os estudos iniciais apresentaram grande rejeição e pouca eficácia, considerando que os mioblastos eram oriundos de um doador saudável, mas com histocompatibilidade variável. Até mesmo quando a compatibilidade era alta, era observada a presença de anticorpos anti-distrofina no soro dos recipientes e alta rejeição imunológica. Depois disso, pensou-se em uma proposta de transplante autólogo, no qual as células seriam extraídas do paciente, tratadas geneticamente, expandidas e reimplantadas. Vale lembrar que mioblastos coletados de músculos normais ou distróficos, têm a capacidade proliferativa baixa e uma alta tendência à senescência, dificultando a terapia (PARTRIDGE, Terry, 2002). Essa terapia celular possui características contraproducentes, pois nas primeiras horas do transplante a maioria dos mioblastos morre com grande rejeição imunológica e há necessidade de várias inserções para administrar o transplante. Apesar dessas características, não houve relatos de grandes efeitos adversos ou do aparecimento de tumor proveniente das células transplantadas (PARTRIDGE, Terry, 2002; SETO e colab., 2014).

Em suma, uma terapia celular ideal visa ser tolerada pelo sistema imune e ter alta capacidade proliferativa *in vitro* para alcançar um número de células suficiente. Além disso, as células transplantadas devem se diferenciar, recuperando o tecido muscular e repondo o nicho com células satélites positivas para distrofina (SIENKIEWICZ e colab., 2015).

### **1.3.3 Terapias farmacológicas**

Diferentemente das outras abordagens terapêuticas, as intervenções farmacológicas não têm como objetivo devolver a expressão da proteína ausente. Utilizando moléculas ou fármacos, essa visa diminuir a inflamação do músculo, aumentar a regeneração, equilibrar a homeostase de cálcio e aumentar a expressão de proteínas de adesão compensatória. (KHURANA e DAVIES, 2003).

O uso de corticoides como intervenção farmacológica foi proposto há mais de 50 anos. Devido aos seus diversos benefícios, esse tratamento é utilizado mundialmente como o tratamento padrão para a doença. Inicialmente, a proposta era diminuir o infiltrado inflamatório, porém, esse apresenta efeitos pleiotrópicos como, anabolizante, modulador da utrofina, regulador da disfunção de cálcio e pró-miogênico (KHURANA e DAVIES, 2003).

Os dois medicamentos mais utilizados são a prednisona e o deflazacorte, nas doses diárias iniciais de 0,75mg/Kg e 0,9mg/Kg, respectivamente. Ambos não competem em efeti-

vidade, porém, o deflazacorte é utilizado em pacientes com tendência ao ganho de peso. Prednisona, além de ser mais barata, é oferecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Com a finalidade de reduzir os efeitos colaterais e melhorar adesão ao tratamento diário, são feitos diferentes regimes de administração, podendo ser em dias alternados, intermitentes (10 dias com e 10 dias sem) ou doses altas no final de semana (5mg/kg) (ARAÚJO e colab., 2017; BUSHBY e colab., 2010).

O início ideal do uso de corticoides é entre 2 a 5 anos de idade durante a fase de platô, no qual o paciente ainda não apresenta declínio de funções musculares. O término do tratamento pode variar de acordo com os efeitos colaterais. Vale lembrar que mesmo em fases tardias com perda de ambulação do paciente, corticoides ainda são indicados, pois o tratamento melhora condições cardiorrespiratórias e preserva função dos membros superiores. Além disso, a dose mínima efetiva, 0,3mg/kg por dia, pode ser recorrida diminuindo consideravelmente os efeitos (ARAÚJO e colab., 2017).

Mesmo com boa eficácia que mostra mudança no curso da doença, devem-se considerar os efeitos colaterais desse medicamento. Em uso contínuo pode induzir alterações comportamentais, perda de densidade óssea, ganho de peso e aparecimento de cataratas. Outros eventos mais raros podem ocorrer, como fragilidade na pele, tolerância à glicose comprometida, suscetibilidade a infecções, hipertensão e disfunção da adrenal (ANGELINI e PETERLE, 2012). Portanto, há necessidade de busca de novos compostos com baixa toxicidade, baixo custo e boa eficácia. O reposicionamento de fármacos também é uma alternativa viável para novas estratégias.

É evidente a participação da desregulação do cálcio na patogênese da DMD. Os músculos distróficos possuem um maior influxo de cálcio aumentando a proteólise e a necrose muscular. Ainda em teste experimental, o peptídeo AT-300, que bloqueia canais de cálcio, mostrou um moderado efeito terapêutico em camundongos mdx. Como um estabilizador de canais intracelulares, o fármaco de baixo peso molecular ARM210/S48168, mostrou melhora na função muscular (BLAT e BLAT, 2015; GUIRAUD e DAVIES, 2017).

No caso do controle da fibrose, os inibidores da enzima conversora de angiotensina inibem indiretamente o TGF- $\beta$  diminuindo a fibrose tecidual. Além do seu efeito antifibrótico, é observada uma melhora cardiovascular do paciente acometido. Em camundongos mdx, o uso de anticorpos neutralizantes para TGF- $\beta$  também possui efeito terapêutico relevante (BLAT e BLAT, 2015; KORNEGAY e colab., 2014; MAH, 2016).

A inibição da miostatina tem sido uma intervenção muito requisitada, na tentativa de aumentar a massa muscular, uma vez que essa miocina regula negativamente o crescimento muscular. Foi testada a imunoterapia utilizando imunoglobulinas que neutralizam a molécula,

e apesar de não mostrar grandes resultados, essa intervenção ainda é promissora. Em contrapartida, o IGF-1, um importante estimulador de progenitores miogênicos, mostrou influência na hipertrofia e na diminuição da fibrose. Ela regula positivamente a proliferação e diferenciação de células miogênicas. O teste em pacientes ainda está em curso (BLAT e BLAT, 2015; GUIRAUD e DAVIES, 2017; MIYATAKE e colab., 2016). Diversas outras propostas terapêuticas de apoio têm sido estudadas, incluindo alternativas baseadas em componentes da MEC (THOMAS e colab., 2015).

#### **1.4 Lamininas e o controle da DMD**

Inicialmente, uma proteína não colágena da MEC foi descoberta em dois sistemas distintos, na membrana basal do sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) em modelo murino e em cultivo celular isolado de um carcinoma. A partir disso, foi possível caracterizar a estrutura e a bioquímica desta, nomeando-a de laminina. Por microscopia eletrônica, essa possuía um formato de cruz assimétrica com porções globulares em suas extremidades (ENGEL e colab., 1981; TIMPL e colab., 1979).

Assim como a laminina do sarcoma EHS, outras moléculas similares, porém não idênticas foram descobertas gradativamente em outros tecidos e células, obtendo novas isoformas. Posteriormente, todos esses achados foram categorizados como membros da família laminina. Essas foram denominadas como glicoproteínas de alto peso molecular compostas por três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto. No genoma humano temos descritas 11 cadeias geneticamente diferentes, resultando em uma vasta variedade de isoformas de lamininas. Para a identificação, cada cadeia  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  é seguida de um número arábico de acordo com a identificação cronológica (AUMAILLEY, 2013).

As lamininas são os principais componentes da membrana basal, onde interagem com outros componentes da MEC. Para alcançar seus efeitos biológicos, essas se ligam às integri- nas, ao complexo distroglicano e aos sindecanos, estimulando vias de sinalização intracelulares. Elas estão envolvidas em processos celulares, como, adesão, diferenciação, resistência à morte, manutenção do fenótipo e migração (DOMOGATSKAYA e colab., 2012).

Atualmente, temos 18 isoformas de lamininas descritas com distribuição e expressão tecidual variadas em diferentes organismos. Essa peculiaridade é regulada e variada majoritariamente pela cadeia  $\alpha$  das isoformas. A laminina-111 ( $\alpha1$ ,  $\beta1$ ,  $\gamma1$ ) (LAM-111) foi a mais descrita e possui grande participação na membrana basal durante a embriogênese, e na fase adulta essa diminui. A presença da cadeia  $\alpha2$  é abundante no sistema neuromuscular adulto e em alguns tecidos. Já a  $\alpha3$  é mais encontrada na epiderme e a  $\alpha4$  no endotélio (DURBEEJ, 2010).

### **1.4.1 Laminina-111**

A LAM-111 é de grande importância no desenvolvimento embrionário e possui diversas funções. Recentemente, foi esclarecida a atuação da LAM-111 no nicho de células satélites durante a regeneração muscular. Para a manutenção do fenótipo dessa célula, é necessário um microambiente onde os fatores extrínsecos são controlados. Ao serem ativadas durante o dano muscular, a lâmina basal é degradada por MMPs, em seguida ocorre o depósito da subunidade  $\alpha 1$  no nicho. Essa isoforma auxiliaria a célula em sua proliferação e reposição da população para outra situação de injúria. O modelo murino deficiente para cadeia  $\alpha 1$  tem sua regeneração muscular comprometida, mostrando assim, a importância da LAM-111 nesse evento tecidual (RAYAGIRI e colab., 2018).

Tratando-se da DMD, a LAM-111 foi proposta como terapia em modelos experimentais. Em camundongos deficientes para distrofina, com tratamento intramuscular ou sistêmico, essa isoforma melhora na estabilidade do sarcolema e diminui o infiltrado inflamatório. Sua ação terapêutica seria resultante do aumento de proteínas de adesão compensatórias, a integrina  $\alpha 7\beta 1$  e a utrofina (ROONEY e GURPUR e BURKIN, 2009).

Em caso de perda muscular por acidente ou cirurgia é indicado um transplante autólogo que consiste na retirada de uma porção de um músculo não afetado e inserção no músculo comprometido. Essa estratégia visa repor a massa muscular perdida e evitar a fibrose tecidual que resulta em disfunção. Para melhorar a eficácia do procedimento foi utilizado um biomaterial feito de ácido hialurônico que diminui o persistente infiltrado inflamatório e aumenta a regeneração proporcionando uma reposição da força muscular. Apesar dessas propriedades positivas, esse não interage fortemente com as células, não interferindo na adesão, migração e proliferação. Para isso a LAM-111 foi utilizada para enriquecer o biomaterial. Comparado com o convencional, o proposto suplementado com LAM-111 melhora consideravelmente essa intervenção (GOLDMAN e colab., 2018).

Essa isoforma também mostrou efeito em transplante de mioblastos. Ao coadministrar a LAM-111 com esses, a eficácia da terapia aumentou. A LAM-111 é capaz de aumentar a migração e a proliferação das células transplantadas, aumentando a força muscular e o número de fibras positivas para distrofina no indivíduo receptor. Em suma, a LAM-111 pode ser apontada como terapia farmacológica promissora e também pode melhorar a terapia celular proposta para DMD (GOUDENEUGE e colab., 2010).

### **1.4.2 Fragmentos crípticos ou matricinas**

Componentes da MEC como fibronectina, colágeno e lamininas podem ser fragmentados liberando peptídeos com funções biológicas distintas da molécula íntegra. Esses são chamados de fragmentos crípticos ou matricinas e estão envolvidos na resposta imune, angiogênese, cicatrização tecidual, proliferação, migração celular e outros processos. Portanto, a MEC não se restringe ao suporte em tecidos e alterações na MEC e seus integrantes possuem papéis essenciais na regulação celular (DEARDON e colab., 2010; HOREJS e colab., 2014).

O termo "críptico" é oriundo do latim da palavra *crypticus* e significa oculto, mascarado ou escondido. Referindo-se aos fragmentos crípticos, esses não estariam expostos na estrutura terciária das macromoléculas da MEC, ocultando suas respostas biológicas. Uma degradação enzimática pode contribuir para a exposição, e as metalopeptidases são apontadas como as principais enzimas responsáveis nesse contexto. Além disso, componentes da MEC podem se ligar em receptores celulares e a outros integrantes da MEC mudando sua conformação, essa alteração pode expor os sítios ocultos (SCHENK e QUARANTA, 2003).

Diversos peptídeos biologicamente ativos foram descobertos através de técnicas como clivagem proteolítica, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos. Essa última abordagem permite a produção de fragmentos sintéticos da LAM-111 através da sequência descrita. Todos são produzidos e purificados com aproximadamente 12 aminoácidos e com um lastro de 4 aminoácidos do peptídeo vizinho. Não se consegue produzir moléculas de grande peso e glicosiladas, apesar disso, esse é o melhor método de obtenção. A partir da LAM-111 foram desenvolvidos mais de 600 peptídeos e alguns desses se destacam em funções biológicas (KIKKAWA e colab., 2013)(Figura 1.5).

O peptídeo SIKVAV é localizado na cadeia  $\alpha$  da LAM-111, suas funções inicialmente descritas são a promoção da migração, adesão celular e crescimento neuronal. Também tem papel na cicatrização tecidual, um processo biológico que envolve inflamação, angiogênese e remodelamento do tecido. O SIKVAV aumentou a cicatrização em conjunto com hidrogel de quitosano, um biomaterial feito com exoesqueleto de crustáceos. A ação do SIKVAV ocorre por aumentar a migração e proliferação de fibroblastos para o sítio da lesão, além de promover a secreção de TGF- $\beta$  e a formação de novos vasos (CHEN, Xionglin e colab., 2017).

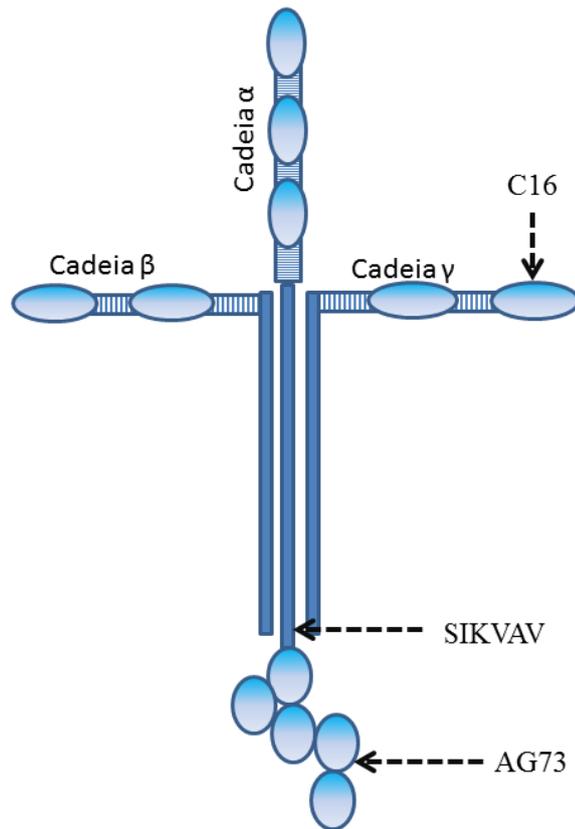
Em células de carcinoma, a capacidade de secretar MMPs está relacionada com a malignidade e capacidade de invasão dessas células, visto que o afrouxamento da MEC contribui para o descolamento dessas células do seu sítio primário. O SIKVAV mostrou ser capaz de induzir o aumento de secreção de MMPs em células de carcinoma adenoide cístico, interagindo com integrinas  $\alpha 3\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 1$  e estimulando a via de sinalização ERK 1/2 (FREITAS e colab., 2007).

No caso de câncer de cólon, o fígado é o sítio metastático mais comum. Ao coadministrar as células tumorais com o peptídeo SIKVAV, houve um aumento da dispersão e na massa do tumor. Esse evento biológico é também observado em células de melanoma, com aumento do tamanho do tumor. Isso é explicado pelo estímulo do peptídeo que favorece a angiogênese, fomentando o crescimento (BRESALIER e colab., 1995; GRANT e colab., 1994).

Localizado no braço curto da cadeia  $\gamma$ , o peptídeo C16 possui diversas funções biológicas descritas. Esse peptídeo aumenta o caráter maligno em células tumorais, favorecendo a formações de invadopódeos que são projeções celulares ricas em actina com degradação da MEC de forma pontual. O efeito é devido à interação do peptídeo com integrinas, que é reduzido quando a porção  $\beta 1$  da integrina é neutralizada (SIQUEIRA e colab., 2016). O peptídeo C16 também mostrou aumento de metástase pulmonar em células de melanoma ao ser injeto depois do enxerto intravenoso. Isso ocorre, pois, o C16 estimula a migração celular, além de aumentar a secreção de MMPs (KURATOMI e colab., 2002). Ele também favorece a migração angiogênica extravascular, um mecanismo pelo qual a célula migra pela parede externa do endotélio invadindo outros sítios (LUGASSY e colab., 2007).

O peptídeo AG73 é localizado na cadeia  $\alpha 1$  da LAM-111. No modelo de carcinoma de células escamosas da pele, ocorre sobreposição de expressão da cadeia  $\alpha 1$  com MMP-9, sugerindo a liberação desse peptídeo no microambiente tumoral. Segundo a literatura, o AG73 é capaz de aumentar a invasibilidade, a migração e a secreção de proteases potencializando o caráter maligno. A interação com receptores de membrana como a integrina  $\beta 1$  e o sidecano-1, é apontada como responsável por esses efeitos biológicos (GAMA-DE-SOUZA e colab., 2008; SIQUEIRA e colab., 2010). O AG73, sendo utilizado como substrato *in vitro*, aumentou projeções em células nervosas. Além disso, esse possui efeito adesivo de mioblastos oriundos de camundongos. Devido à capacidade de adesão desse peptídeo, esse foi utilizado melhorando a especificidade e a eficácia de lipossomos, método de encapsulamento de fármacos em terapias genéticas e intervenções antitumorais. (HOZUMI e colab., 2012; NEGISHI e colab., 2010, 2011).

Sendo assim, esses peptídeos já avaliados em outros sistemas são apontados como poderosas ferramentas no melhoramento do transplante celular, visto que eles poderiam modular eventos celulares em mioblastos. Além disso, esses peptídeos podem ser administrados diretamente no músculo diminuindo a patologia.



**Figura 1.5 Esquema da estrutura da LAM-111 e a localização de seus peptídeos.** As lamininas são uma família de grandes glicoproteínas heterotriméricas compostas por três cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Especificamente a isoforma 111 possui diversos fragmentos com funções biológicas relevantes. No esquema, três peptídeos foram ressaltados, o AG73, o SIKVAV e o C16. O AG73 está localizado no quarto domínio globular cadeia  $\alpha$ , enquanto o SIKVAV está na porção final e o C16 é derivado da cadeia  $\gamma$ . Adaptado de (KIKKAWA e colab., 2013).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar o efeito da LAM-111 e dos peptídeos SIKVAV, C16 e AG73 *in vitro* em mioblastos e avaliar *in vivo* se há um efeito protetor da matricina SIKVAV sobre a degeneração e regeneração muscular em camundongos mdx.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da LAM-111 e seus peptídeos na adesão, migração, diferenciação e proliferação de mioblastos;
- Estudar se os tratamentos com a matricina SIKVAV ou a LAM-111 íntegra são capazes de proteger o músculo da exacerbação do dano induzido pela injeção de cardiotoxina;
- Analisar se há modulação da infiltração inflamatória muscular após os tratamentos, avaliando a extensão da área com infiltração inflamatória e composição de células predominantes no infiltrado;
- Avaliar se há modulação na regeneração de novas fibras musculares após os tratamentos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo celular

A linhagem celular C2C12 (ATCC® CRL1772™), mioblastos isolados de rabidosarcoma de camundongos C3H, foi adquirida do banco de células ATCC (American Type Culture Collection, USA). Essas células, em estado de proliferação, foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco com alta glicose (DMEM, Gibco) contendo 20% de soro fetal bovino (Gibco) e 50µg/mL de gentamicina, denominado meio de proliferação, e mantidas em estufa 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram realizados antes da 15ª geração preservando a capacidade proliferativa e a miogenicidade celular. A passagem das células era realizada antes da monocamada alcançar 50~60% de confluência, aproximadamente 1 a 2 dias após o plaqueamento. As células são então lavadas com solução tampão fosfato modificado por Dulbecco sem cálcio e magnésio (pH:7,2) (Dulbecco's phosphate-buffered saline DPBS- Gibco) e solução de tripsina com EDTA, por aproximadamente 10 minutos. Após perderem a aderência, a enzima é neutralizada com o meio de proliferação e centrifugada a 1000g por 10 minutos a 4°C, essas são suspensas e contadas utilizando câmara de Neubauer. Para induzir a diferenciação, as células foram cultivadas em meio de proliferação até alcançar alta confluência (70% a 80%), em seguida, o meio de diferenciação foi colocado, sendo este meio Dulbecco com alta glicose (DMEM, Gibco) contendo 2% de soro de cavalo (Gibco), 50µg/mL de gentamicina e 2µg/mL de insulina de porco (Sigma). Durante a diferenciação, 75% do meio foi trocado todos os dias, preservando 25% do dia anterior.

#### 3.2 Peptídeos sintéticos

Peptídeos sintéticos de cadeias da LAM-111 com conhecida atividade biológica para ensaios *in vitro* e *in vivo* foram adquiridos comercialmente (QEDBioscience, San Diego, CA, USA). A LAM-111 íntegra comercial foi obtida da linhagem EHS de camundongos (Gibco/Thermo, USA). Todos os fragmentos têm pelo menos 95% de pureza (grau HPLC) e foram diluídos em DPBS (pH:7,2) para serem armazenados à -80°C na concentração de 1mg/mL. Os fragmentos foram:

- i) C16 (sequência KAFDITYVRLKF- derivada da cadeia  $\gamma$ -1 da LAM-111)

ii) SIKVAV (porção carboxi-terminal da cadeia  $\alpha$ -1 da lamina-111)

iii) AG73 (sequência RKRLQVQLSIRT - derivada do domínio globular LG4 da cadeia  $\alpha$ 1 da laminina 111).

### **3.3 Ensaio de adesão**

Os peptídeos e a LAM-111 foram diluídos em DPBS (pH:7,2) na concentração de 10 $\mu$ g/mL. Em uma placa com 96 poços de fundo em "U" (Corning Costar, Nova Iorque, Estados Unidos), 100 $\mu$ L dessas soluções foram incubadas em cada poço e mantidas a 4°C em condições estéreis durante 16 horas. O sobrenadante foi retirado e foi feito um bloqueio com 3% de albumina de soro de bovino (BSA, Sigma) em DPBS a 37°C durante 45 min. O bloqueio foi descartado e os poços lavados com 0,1% de BSA em DPBS. Em seguida, cada poço recebeu 100 $\mu$ L de uma solução contendo 1x10<sup>5</sup> mioblastos C2C12 por mL e a placa foi colocada na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 20 minutos para adesão. As células que não aderiram foram retiradas e os poços foram lavados com 200 $\mu$ L de DPBS. As células aderidas foram fixadas/coradas com 50 $\mu$ L de uma solução de 0,2% (peso/volume) de cristal violeta (ADV-Tayuyna) em 2% (volume/volume) de etanol (Merck) por 10 min. Em seguida, a placa foi colocada em água corrente a fim de retirar o excesso de corante. Posteriormente, a placa foi seca em cima de um papel absorvente e foram colocados 100 $\mu$ L de uma solução a 10% (peso/volume) de SDS para solubilizar o corante. Em seguida foi feita a leitura de absorbância no equipamento GloMax® 96 microplate Luminometer (Promega, Estados Unidos) no comprimento de 600nm. As fotos representativas de cada variável foram feitas na placa utilizando o microscópio invertido (Zeiss, Alemanha) no aumento de 10X antes das células serem solubilizadas.

### **3.4 Ensaio de migração celular**

Para avaliação do efeito dos fragmentos sobre a migração celular foram usadas placas de 24 poços de transmigração (transwell) com tamanho do poro da membrana de 8  $\mu$ m (Corning Costar, Nova Iorque, Estados Unidos). Nesse teste, os poços foram incubados com 1, 50 e 100  $\mu$ g/por poço de peptídeos sintéticos, da LAM-111 íntegra comercial ou BSA ultrapura (pureza acima de 98% por HPLC) (Gibco), diluídos em DMEM alta glicose com 50 $\mu$ g/mL de gentamicina. No controle positivo de migração foi colocado o meio de proliferação descrito

anteriormente contendo soro fetal bovino. Os insertos foram posicionados sobre os poços previamente. Em seguida, as células foram centrifugadas e resuspendidas em meio sem soro na concentração de  $1 \times 10^5$  células por mL. Em cada inserto foi colocado 100 $\mu$ L de solução de células. Após 16 horas de incubação, os insertos foram removidos e lavados gentilmente uma vez com DPBS à 37°C. As células da parte superior da membrana que não migraram foram removidas suavemente com um *swab* e o inserto foi lavado mais uma vez. As células aderidas na parte inferior da membrana (migratórias) foram fixadas/coradas com uma solução de 0,2% (peso/volume) de cristal violeta (ADV-Tayuyna) em 2% (volume/volume) de etanol (Merck) por 10 min. Após isso, os insertos foram lavados com água destilada até ficar límpida. Esses foram posicionados em uma lâmina de microscopia e foram tiradas cinco fotos de cada inserto em um microscópio invertido. A contagem das células foi realizada no Cell Counter (Fiji, Estados Unidos). Realizamos o cálculo proposto pelo fabricante (Corning Costar, Nova Iorque, Estados Unidos): (número total de células/área analisada) x área total do inserto. Com isso, inferimos quantas células migraram e realizamos outro cálculo: (número de células que migraram/número de células colocadas no inserto) x 100= percentual de migração (%).

### 3.5 Índice hipertrófico de miotubos

Os peptídeos e a LAM-111 foram diluídos em solução tampão fosfato modificado por Dulbecco sem cálcio e magnésio (pH:7,2) (Dulbecco's phosphate-buffered saline DPBS- Gibco) na concentração de 100 $\mu$ g/mL. Em uma placa escura com 96 poços de fundo chato translúcido (Greiner, Áustria), 100 $\mu$ L dessas soluções por poço foram incubadas e mantidas a 4°C em condições estéreis durante 16 horas. Cada poço recebeu 100 $\mu$ L de uma solução com  $1 \times 10^5$  mioblastos por mL em meio de proliferação. Ao alcançar 70~80% de confluência foi trocado o meio pelo meio de diferenciação descrito anteriormente. O meio foi trocado em 75% mantendo um resquício do anterior a cada 24 horas. Após 72 horas de diferenciação, as células são lavadas por duas vezes com DPBS (Gibco) à 37°C e fixadas com etanol absoluto (Merck) por 10 minutos. A placa foi seca no ar para evaporar o fixador e lavada três vezes com DPBS. A monocamada foi bloqueada com 4% de BSA (Sigma) em DPBS (Gibco) por 20 minutos. O anticorpo policlonal feito em coelho anti-cadeia pesada de miosina (ab-124205, Abcam) diluído em 1% de BSA (Sigma) em DPBS (Gibco) na concentração de 1,25  $\mu$ g/mL, foi incubado em câmara úmida à 4°C por 16 horas. Depois disso, a placa foi lavada três vezes com DPBS e o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho conjugado à Alexa-488 foi incubado por uma hora em temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada três vezes com DPBS e a sonda DAPI foi adicionada evidenciando os núcleos. Lavou-se com DPBS três vezes man-

tendo nessa solução para visualização no microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha). Depois da aquisição das micrografias, através da ferramenta ImageJ (Fiji, Estados Unidos) foi medido o diâmetro dos miotubos. Cada miotubo foi medido em três locais por sua extensão fazendo uma média de seus diâmetros. Em cada poço foram medidos no mínimo 50 miotubos.

### **3.6 Ensaio de proliferação celular**

A fim de avaliar o efeito da LAM-111 e seus peptídeos na proliferação de mioblastos. Dois métodos distintos foram utilizados: Contagem manual e solubilização de células com cristal violeta.

#### **3.6.1 Contagem manual**

Nesse método, o sistema de câmaras acopladas às lâminas (*Nunc<sup>®</sup> Lab-Tek<sup>®</sup> Chamber Slide System*- Lab-Tek) de 8 poços foi utilizado. Os peptídeos e a LAM-111 foram diluídos em solução tampão fosfato modificado por Dulbecco sem cálcio e magnésio (pH:7,2) (Dulbecco's phosphate-buffered saline DPBS- Gibco) na concentração de 1µg/mL, 10µg/mL e 100µg/mL e 200µL dessas soluções, por poço, foram incubadas e mantidas a 4°C em condições estéreis durante 16 horas. Após isso o sobrenadante foi retirado, cada poço recebeu 100µL de uma solução  $1 \times 10^4$  mioblastos por mL de meio de proliferação e o sistema foi colocado na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 16 e 24 as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos e lavadas com DPBS por três vezes. A parte superior do sistema foi removida e as lâminas foram montadas com meio de montagem com marcador de núcleos (ProLong<sup>®</sup> Diamond Antifade Mountant-Thermo Fisher Scientific) com lamínulas, essas foram secas e fotografadas no microscópio óptico de fluorescência (Zeiss, GER) no aumento de 10 vezes. As células com seus núcleos evidenciados foram contadas através da ferramenta ImageJ.

#### **3.6.2 Quantificação por cristal violeta**

Por esse outro método, os peptídeos e a LAM-111 foram diluídos em solução tampão fosfato modificado por Dulbecco sem cálcio e magnésio (pH:7,2) (Dulbecco's phosphate-buffered saline DPBS- Gibco) na concentração de 10µg/mL e 100µg/mL. Em uma placa com 96 poços de fundo chato com tratamento (Corning Costar, Cambridge, MA), 100µL dessas soluções foram incubadas em cada poço e mantidas a 4°C em condições estéreis durante 16 horas. Nos grupos controles não foi colocado substrato algum. Em seguida, o sobrenadante

foi retirado e cada poço recebeu 100µL de uma solução contendo  $1 \times 10^4$  mioblastos C2C12 por mL em meio de proliferação e a placa foi colocada na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C aguardando 24 e 48 horas a fim de avaliar a proliferação. Em uma condição controle o SFB foi reduzido pela metade mantendo a quantidade de células. Em cada tempo avaliado as células foram fixadas/coradas com 50µL de uma solução de 0,2% (peso/volume) de cristal violeta (ADV-Tayuyna) em 2% (volume/volume) de etanol (Merck) por 10 min. Depois disso, a placa foi colocada em água corrente a fim de retirar o excesso de corante. Em seguida, a placa é seca em cima de um papel absorvente. Após a secagem foi colocado 100µL de uma solução de 10% (peso/volume) de SDS para solubilizar o corante. Em seguida foi feita a leitura de absorbância no equipamento GloMax® 96 microplate Luminometer (Promega, USA) no comprimento de 600nm.

### **3.7 Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos mdx oriundos do Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) e mantidos em adaptação no setor de experimentação animal do LBC/LITEB IOC por 5-7 dias. Todos os experimentos são feitos conforme a resolução 196/96 do Ministério da Saúde, sendo o projeto aprovado (L006/15) pela Comissão de Ética para Utilização de Animais (CEUA) do Instituto Oswaldo Cruz.

### **3.8 Tratamento *in vivo* de LAM-111 e SIKVAV**

A LAM-111 (Gibco) foi injetada por via intramuscular no músculo *tibialis anterior* da pata direita dos camundongos na concentração de 100 µM em 100 µL de PBS, enquanto que na pata esquerda foi injetado o mesmo volume de PBS. Da mesma forma, foi feita a injeção do peptídeo sintético, SIKVAV (porção carboxi-terminal da cadeia α-1 da lamina-111) na concentração de 10 µg em 100 µl de PBS também no músculo *tibialis anterior* da pata direita dos camundongos enquanto que na pata esquerda foi injetado o mesmo volume de PBS. O tratamento foi feito nos camundongos com 3 a 4 semanas de idade e 3 dias antes da injeção intramuscular de cardiotoxina. O peptídeo foi adquirido da empresa QEDBioscience (San Diego, CA, USA) e tem pelo menos 95% de pureza (grau HPLC).

### 3.9 Dano induzido por cardiotoxina

Animais mdx com 3 a 4 semanas de idade, que receberam ou não a laminina e peptídeos por via intramuscular, são injetados em ambas as patas (tratada e controle) com cardiotoxina de *Naja mossambica* (Sigma-Aldrick) no volume de 100 µl e na concentração de 10 µM também por via intramuscular em PBS. Nos dias 0 (antes da injeção de cardiotoxina), 4, 10 e 14 após a injeção de cardiotoxina os camundongos são eutanasiados.

### 3.10 Histologia

Para a análise histológica, os músculos *tibialis anterior* (TA) são removidos e congelados por 4 métodos distintos:

- i) Congelados por imersão no nitrogênio líquido e colocados em solução criopreservante (OCT) (Tissue Tek, Sakura, JP).
- ii) Colocados no OCT em uma forma e posteriormente imersos no nitrogênio líquido até congelar.
- iii) Colocados em uma bateria de soluções de sacarose em PBS (10%, 15% e 30%) (peso/volume) à 4 graus. Em cada concentração o músculo foi colocado até sedimentar por aproximadamente 16 horas.
- iv) Encaixados pela porção proximal em uma base composta por uma cortiça (1 cm<sup>2</sup>) coberta por uma gota de goma de tragacanto a 6% em dH<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrick). Com o músculo voltado para baixo, esse complexo é imerso em isopentano (Sigma-Aldrick) congelado sobre nitrogênio líquido. Após 1 minuto de congelamento, o músculo é colocado sobre o gelo seco para secar o isopentano, depois disso, esse é armazenado na temperatura de -80 graus.

Foram feitos cortes de 7 µm utilizando o criostato (Leica, GER) com a navalha (Easy-Path) em lâminas previamente filmadas com Poly-L-lisina (Sigma). Essas são secas ao ambiente e armazenadas congeladas até o momento da marcação.

#### 3.10.1 Hematoxilina e Eosina e Sirius Red

Cortes de músculos coletados no quarto dia após ao dano com CTX, previamente tratados ou não com LAM-111 ou SIKVAV foram secos em temperatura ambiente. Após isso, essas foram fixadas por 10 minutos com acetona congelada (Merck, GER) e secas na capela de exaustão química. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Para avaliação de fibrose, a coloração de *Sirus red* foi utilizado evidenciando o depósito de colágeno.

### **3.10.2 Imunohistoquímica de células inflamatórias**

Os cortes de músculos avaliados foram secos em temperatura ambiente. Após isso, essas foram fixadas por 10 minutos com acetona congelada (Merck, GER), depois disso foram secas na capela de exaustão química. Foram lavadas em água corrente por 5 minutos e circuladas com a caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrick). Com a finalidade de bloquear a peroxidase endógena, foi colocado sobre as lâminas uma solução com 3% de peróxido de hidrogênio (volume/volume) (Merck, GER), 0,3% de soro normal de cabra (volume/volume) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) em água destilada por 10 minutos e lavadas por 5 minutos com tampão de lavagem, PBS (pH: 7,2-7,4) com 0,1% *Tween 20* (detergente biológico) (Sigma-Aldrick). Posteriormente as lâminas são bloqueadas com 2,5% de soro de cabra (*ImmPRESS™ HRP Anti-Rat IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit, made in Goat*, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 20 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, os anticorpos primários são incubados em solução de anticorpo [PBS 1X com 0,1% de *Tween 20* (Sigma-Aldrick), 0,5% de Triton, 2% de BSA (Sigma-Aldrick) e 20% de soro de carneiro (ICTB/Fiocruz)] com 16 horas de incubação à 4 graus. Para marcar macrófagos foi utilizado o anti-F480 (cat #: 123115, BioLegend, San Diego, CA, EUA) na concentração de 0,6 µg/mL e para marcar linfócitos, o anti-CD3 (cat #: 100208, BioLegend, San Diego, CA, EUA) na concentração de 3,3µg/mL, ambos feitos em rato. Após isso, as lâminas foram lavadas três vezes com solução de lavagem e o polímero detector anti-imunoglobulina de rato reativo com peroxidase (*ImmPRESS™ HRP Anti-Rat IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit, made in Goat*, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) foi incubado por 40 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente e reveladas com o substrato de peroxidase, 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako) ou com o DAB com níquel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram lavadas com água corrente, desidratadas quimicamente e montadas com meio de montagem (ERV-MOUNT).

### 3.10.3 *Imunohistoquímica de eMyHC*

Secções dos TAs coletados no quarto dia após ao dano com CTX, previamente tratados ou não com LAM-111 ou SIKVAV foram secas em temperatura ambiente. Após isso, essas foram fixadas por 2 minutos com acetona congelada (Merck, GER). Foram colocadas na capela de exaustão química a fim de evaporar todo o solvente orgânico. Foram lavadas em água corrente por 5 minutos e circuladas com a caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrick). Para bloquear a peroxidase endógena, foi colocado sobre as lâminas uma solução com 3% de peróxido de hidrogênio (volume/volume) (Merck, GER), 0,3% de soro normal de cavalo (volume/volume) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) em água destilada por 10 minutos. As lâminas foram lavadas por duas vezes com DPBS (Gibco) e incubadas com o reagente bloqueador de imunoglobulinas endógenas (*Mouse on Mouse (M.O.M.™) Blocking Reagent*-Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por uma hora, em temperatura ambiente. Essa etapa visa bloquear ligações do anticorpo secundário às imunoglobulinas presentes no tecido murino, uma vez que o anticorpo primário é feito em camundongo. Após esse bloqueio, o excesso é retirado e as lâminas lavadas com DPBS (Gibco) por duas vezes, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas com soro de cavalo à 2% (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) por 10 min. O excesso foi retirado, e o anticorpo primário anti-eMyHC (BF-45, concentração de 3,9 µg/mL, concentrado do sobrenadante, Developmental Studies Hybridoma Bank Department of Biology, IA) foi incubado durante a noite, diluído no reagente de bloqueio proteico, em temperatura de 4 graus. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com DPBS (Gibco) e o anticorpo secundário foi incubado por 20 minutos (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram lavadas com DPBS por duas vezes e a revelação foi feita usando (DAB) (Dako). As lâminas foram lavadas com água destilada, desidratadas quimicamente e montadas com meio de montagem (ERV-MOUNT). As lâminas foram fotografadas no microscópio óptico de luz (Zeiss, GER) no aumento de 20X. As fibras marcadas representam fibras recém-regeneradas, para quantificá-las, o programa ImageJ foi utilizado, no mínimo foram contadas 1000 fibras totais. As fotos representativas foram tiradas no aumento de 4x no microscópio óptico de luz (Nikon) com a câmera acoplada Canon PowerShot S50 (Canon).

### **3.11 Dosagem de citocinas**

Os músculos foram coletados e imersos em 200µL de meio de tampão de lise [1% de NP-40, 50mM de Tris, 1,5M de NaCl, uma pastilha de inibidor de protease (Roche, Sigma-Aldrick) a cada 10 mL de solução em H<sub>2</sub>O] e expostos à sonicação refrigerada a fim de extrair as proteínas presentes no tecido. Em um microtubo, foram centrifugados à 10000 rpm por 5 minutos à 4°C e as sobrenadantes foram coletados e armazenados. A dosagem de proteínas foi determinada pelo o kit BCA (Thermo Scientific Pierce) por absorbância. O achado proteico é comparado a curva padrão de BSA. As amostras foram mantidas a -80°C.

As citocinas dos extratos de músculos foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. O kit para de detecção de citocinas por partículas esféricas Th1, Th2 e Th17 (Becton e Dickson) foi utilizado, avaliando as seguintes citocinas: TNF, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e IL-12, conforme a descrição do fabricante. As amostras foram adquiridas no citometro de fluxo FACS Calibur (Becton e Dickson) e os achados foram analisados através do programa FCAP (Becton e Dickson) fazendo uma razão entre a quantidade da citocina avaliada e a quantidade proteína total na amostra.

### **3.12 Análise estatística**

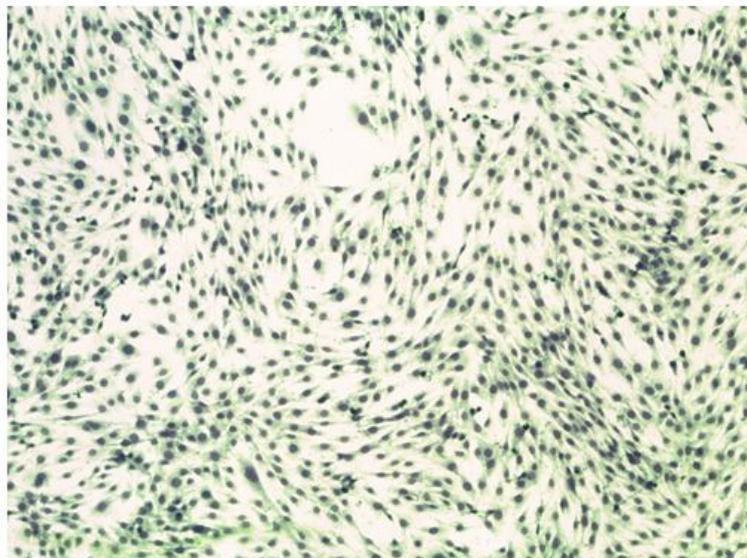
Para todos os experimentos, a diferença entre os grupos foi calculada pelo teste 2 way ANOVA ou por teste t (\*, p<0,05; \*\*0,01; \*\*\*p<0,001).

## **4 Resultados**

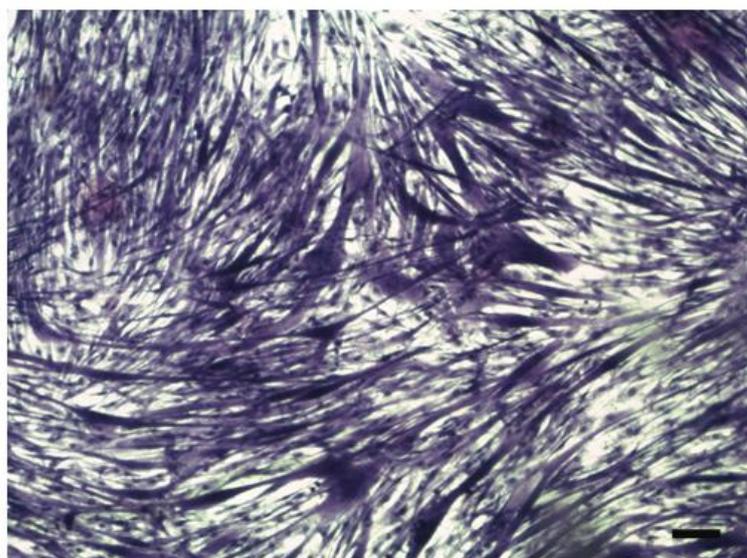
### **4.1 Padronização do cultivo celular de mioblastos da linhagem C2C12**

Para avaliação do efeito LAM-111 e seus peptídeos em mioblastos, escolhemos a linhagem celular imortalizada C2C12, mioblastos murinos de rabidosarcoma. Essas células são mantidas em estado proliferativo em baixa confluência (50~60%) evitando o contato célula-célula, para isso é necessária a passagem entre 1 a 2 dias em meio de proliferação descrito anteriormente. As células são uninucleadas e possuem morfologia estrelada ou fusiforme com alta adesão ao substrato. Previamente a indução da diferenciação desse tipo celular é necessário alcançar alta confluência variando entre 70% a 80% (Figura 4.1, A). Depois disso, o meio com SFB é retirado sendo substituído pelo meio de diferenciação com trocas diárias de 75% do volume de meio. Após o terceiro dia de diferenciação, os miotubos são observados. Esses são sincícios celulares, multinucleados, alongados ou em formato de "Y"(Figura 4.1, B).

**A**



**B**



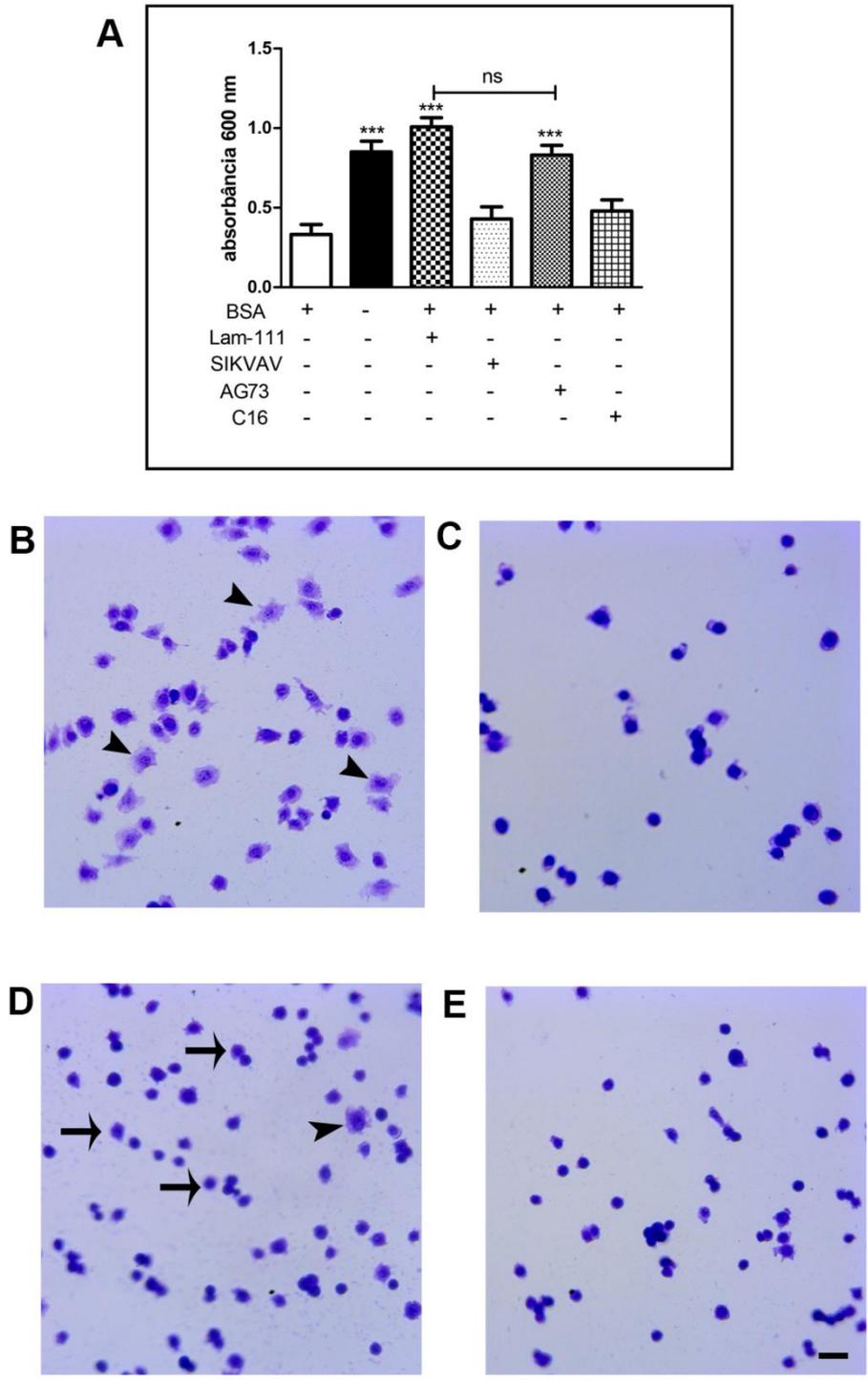
**Figura 4.1 Morfologia celular da linhagem C2C12.** As células foram mantidas em estado proliferativo ou induzidas à diferenciação, sendo fixadas e coradas com cristal violeta. (A) Monocamada de células C2C12 em estado proliferativo com alta confluência, essas são unicelulares com morfologia estrelada ou fusiforme. (B) Células C2C12 após o terceiro dia de diferenciação com presença de miotubos multinucleados de forma alongada ou em "Y". Barra corresponde a 100 $\mu$ m.

## 4.2 Avaliação da adesão de mioblastos em substratos de LAM-111 ou peptídeos

A adesão celular aos componentes da MEC é um processo mediado por componentes de membrana, o qual afeta relevantemente alguns eventos biológicos, como por exemplo, a organização do citoesqueleto, diferenciação celular e transcrição gênica. Nesse ensaio, avaliamos o efeito da LAM-111 ou seus peptídeos na adesão de células musculares. Para isso, nós incubamos os mioblastos C2C12 sobre o substrato tratado com LAM-111 e seus diferentes peptídeos mediante ao bloqueio com BSA. As células aderidas foram coradas e solubilizadas acusando absorvância no espectrofotômetro.

Nós observamos que a presença de BSA como substrato único diminui a adesão celular, quando comparamos com a adesão na ausência de qualquer substrato (Figura 4.2, A). Na avaliação da adesão nos mais demais substratos, a BSA foi mantida e observamos os maiores níveis de adesão na presença de LAM-111 e AG73 (Figura 4.2, A, B e D). Os peptídeos SIK-VAV e C16, em contrapartida, não promoveram adesão, não demonstrando diferença com o controle apenas com BSA (Figura 4.2, A, C e E).

Antes de serem solubilizadas, as células coradas foram fotografadas para avaliação da morfologia celular. Nota-se que as células sobre o substrato da LAM-111 apresentam morfologia predominantemente espalhada e poucas com forma arredondada (Figura 4.2, B). Mesmo promovendo a adesão como a LAM-111, o AG73 preserva majoritariamente o formato arredondado com o corpo celular retraído (Figura 4.2, D). As poucas células presentes nos demais peptídeos mostram morfologia similar ao AG73 (Figura 4.2, C e E).

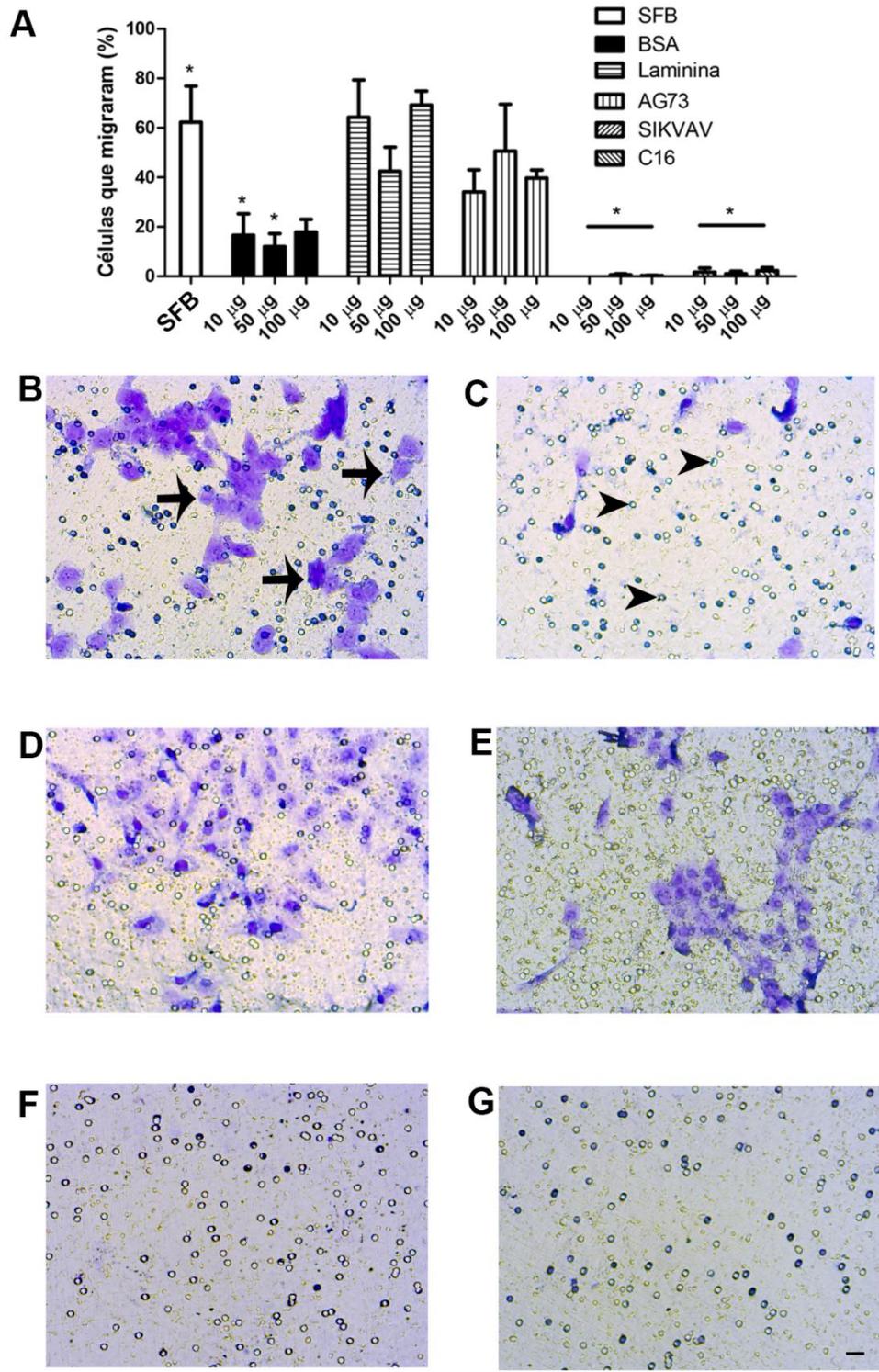


**Figura 4.2 Ensaio de adesão de mioblastos em LAM-111 e seus peptídeos.** (A) Gráfico representativo de três experimentos independentes, no qual foram quantificadas as células aderidas em diferentes substratos. As células foram coradas com cristal violeta e solubilizadas a fim de aferir a absorbância do corante. (B) Foto representativa de mioblastos corados com cristal violeta e aderidos à placa de fundo arredondado com 1 $\mu$ g de LAM-111 posteriormente bloqueada com BSA. A cabeça de seta indica células com morfologia espreada (C) Células

aderidas ao substrato de SIKVAV (D) Células aderidas ao peptídeo AG73, a seta representou células com morfologia arredondada. (E) Adesão de células causada pelo peptídeo C16, escala com 20µm. As diferenças estatísticas entre o controle com BSA e as demais condições foram calculadas pelo teste 2 way ANOVA (\*,  $p < 0,05$ ; \*\* $0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) (ns: não significativo).

### 4.3 Avaliação do efeito da LAM-111 ou seus peptídeos na migração de mioblastos

Nós também avaliamos o efeito da LAM-111 ou seus peptídeos na migração de mioblastos. Utilizamos a placa de transmigração que consiste em um sistema com insertos inseridos em poços resultando em dois compartimentos divididos por uma membrana orgânica com poros. Em um ambiente são colocadas as células e no outro, o estímulo. Para nosso ensaio, a linhagem celular C2C12 ( $1 \times 10^4$  células por câmara) foi colocada na câmara superior em ausência de soro. Na parte inferior, depositamos diferentes concentrações de estímulos diluídos em meio sem soro (10µg, 50µg ou 100µg por poço) de LAM-111, seus peptídeos ou BSA. Como controle positivo de migração utilizamos meio com 20% de SFB. Após 16 horas, as células que não atravessaram a membrana foram removidas mecanicamente e as migrantes, aderidas na parte inferior da membrana, foram fixadas e coradas para visualização. Uma relação entre o número de mioblastos colocados no inserto e o número de células migrantes foi realizado, podendo comparar as condições sobre o percentual de migração. Nós observamos um alto percentual de migração no controle positivo que foi uma condição com 20% de SFB, com grande presença de células na parte inferior do inserto evidenciadas por setas (Figura 4.3, A e B). Representando um conteúdo proteico inerte, em todas as concentrações, o BSA mostrou uma migração baixa com diferença significativa em relação ao controle positivo, os poros são evidenciados com a cabeça de seta (Figura 4.3, A e C). Foi observada uma maior migração em todas as concentrações da LAM-111 e o AG73, ambos não apresentaram diferença entre o controle positivo (Figura 4.3, A, D e F). Independente da concentração, ambos os peptídeos C16 e SIKVAV não mostraram efeitos na migração de mioblastos (Figura 4.3, A, G e F).



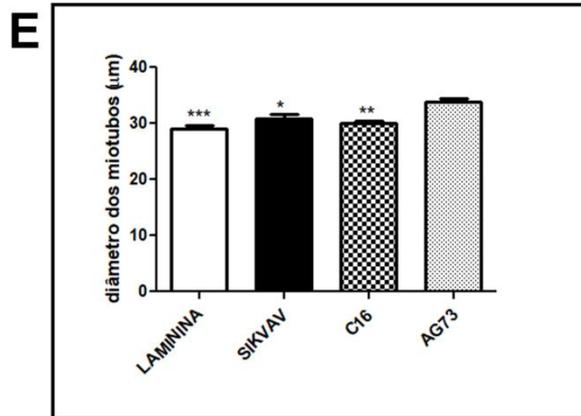
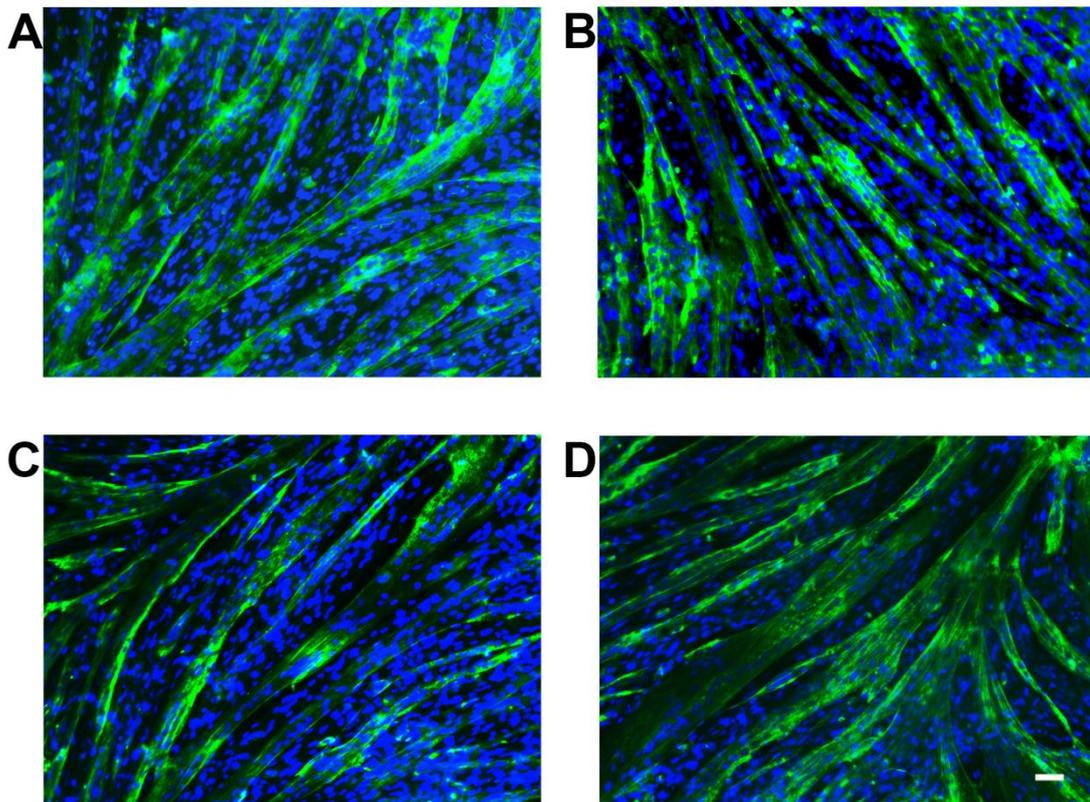
**Figura 4.3 Ensaio de migração de mioblastos com LAM-111 e seus peptídeos.** Utilizando um sistema de migração celular (*Transwell*), na câmara inferior foram colocadas quantidades indicadas de BSA, LAM-111, AG73, SIKVAV e C16, o controle positivo incubado com SFB à 20%. Os mioblastos C2C12 foram inseridos na parte superior do inserto ( $1 \times 10^4$ ) e foram

incubados por 16 horas para a avaliação da migração celular. (A) Um gráfico representativo de um experimento avaliando o percentual de migração. (B) Foto representativa da parte inferior do inserto com células fixadas e coradas com cristal violeta após a migração no controle positivo contendo 20% de SFB. As células foram apontadas pela seta. (C) Células migrantes na condição de 100µg por poço de BSA, os poros de 8µm foram realçados pela cabeça de seta. (D) Mioblastos que migraram após o estímulo de 100 µg de LAM-111 no poço inferior. (E) Células migratórias na condição de 100µg de AG73. (F e G) Parte inferior dos insertos nas condições de 100µg de SIKVAV e C16, respectivamente (Barra=20µm). As diferenças entre o controle positivo e as demais condições foram avaliadas pelo teste 2 way ANOVA (\*,  $p<0,05$ ; \*\* $0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).

#### **4.4 Avaliação do efeito da LAM-111 ou seus peptídeos na diferenciação de mioblastos**

Nesse ensaio, avaliamos o efeito da LAM-111 e seus peptídeos na diferenciação de células musculares. Para isso, a LAM-111 ou seus peptídeos foram usados como substrato na concentração de 10µg por poço durante 16 horas. Posteriormente, os mioblastos foram cultivados sobre o substrato permitindo a confluência na faixa de 70% a 80% para indução da diferenciação. Ao terceiro dia, os núcleos foram evidenciados com a sonda DAPI em azul e os miotubos pela marcação de MYHC em verde. Nesse experimento, o AG73 (Figura 4.4. D) induziu miotubos mais espessos comparado à LAM-111, o SIKVAV e o C16 (Figura 4.4. A-C)

Com o propósito de mesurar o efeito do peptídeo AG73 na diferenciação de mioblastos em relação às outras circunstâncias, o diâmetro dos miotubos foi determinado. Houve um aumento significativo do diâmetro dos miotubos quando expostos ao substrato com o peptídeo AG73. Isso não é observado nas demais circunstâncias (Figura 4.4. E).



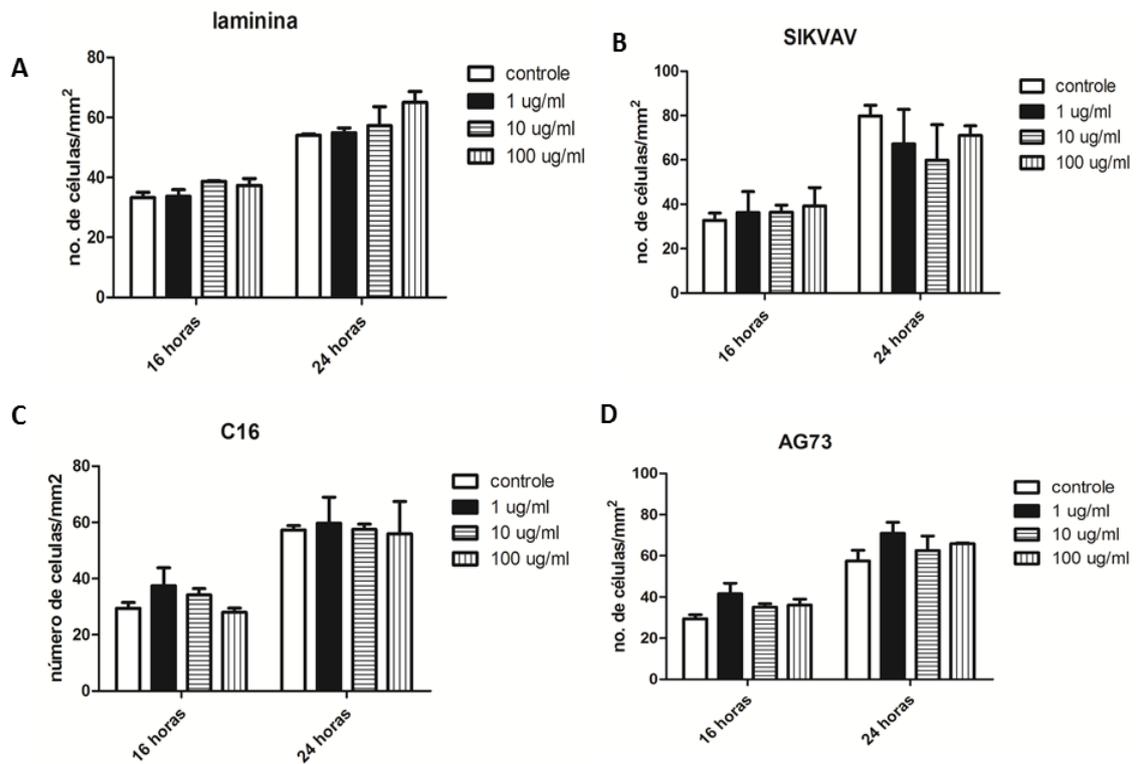
**Figura 4.4 Ensaio de diferenciação de mioblastos sobre a LAM-111 e seus peptídeos como substrato.** Os mioblastos foram colocados em poços com diferentes substratos para alcançar alta confluência. Depois disso, foram induzidos à diferenciação e após 72 horas foram marcados e fotografados, em verde temos MyHC e em azul, os núcleos. Foto representativa de miotubos diferenciados sobre 10 µg por poço de LAM-111(A), SIKVAV (B) e C16 (C). (D) AG73 (escala em 50µm). (E) Gráfico representativo de um experimento, avaliando o diâmetro dos miotubos nos diferentes substratos. A condição com AG73 foi comparada com os demais grupos. Não houve diferenças significativas entre a LAM-111, o SIKVAV e o C16. Porém, o peptídeo AG73 promoveu a hipertrofia com um aumento em relação aos outros gru-

pos. O índice hipertrófico foi calculado através do diâmetro dos miotubos de cada condição. O teste estatístico para avaliar as diferenças entre o índice hipertrófico do AG73 e as demais condições foi o teste 2 way ANOVA (\*,  $p < 0,05$ ; \*\* $0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

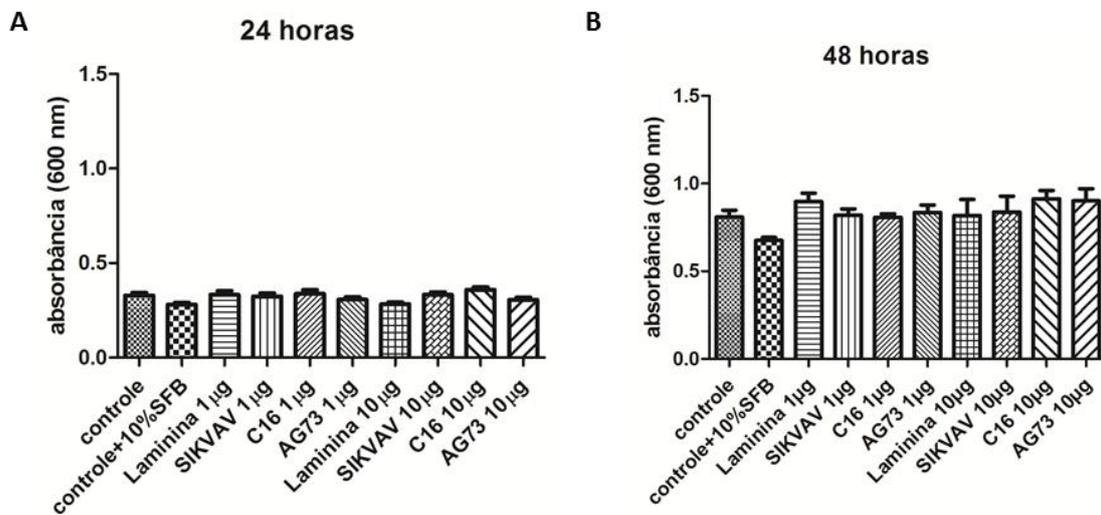
#### **4.5 Avaliação do efeito da LAM-111 na proliferação de mioblastos**

A proliferação dos mioblastos é relevante sob a perspectiva de uma alternativa terapêutica, portanto, avaliamos o efeito da LAM-111 e seus peptídeos nesse evento celular. Em razão disso, realizamos dois métodos para avaliar células em seu estado proliferativo. No primeiro, a LAM-111 e seus peptídeos foram incubados por 16 horas à 4 graus com substratos nas concentrações de  $1\mu\text{g/mL}$ ,  $10\mu\text{g/mL}$  ou  $100\mu\text{g/mL}$ , com  $200\mu\text{L}$  dessas soluções em cada poço. Nos controles de proliferação, não foi colocado nenhum substrato. Esses foram retirados dos poços, os mioblastos C2C12 foram cultivados em meio de proliferação e acompanhados nos tempos de 16 e 24 horas. As células foram fixadas e seus núcleos foram evidenciados com a sonda DAPI para contagem manual.

Foi observado um crescimento do número de células por área ( $\text{mm}^2$ ) em todos os substratos no tempo de 24 horas, quando comparado a de 16 horas. Porém, nenhum dos substratos apresentou efeitos na proliferação em mioblastos, em ambos tempos (16 horas e 24 horas) e concentrações de substratos comparados ao controle sem substrato algum (Figura 4.4, A-D). Desta forma, resolvemos utilizar outro método quantitativo com a finalidade de avaliar a proliferação de mioblastos sobre LAM-111 e seus peptídeos em uma cinética de tempo mais prolongada. Os mioblastos C2C12 foram incubados sobre os substratos tratados com LAM-111 e seus peptídeos com  $1\mu\text{g}$  ou  $10\mu\text{g}$  por poço. Nos poços de controle de proliferação não foi colocado substrato. Feito isso, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta após 24 e 48 horas de incubação. Nós observamos que a redução do SFB pela metade não altera a proliferação dos mioblastos no tempo de 24 horas de incubação. Além disso, a LAM-111 e seus peptídeos não demonstraram efeito na proliferação de mioblastos nesse tempo (Figura 4.5, A). A LAM-111 e seus peptídeos não alteraram a proliferação de células musculares nesse ensaio. Houve diferença em geral entre os tempos de 24 e 48 horas (Figura 4.5, B).



**Figura 4.5** Ensaio de proliferação de mioblastos sobre a LAM-111 e seus peptídeos como substrato por contagem manual. Os mioblastos C2C12 foram colocados em meio de proliferação sobre diferentes substratos, em três concentrações de 1µg/mL, 10µg/mL ou 100µg/mL. Após 16 e 24 horas de incubação, as células foram fixadas e seus núcleos foram evidenciados com DAPI a fim de realizar a contagem manual por área (mm<sup>2</sup>). Esses gráficos são representativos de um experimento. Contagem de células por área na condição de diferentes concentrações de substratos tratados com LAM-111 (A), SIKVAV (B), C16 (C) e AG73 (D). A avaliação estatística do número de células por área foi calculada pelo teste 2 way A-NOVA, não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

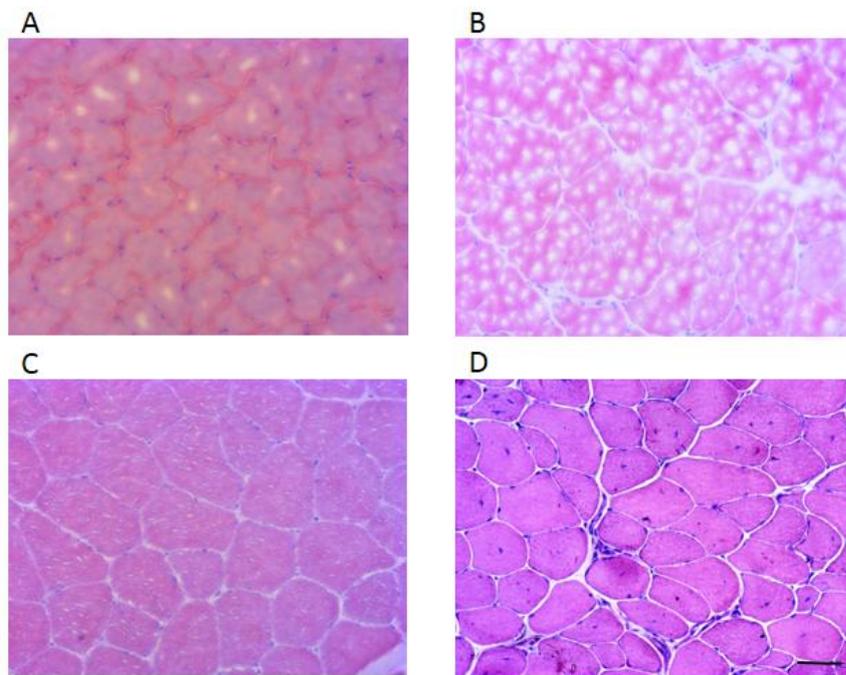


**Figura 4.6 Ensaio de proliferação de mioblastos sobre a LAM-111 e seus peptídeos como substrato.** A linhagem celular C2C12 foi incubada sobre a LAM-111 ou seus peptídeos a 1 µg ou 10 µg por poço. Em diferentes tempos, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta a fim de quantificar a absorbância do corante. Quantificação de células sobre diferentes substratos foi feita após 24 (A) e 48 horas de incubação (B). São mostrados gráficos representativos de um experimento. A quantificação de células foi calculada pelo teste 2 way ANOVA, não houve diferenças significativas entre as condições.

#### 4.6 Padronização do congelamento de músculos esqueléticos

Para iniciarmos a avaliação do efeito da LAM-111 e seus peptídeos no modelo animal da DMD, camundongo mdx, foi necessária a padronização da coleta do músculo esquelético. Antes das análises histológicas, o músculo precisa ser congelado para o corte em criostato e diversas metodologias foram testadas a fim de diminuir os artefatos de congelamento. Tentamos com o tecido diretamente no nitrogênio (Figura 4.6, A) ou embebido na solução criopreservante (OCT) (Figura 4.6, B). Em ambas as técnicas havia perda da qualidade da morfologia e o processo do corte era difícil. Então resolvemos expor o tecido a diversas con-

centrações de sacarose em PBS (10%, 15% ou 30%) antes do congelamento em OCT (Figura 4.6, C). O músculo coletado ficava em cada concentração até sedimentar (16 horas). Esse procedimento não prevenia totalmente os artefatos e as fibras ficavam túrgidas, alterando a morfologia. Finalmente, realizamos o protocolo de excelência para congelamento de músculo, no qual o *tibialis anterior* é coletado e fixado em uma cortiça com goma de tragacanto. Depois é direcionado ao isopentano resfriado em nitrogênio líquido com o músculo voltado para baixo. Após 2 minutos, o tecido é retirado e colocado sobre gelo seco. Para cortar no criostato, usa-se OCT para fixar o tecido na base para corte. Além da orientação ficar precisa, a morfologia é preservada possibilitando uma melhor análise (Figura 4.6, D).

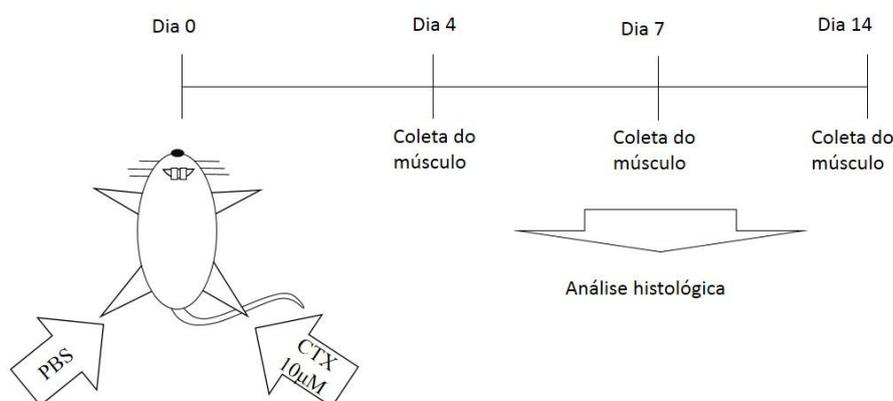


**Figura 4.7 Padronização do congelamento de músculo esquelético.** O músculo *tibialis anterior* foi coletado e congelado em A: Nitrogênio líquido, com grande perda na qualidade da morfologia; B: Isopentano, com alta formação de cristais dentro das fibras; C: Gradiente de sacarose, com poucos cristais e perda de morfologia; D: Goma de tragacanto e isopentano, apresentando a melhor morfologia e coloração evidente com contorno das fibras definido, sem formação de cristais. Um experimento com três a cinco animais por grupo (Barra: 50µm)

#### 4.7 Padronização do dano induzido por cardiotoxina no *tibialis anterior* e avaliação da área de infiltrado inflamatório

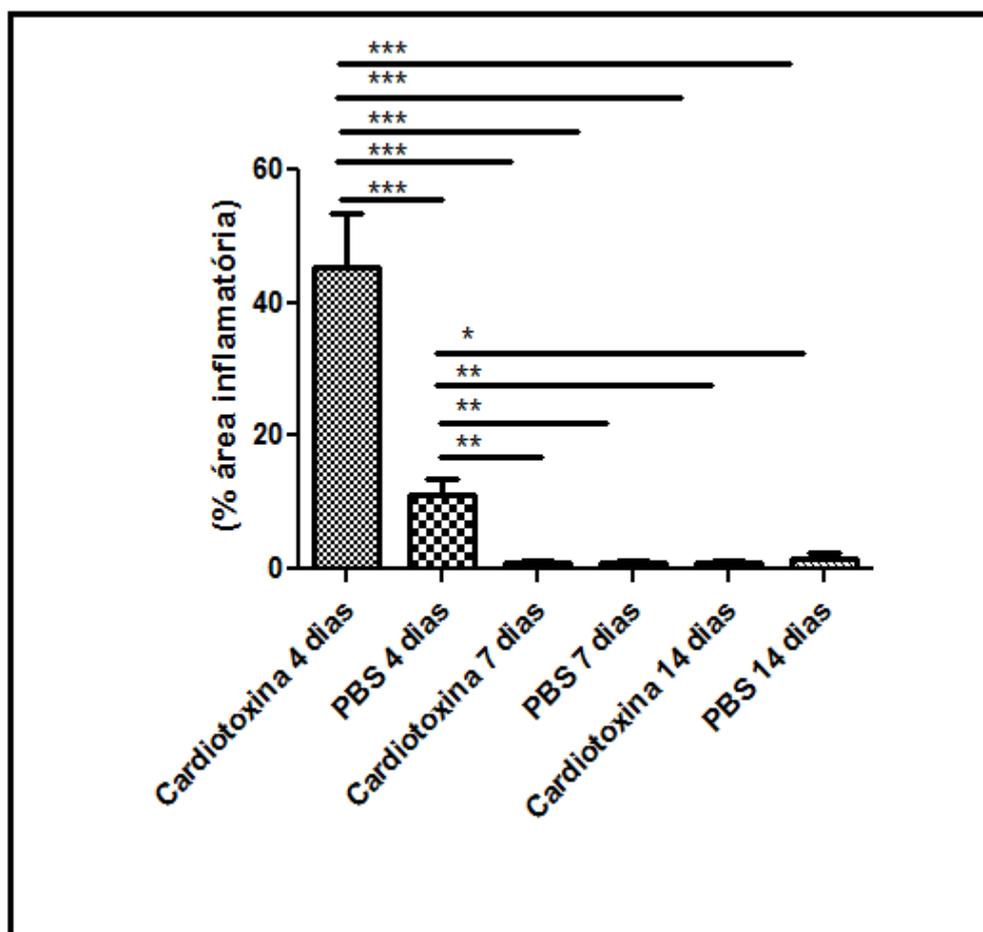
Inicialmente neste projeto, pretendíamos exacerbar o dano muscular através da natação induzida e depois avaliar os tratamentos, mas a atividade física gerava dano muscular muito variado. Sendo assim, decidimos fazer o tratamento com cardiotoxina (CTX), com a finalidade de exacerbar o dano muscular e aproximar o modelo animal à manifestação humana. Sua ação miotóxica ocorre pela alteração nos canais de cálcio e indução de uma contratura induzida quando administrada de forma intramuscular. A CTX também é muito utilizada em estudos de regeneração muscular (GARRY e colab., 2016; LIN SHIAU e colab., 1976).

Neste trabalho, foi realizada uma administração de CTX a  $10\mu\text{M}$  na pata traseira direita de camundongos mdx e de PBS na pata contralateral, no volume de  $100\mu\text{L}$ . Após a injeção, os animais foram mantidos no biotério até os dias de coleta, que foram 4, 7 e 14. Os músculos de ambos os lados foram coletados, congelados e corados para avaliar a área de infiltrado inflamatório (Figura 4.8).



**Figura 4.8 Desenho experimental para avaliar o efeito da CTX.** No dia 0, camundongos mdx foram injetados na pata direita traseira com  $10\mu\text{M}$  de CTX e PBS na pata contralateral. Os músculos foram coletados nos dias 4, 10 e 14 pós-injeção, cortados e corados com Hematoxilina e Eosina.

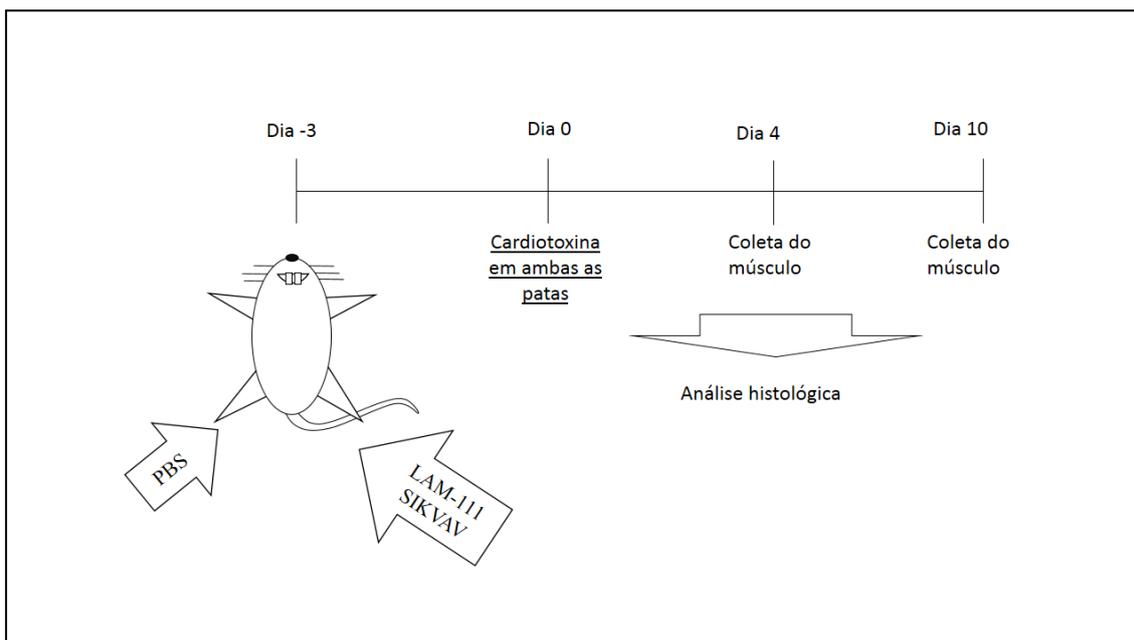
Foi observado que a infiltração inflamatória é mais intensa ocupando maior percentual de área no dia 4 em ambas as patas, tratadas com PBS e CTX (Figura 4.9). Porém, a pata tratada com CTX teve mais infiltração inflamatória, indicando uma exacerbação do dano. Há o aumento na área inflamatória mesmo na pata injetada com PBS, em comparação a camundongos mdx não tratados (dado não mostrado), e isso provavelmente ocorre devido ao procedimento de injeção em si, com volume injetado de 100µL. Nos dias posteriores, 7 e 14, ocorreu uma aparente resolução da inflamação. Esses dados confirmam a eficácia da CTX na indução de dano como descrito na literatura (Figura 4.9).



**Figura 4.9 Administração de CTX e aumento na área inflamatória.** Camundongos mdx receberam uma injeção de PBS no músculo *tibialis anterior* em uma pata traseira e a pata contralateral recebeu CTX na dose de 10µM (volume de 100µL). A coleta dos músculos foi feita após 4, 7 e 14 dias do tratamento e o material foi congelado, cortado e corado por hematoxilina e eosina para a avaliação da área inflamatória. As diferenças entre os grupos foram calculadas pelo teste 2 way ANOVA (\*, p<0,05; \*\*0,01; \*\*\*p<0,001).

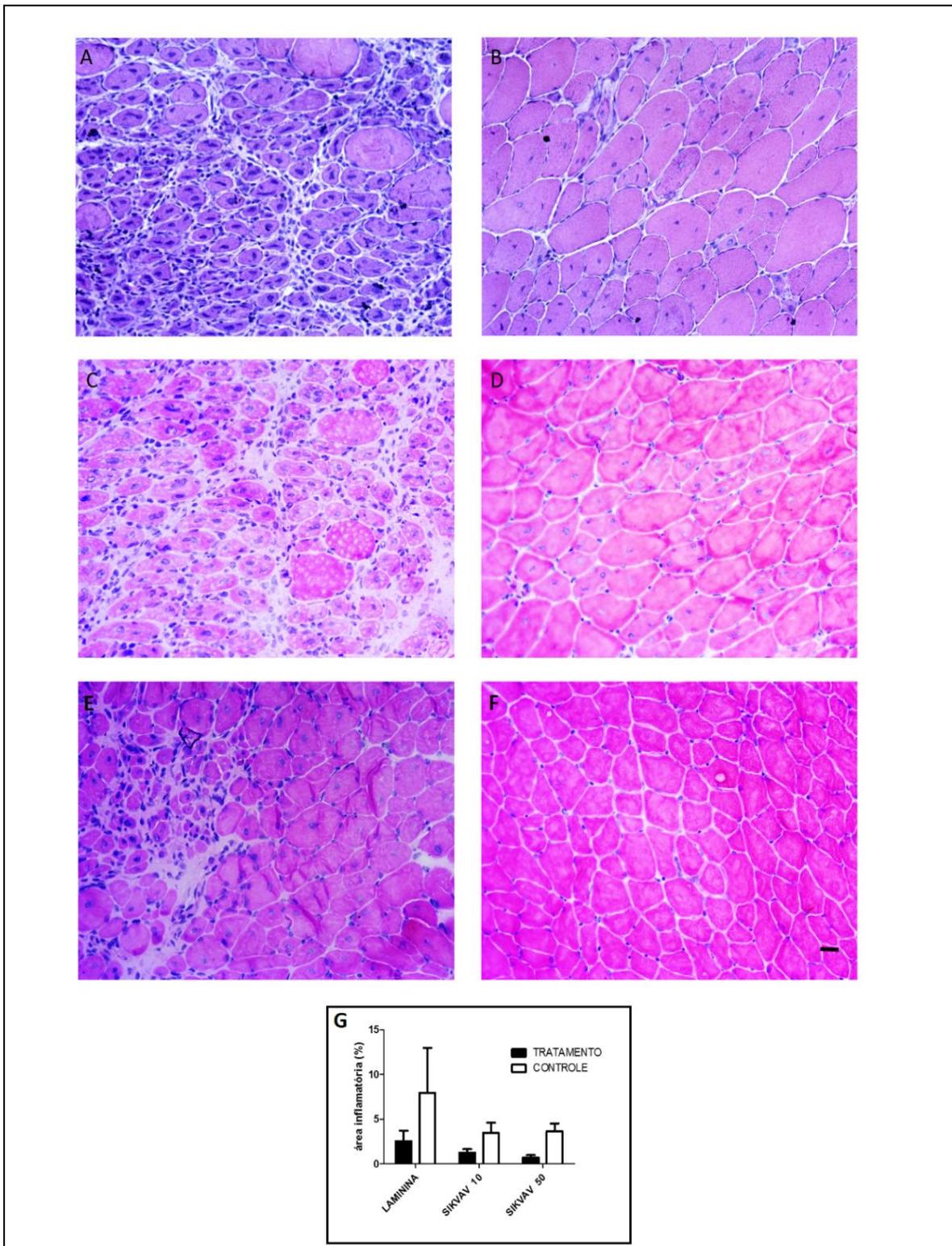
#### 4.8 Avaliação da modulação inflamatória com tratamento preventivo de LAM-111 ou SIKVAV mediante ao dano induzido por CTX.

O peptídeo SIKVAV apresenta efeitos biológicos *in vivo*, como aumento da angiogênese e revascularização, promoção da malignidade de tumores e cicatrização em feridas (CHEN, Xionglin e colab., 2017; FREITAS e colab., 2007; GRANT e ZUKOWSKA, 2000). Então, o elegemos para investigar seu efeito terapêutico em camundongos distróficos. Para isso, Camundongos mdx de 3 a 4 semanas foram tratados com uma injeção intramuscular de laminina (100  $\mu$ M) ou peptídeo SIKVAV (10 e 50  $\mu$ g/pata) no músculo TA da pata direita enquanto que na pata esquerda foi injetado PBS. Três dias após essa administração, todas as patas (tratada e controle) de todos os animais receberam a injeção de CTX (10 $\mu$ M) no volume de 100 $\mu$ L e os músculos foram coletados nos dias 4 e 10 para análises histológicas (Figura 4.10).



**Figura 4.10** Desenho experimental para avaliação do tratamento preventivo ao desafio com CTX. As patas direitas de camundongos mdx com três a quatro semanas de idade foram injetadas com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g ou 50 $\mu$ g), respectivamente, no volume de 100 $\mu$ L. Na pata contralateral esquerda, injetamos PBS. Após três dias, todas as patas de todos os animais foram desafiadas com CTX (10 $\mu$ M). Posteriormente, nos dias 4 e 10, os músculos foram coletados e processados para análises histológicas.

A área de infiltrado inflamatório no dia 4 foi quantificada e houve uma grande variação entre as patas controle tratadas com PBS no grupo que teve as patas contralaterais tratadas com laminina (Figura 4.11). Entre as outras patas controle houve menor variação. Possivelmente, devido à grande variação das patas controle do grupo com a pata contralateral tratada com LAM-111, não houve diferença significativa entre as patas pré-tratadas ou não desse grupo (Figura 4.11). O número de indivíduos analisados e experimentos serão aumentados para a melhor avaliação deste aspecto. Por outro lado, houve um aumento significativo na área ocupada por infiltrados inflamatórios, assim como de células inflamatórias difusas, nos grupos cujas patas foram pré-tratadas com as duas concentrações de peptídeo, em relação às patas pré-tratadas com PBS (Figura 4.11). Estes resultados ilustram a grande capacidade tanto da laminina 111, como já havia sido descrito, como do peptídeo na proteção ao dano muscular. Nas patas tratadas com PBS (Figura 4.11, A, C e E), observamos muitas fibras musculares jovens com menor diâmetro e nucleação central e intensa infiltração inflamatória. Já as patas pré-tratadas com LAM-111 (Figura 4.11. B) ou SIKVAV nas duas concentrações (Figura 4.11, D e F) exibem mais fibras adultas, com menor heterogeneidade no diâmetro das células e menos fibras com nucleação central. Sendo assim, houve menor degeneração muscular, compatível com o menor número de células inflamatórias difusas ou compondo infiltrados inflamatórios.



**Figura 4.11** Efeito protetor da LAM-111 e peptídeo SIKVAV (10 e 50  $\mu\text{g}$ ) após indução de dano muscular por cardiotoxina. As patas traseiras direitas de camundongos mdx foram injetadas com LAM-111 (100 $\mu\text{M}$ ) ou SIKVAV (10 $\mu\text{g}$  ou 50 $\mu\text{g}$ ), respectivamente, no volume de 100 $\mu\text{L}$ . Na pata contralateral esquerda, injetamos PBS. Após três dias, todas as patas de todos animais foram desafiadas com CTX (10 $\mu\text{M}$ ). Quatro dias após o desafio, os músculos TA foram coletados e processados para análises histológicas por coloração por Hematoxili-

na/Eosina. São mostrados resultados de patas pré-tratadas com PBS (A, C, E e G), laminina (B e G), SIKVAV 10 µg/pata (D e G) e SIKVAV 50µg/pata (F e G). A barra corresponde a 20 µm. Experimento representativo de 3 repetições com 3 a 5 animais por grupo. As diferenças estatísticas entre os tratamentos e seus controles foram avaliadas pelo teste 2 way ANOVA. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

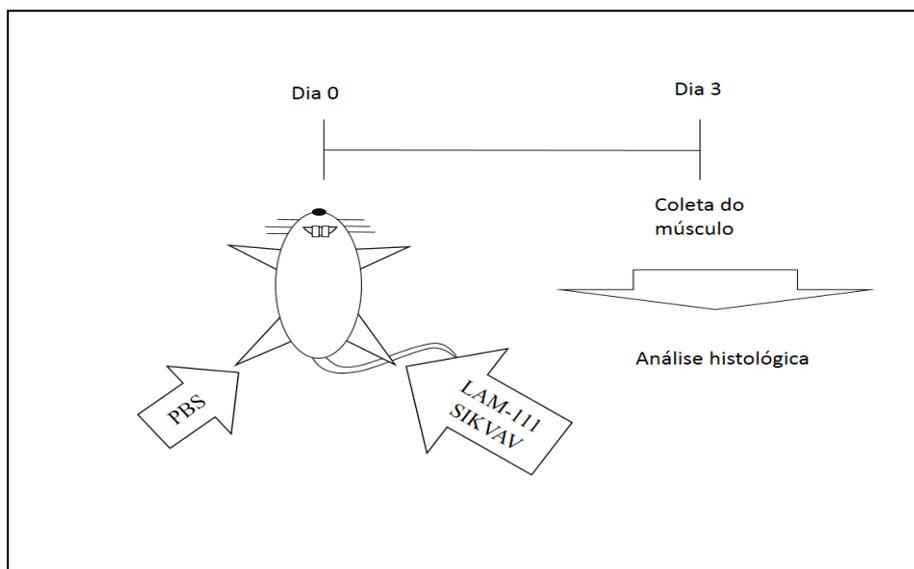
## **4.9 Caracterização do infiltrado inflamatório muscular**

Depois de avaliar a área de infiltrado presente nos músculos mediante ao tratamento, realizamos caracterização e quantificação das células compondo infiltrados inflamatórios mediante ao dano induzido por CTX ou no contexto do tratamento apenas com a LAM-111 ou o peptídeo SIKVAV.

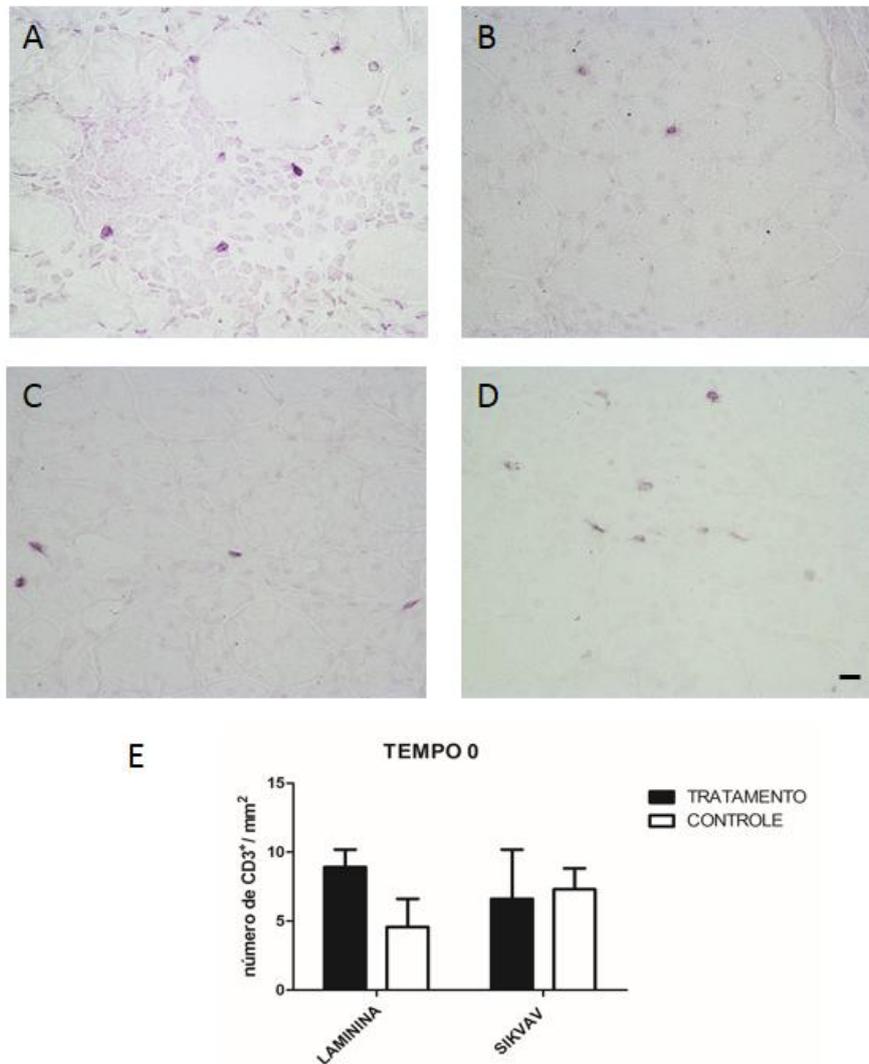
### **4.9.1 *Quantificação de linfócitos no infiltrado inflamatório muscular***

Inicialmente, a população de linfócitos T (CD3+) foi avaliada em camundongos tratados com LAM-111 (100µM) e SIKVAV (10µg) sem desafio da CTX (Figura 4.12). A contagem desse tipo celular foi realizada por número de células por mm<sup>2</sup>. Com células CD3+ difusos, essa população mostrou-se bem homogênea, não se alterando entre os grupos (Figura 4.13).

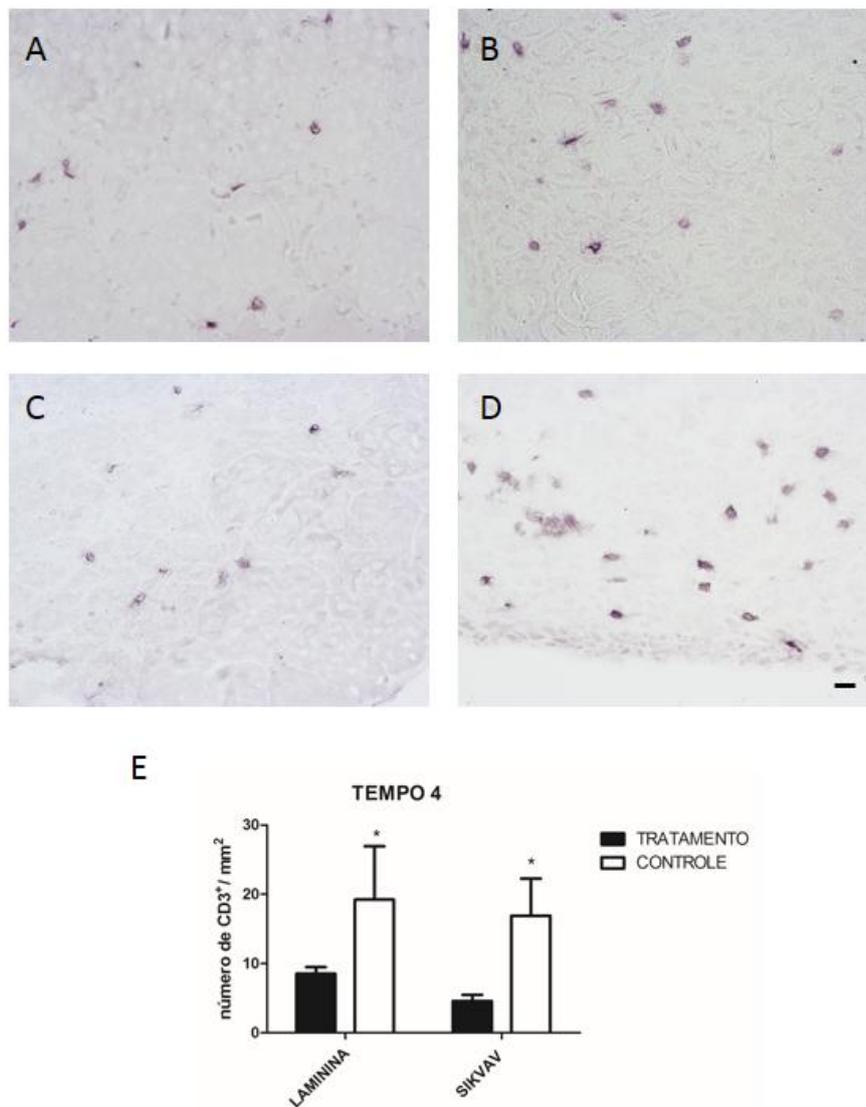
Foram quantificados os linfócitos presentes nos músculos previamente tratados com LAM-111 (100µM) e SIKAV (10µg) e desafiados com CTX (10µM) (Figura 4.10). Foi observada uma diminuição de linfócitos no músculo mediante o tratamento com LAM-111 em comparação ao PBS (Figura 4.14, A e B). O peptídeo SIKVAV administrado via intramuscular foi capaz de reduzir a população de linfócitos infiltrada após dano induzido por CTX quando comparado ao tratamento com PBS (Figura 4.14, C e D). Nesse contexto, ambos os tratamentos diminuíram significativamente a infiltração linfoide no músculo, mostrando a capacidade protetora da LAM-111 e do SIKVAV ao dano induzido por CTX de forma significativa (Figura 4.14, E).



**Figura 4.12 Desenho experimental do tratamento com LAM-111 e SIKVAV.** Camundongos mdx de 3 a 4 semanas foram injetados na pata direita com SIKVAV (10 $\mu$ g) ou LAM-111 (100 $\mu$ M) no volume de 100  $\mu$ L. Na pata esquerda foi injetado PBS também no volume de 100 $\mu$ L. Após 3 dias, os músculos foram coletados e processados para caracterização e quantificação das células inflamatórias.



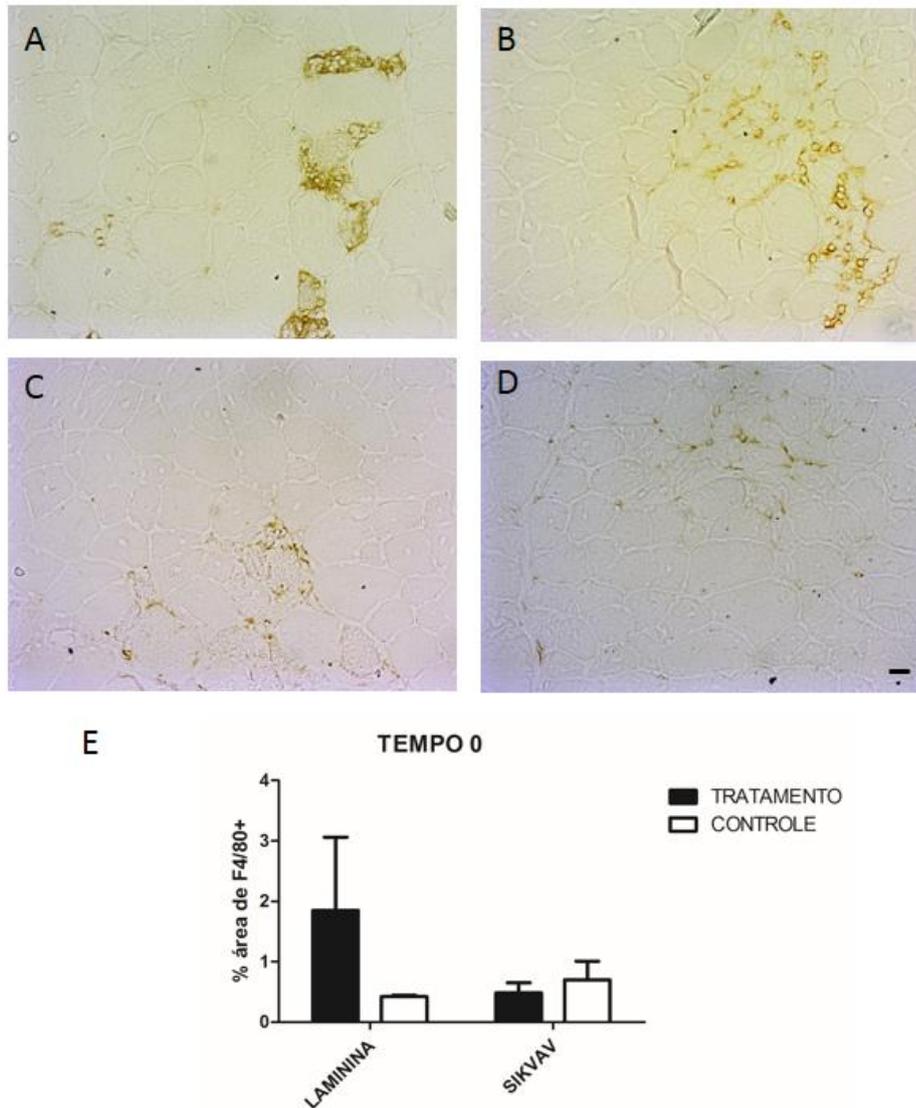
**Figura 4.13 Infiltrado de linfócitos T (CD3+) no músculo de camundongos tratados do LAM-111 ou SIKVAV.** As patas traseiras direitas de camundongos mdx foram injetadas com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g), no volume de 100 $\mu$ L. Na pata contralateral esquerda, injetamos PBS. Quatro dias depois, os músculos *tibiais anterior* foram coletados e processados para análises por imunohistoquímica usando anticorpo primário anti-CD3. Pata tratada com LAM-111 (A) ou PBS (B); SIKVAV (10 $\mu$ g) (C) ou PBS (D). O gráfico referente à quantificação representa o número de células por mm<sup>2</sup> (E), as diferenças entre os tratamentos e seus controles foram calculadas pelo teste 2 way ANOVA. Não houve diferenças significativas entre os grupos.



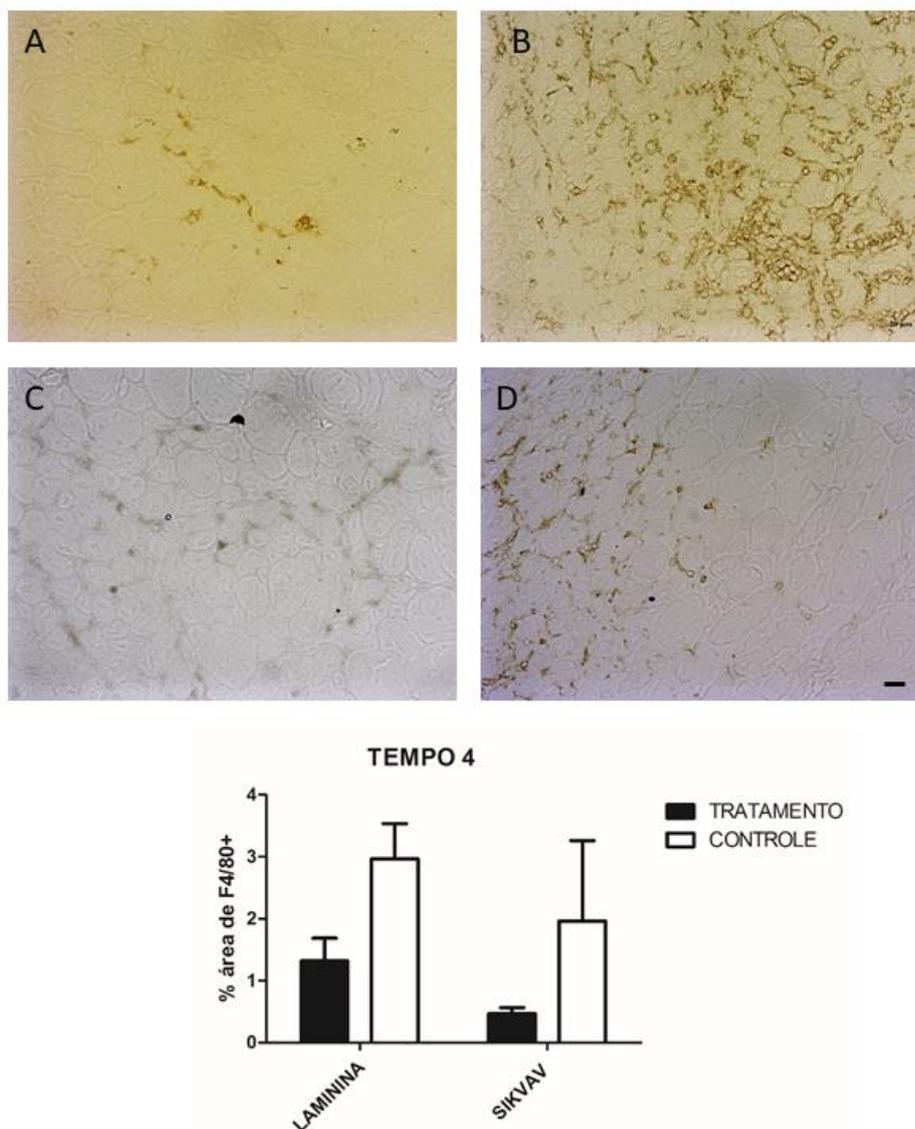
**Figura 4.14 Infiltração inflamatória por linfócitos após tratamento com LAM-111 ou SIKVAV e dano induzido por CTX.** As patas traseiras direitas de camundongos mdx foram injetadas com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g), no volume de 100 $\mu$ L. Na pata contralateral esquerda, injetamos PBS. Após três dias, todas as patas de todos animais foram desafiadas com CTX (10 $\mu$ M). Quatro dias após o desafio, os músculos *tibialis anterior* foram coletados e processados para análises por imunohistoquímica usando anticorpo primário anti-CD3. Pata tratada com LAM-111 (A) ou PBS (B); SIKVAV (10 $\mu$ g) (C) ou PBS (D). O gráfico referente à quantificação representa o número de células por mm<sup>2</sup> (E), as diferenças entre os tratamentos e seus controles foram avaliadas pelo teste 2 way ANOVA (\* representa  $p \leq 0,5$ ).

#### **4.9.2 *Quantificação de macrófagos no infiltrado inflamatório muscular***

Avaliamos também outro tipo celular muito presente nos músculos distróficos, que são os macrófagos. Essa população celular (F4/80+) foi avaliada em camundongos tratados com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g) e inicialmente sem o dano induzido por CTX (10 $\mu$ M) (Figura 4.12). A quantificação de macrófagos foi realizada por percentual de área marcada em ensaio de imunohistoquímica e não houve diferença entre as patas tratadas (Figura 4.13, A e C) e as patas controle (Figura 4.13, B e D), sem diferença significativa entre os grupos (Figura 4.15, E). Também realizamos a quantificação de macrófagos nos músculos de camundongos tratados com LAM-111(100 $\mu$ M) e SIKVAV (10 $\mu$ g) e expostos ao dano induzido por CTX (Figura 4.10). As patas pré-tratadas com LAM-111 mostraram menor área de marcação de F4/80 em relação às patas controle pré-tratadas com PBS (Figura 4.16, A, B e E). Porém, houve grande variabilidade na marcação das patas controle ao tratamento com SIKVAV (Figura 4.16, C, D e E) não apresentando diferença entre os grupos.



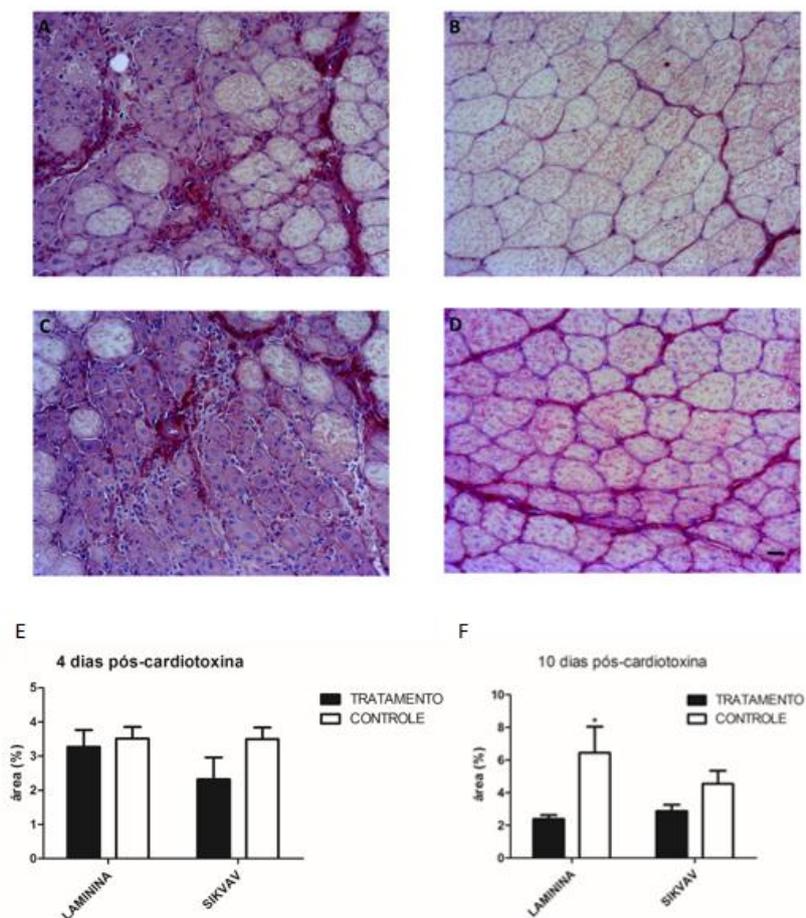
**Figura 4.15 Infiltrado de macrófagos nos músculos tratados com LAM-111 e SIKVAV.** As patas traseiras direitas de camundongos mdx foram injetadas com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g), no volume de 100 $\mu$ L. Na pata contralateral esquerda, foi injetado PBS. Quatro dias depois, os músculos *tibiais anterior* foram coletados e processados para análises por imunohistoquímica usando anticorpo primário anti-F4/80. Pata tratada com LAM-111 (A) ou PBS (B); SIKVAV (10 $\mu$ g) (C) ou PBS (D). O gráfico referente à quantificação representa o percentual de área ocupada por células F4/80+ (E), não houve diferença significativa entre os tratamentos e os controles com o teste 2 way ANOVA. Barra é igual a 50 $\mu$ m.



**Figura 4.16 . Infiltrado de macrófagos nos músculos tratados com LAM-111 e SIKVAV mediante ao dano induzido por CTX.** As patas traseiras direitas de camundongos mdx foram injetadas com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g), no volume de 100 $\mu$ L. Na pata contralateral esquerda, injetamos PBS. Após três dias, todas as patas de todos animais foram desafiadas com CTX (10 $\mu$ M). Quatro dias após o desafio, os músculos *tibialis anterior* foram coletados e processados para análises por imunohistoquímica usando anticorpo primário anti-F4/80. Pata tratada com LAM-111 (A) ou PBS (B); SIKVAV (10 $\mu$ g) (C) ou PBS (D). O gráfico referente à quantificação representa o percentual de área ocupada por células F4/80+ (E), \* representa  $p \leq 0,5$ . Barra é igual a 50 $\mu$ m.

#### 4.10 Avaliação da fibrose nos músculos tratados

A fibrose é o resultado do depósito de tecido conectivo é um processo de reparo tecidual. Esse é um evento patológico relevante para DMD, comprometendo fortemente a função muscular. Devido ao dano muscular extenso, ocorre o aumento de necrose e inflamação que contribuem para a tendência pró-fibrótica (KLINGLER e colab., 2012). Para avaliar se o tratamento com SIKVAV (10µg) e o tratamento da LAM-111 diminuíram a fibrose, cortes de músculos dos dias 4 e 10 após CTX foram corados com *Sirus Red*. Essa coloração evidencia em vermelho as fibras de colágeno. Em A temos o controle e em B as patas pré-tratadas com LAM-111, em C temos o controle e em D os músculos tratados com SIKVAV, todos com fotos representativas do dia 10 (Figura 4.17, A-D). Foi feita a quantificação da área corada em ambos os dias, porém no dia 4 não houve diferença significativa. No dia 10 houve uma diminuição apenas com o tratamento da LAM-111, o peptídeo SIKVAV não foi capaz de prevenir a fibrose (Figura 4.17, E).

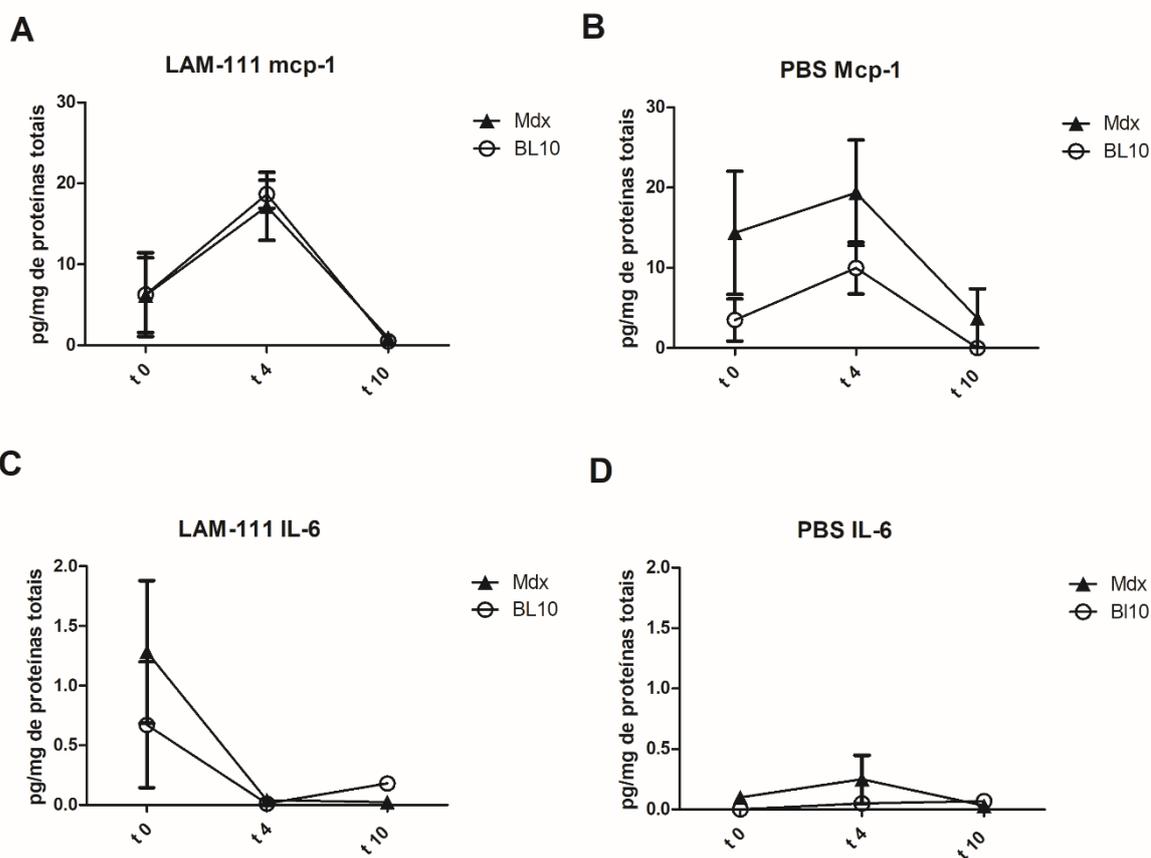


**Figura 4.17 Efeito do tratamento com LAM-111 ou SIKVAV sobre a fibrose.** Imagens representativas de secções coradas com *Sirius red* após 10 dias da injúria induzida por CTX e tratados preventivamente 3 dias antes com PBS ou LAM-111 (A, B), PBS e SIKVAV 10  $\mu$ g/pata (C, D) (barra corresponde a 20  $\mu$ m). Gráfico mostrando a quantificação da área de fibrose após dano induzido por CTX e tratamento preventivo com LAM-111 ou peptídeo SIKVAV (10 $\mu$ g/pata) quando comparado às patas controles que receberam PBS estéril. Experimento representativo de 3 repetições com 3 a 5 animais por grupo. As diferenças estatísticas entre o músculo tratado e não tratados foram calculadas pelo teste 2 way ANOVA, \* representa  $p \leq 0,5$ .

#### 4.11 Caracterização do perfil de citocinas dos músculos tratados

Nós avaliamos as citocinas secretadas mediante ao tratamento da LAM-111 nos músculos de camundongos mdx e seu controle de mesmo fundo genético, C57BL/10 (Figura 4.12). Essa abordagem também foi realizada nos tratamentos no contexto do dano induzido

com CTX (Figura 4.10). Para isso os músculos foram coletados, foi feita a extração de proteínas totais e as citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo através do kit CBA. O conteúdo proteico total foi determinado para a normalização da quantidade de citocinas por amostra. Das citocinas avaliadas pelo kit, a IL-6 e a MCP-1 demonstraram destaque na expressão. A MCP-1 possui papel quimiotático para monócitos, enquanto a IL-6 possui efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. A MCP-1 apresenta um indicativo de aumento em músculos não tratados de mdx comparado ao C57BL/10 (Figura 4.18, B), o tratamento com LAM-111 intramuscular aproximou os níveis de mcp-1 do mdx ao seu controle (Figura 4.18, A). A administração de LAM-111 foi capaz de aumentar significativamente (diferença entre os grupos com  $p \leq 0,5$ ) a expressão de IL-6 em músculos de mdx tratados em relação aos injetados com PBS, no tempo 0 (Figura 4.18, C e D).



**Figura 4.18 Perfil de citocinas secretadas mediante ao tratamento intramuscular de LAM-111.** Os músculos foram coletados antes e após o dano da CTX com o tratamento de LAM-111 ou PBS. As proteínas totais foram extraídas e as citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo. Dosagem de MCP-1 de músculos de mdx e C57BL/10 (BL0) tratados com LAM-111 (A), somente tratados com PBS (B). Determinação de IL-6 em músculos de mdx e BL10 tratados com LAM-111 (A) ou tratados com PBS (B). A avaliação estatística da

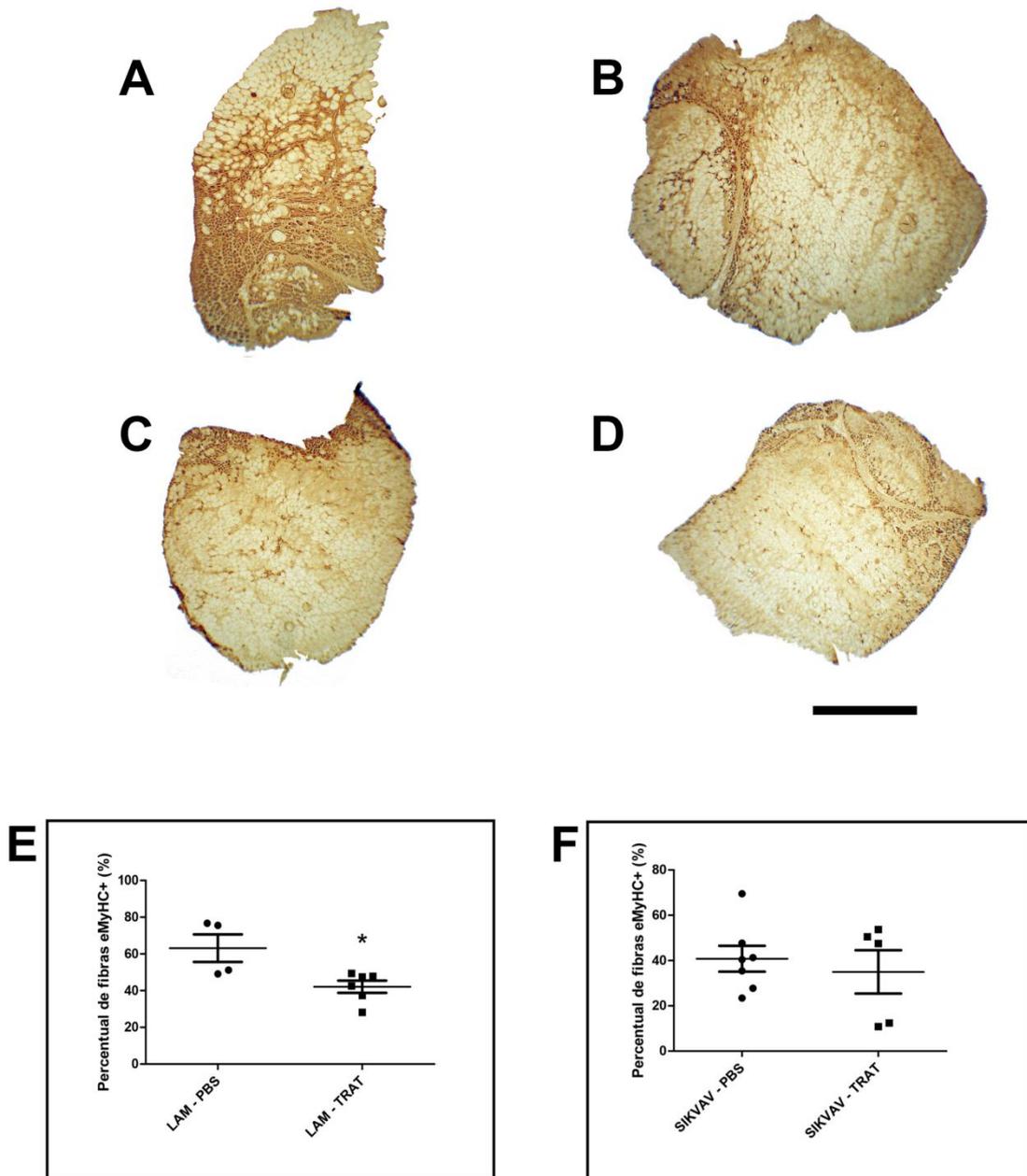
quantificação de citocinas foi calculada pelo teste 2 way ANOVA (\*,  $p < 0,05$ ; \*\* $0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

#### **4.12 Avaliação da regeneração muscular mediante aos tratamentos**

A cadeia pesada de miosina é um importante marcador na categorização dos tipos de fibras do músculo esquelético. Em geral, temos as fibras rápidas de caráter glicolítico e as fibras lentas com perfil mais oxidativo de metabolismo. A partir da detecção das isorformas da cadeia pesada podemos afirmar o tipo da fibra. No tecido, as fibras em regeneração expressam uma isoforma distinta, a eMyHC. Essa também é presente durante o desenvolvimento muscular fetal, mas não em músculo adultos no estado normal (SCHIAFFINO, 2018).

Avaliamos a expressão de eMyHC em músculo previamente tratados com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g) mediante ao dano induzido por CTX. Em função disso, realizamos um ensaio de imunohistoquímica para detectar a eMyHC em secções dos músculos coletados 4 dias após o dano induzido por CTX (Figura 4.9). Notamos que músculos previamente administrados com PBS possuem maior número de fibras eMyHC positivas em relação aos músculos tratados com LAM-111. As fibras positivas para a isoforma embrionária apresentam cor marrom acastanhada (Figura 4.17, A e B). Porém, não houve diferença de expressão de eMyHC entre o tratamento com peptídeo SIKVAV e as patas contralaterais administradas com PBS (Figura 4.17, C e D).

Portanto, ao avaliar o percentual de fibras positivas para eMyHC, o tratamento com LAM-111 apresentou uma redução significativa em relação à pata administrada com PBS, indicando proteção contra o dano induzido pela CTX (Figura 4.17, E). Em contrapartida, o peptídeo SIKVAV não foi capaz de modular o dano e a regeneração dos músculos danificados pela CTX, sendo assim, esse não apresentou diferença em relação ao seu controle tratado com PBS (Figura 4.17, F).



**Figura 4.19** Efeito do tratamento da LAM-111 ou o peptídeo SIKVAV sobre o dano e a regeneração muscular induzido pela CTX. As patas traseiras direitas de camundongos mdx foram injetadas com LAM-111 (100 $\mu$ M) ou SIKVAV (10 $\mu$ g ou 50 $\mu$ g), respectivamente, no volume de 100 $\mu$ L. Na pata contralateral esquerda, injetamos PBS. Após três dias, todas as patas de todos os animais foram desafiadas com CTX (10 $\mu$ M). Quatro dias após o desafio, os músculos TA foram coletados e a eMyHC foi detectada por imunohistoquímica. São mostradas fotos representativas de músculos tratados previamente com LAM-111(A) e sua pata contralateral com PBS (B), assim como cortes de músculos previamente tratados com SIKVAV

(C) e seu controle PBS (D). Barra (A-D): 1mm. Gráficos representativos de três experimentos avaliando o percentual de fibras positivas para eMyHC com a LAM-111 e seu controle PBS (E) e o SIKVAV e seu controle PBS (F). As diferenças entre os tratamentos e seus controles foram calculadas com o teste t (\*,  $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A DMD é uma doença de caráter genético sendo a forma mais grave dentre as distrofias. Essa é causada por mutações no gene da distrofina, que resultam em extensa degeneração e fraqueza muscular progressivamente levando ao uso de cadeira de rodas. Há complicações cardíacas e ortopédicas e o paciente sucumbe tem torno da maioridade. Não há cura e o tratamento mais utilizado é o uso de corticoides, o qual possui vastos efeitos colaterais. Portanto, há necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e um maior entendimento sobre a doença (FLANIGAN, 2012).

A LAM-111 já mostrou efeito terapêutico em modelos experimentais da DMD. Essa glicoproteína oriunda da MEC, ao ser administrada de forma intramuscular, é capaz de aumentar a expressão da integrina- $\alpha7\beta1$  e utrofina, proteínas de adesão compensatória. De forma sistêmica, a LAM-111 é capaz de proteger contra o dano induzido por exercício, diminuindo níveis séricos de CK e fibras musculares em degeneração. Para mais, ela promove a migração e proliferação de mioblastos, aumentando a eficácia do transplante celular a fim de recuperar a expressão da distrofina (GOUDENEUGE e colab., 2010; ROONEY e colab., 2012).

Sabe-se que as lamininas e outros componentes da MEC podem ser fragmentados liberando matricinas. Essa fragmentação pode ocorrer de diversas formas, como proteólise. Esses fragmentos possuem funções biológicas distintas da molécula íntegra, pois não estão expostos na estrutura terciária (KIKKAWA e colab., 2013). No presente estudo, avaliamos os efeitos dos peptídeos da LAM-111, AG73, SIKVAV e C16 em mioblastos e nos músculos de camundongos mdx, um modelo murino da DMD.

O AG73 já demonstrou efeito adesivo em mioblastos *in vitro*, em dois sistemas experimentais distintos, utilizando o peptídeo como substrato em placas e partículas esféricas de *sepharose* conjugadas ao fragmento. Esse evento não é observado na versão do AG73 embalhada, no qual os aminoácidos são mantidos com sequência trocada, confirmando assim a especificidade do efeito (HOZUMI e colab., 2012). Nós observamos no presente trabalho esse efeito biológico do AG73, esse mostrou efeito similar ao da LAM-111, que é utilizada como controle positivo em ensaios de adesão. Em nosso ensaio de adesão também foi possível observar alterações morfológicas nas células. Os mioblastos no substrato de LAM-111 apresentam morfologia espalhada, o que não foi observado no AG73 mesmo promovendo a adesão. Em outros estudos utilizando células não musculares, a LAM-111 promove a formação de lamelipódios e grande espalhamento celular, essa característica ocorre por pontos de adesão focal por via integrinas com interação ao substrato. A sinalização via integrina orques-

tra todo o citoesqueleto alterando o formato da célula. O AG73 não promove o espraiamento celular em outros sistemas, apesar de promover a adesão (LIBERIO e colab., 2014; YAMADA e colab., 2011).

Algumas abordagens, em outros estudos, elucidaram o repertório de receptores de membrana que são responsáveis pelo efeito adesivo do peptídeo AG73 em células não musculares. Ao tratar células com heparina, antes do ensaio de adesão com AG73, a atividade adesiva desse é reduzida, sugerindo a participação de receptores de membrana com carga negativa nessa peculiaridade do peptídeo. O tratamento com quelantes de cálcio também reduziu o efeito adesivo do AG73, dessa forma os receptores dependentes de cálcio, como as integrinas, foram apontados como ligantes celulares do AG73. Por método de silenciamento gênico da porção  $\beta 1$  da integrina e o sindecano-1 foi possível demonstrar a participação desses receptores na adesão das células ao AG73 (GAMA-DE-SOUZA e colab., 2008). Por outro lado, o peptídeo C16 mostrou efeito adesivo em células endoteliais, além de promover angiogênese (PONCE e colab., 1999). O peptídeo SIKVAV demonstrou efeito adesivo mediado por integrinas (FREITAS e colab., 2007). Interessantemente, os peptídeos, SIKVAV e C16 não demonstraram efeito adesivo em mioblastos C2C12, talvez pela falta de afinidade com o repertório de receptores de membrana presentes nas células musculares.

No contexto fisiológico de regeneração muscular, a migração celular é importante, uma vez que as células progenitoras musculares se ativam, proliferam e migram aos sítios de dano promovendo o reparo. Em transplantes de mioblastos, esse evento celular também é relevante, pois nessa terapia, essas células devem ter a capacidade migratória alta, a fim de aumentar seu rendimento com mais fibras positivas para distrofina (PARTRIDGE, Terry, 2002). Devido à grande significância desse processo celular, em nosso estudo avaliamos o efeito dos peptídeos oriundos da LAM-111 na migração de mioblastos *in vitro*. No presente estudo a LAM-111 demonstrou efeito positivo na migração de mioblastos C2C12. Esse achado científico já foi relatado com a LAM-111 apresentando um aumento significativo na migração de mioblastos em relação ao controle somente com meio. Entretanto, a isoforma da laminina-211 não demonstrou efeito similar. Sendo assim, a LAM-111 foi apontada como um contribuinte promissor para o transplante de mioblastos (GONZÁLEZ e colab., 2017; GOUDENEGE e colab., 2010; SILVA-BARBOSA e colab., 2008). Sabe-se que o efeito migratório da LAM-111 em mioblastos é independente da via MAPK/ERK e da ação de MMPs, pois a inibição de ambas não comprometeu a migração de células musculares (GONZÁLEZ e colab., 2017).

O peptídeo AG73, em nosso modelo experimental, promoveu a migração como a LAM-111. Esse fragmento é capaz de intervir na migração e invasão de células tumorais aumentando a secreção de MMPs (SIQUEIRA e colab., 2010). Já os demais peptídeos não de-

mostraram efeito na migração de mioblastos no presente estudo. Porém, o peptídeo C16 e o SIKVAV são capazes de aumentar a migração e invasão de outros tipos celulares (CHEN, Xionglin e colab., 2017; KURATOMI e colab., 2002; SIQUEIRA e colab., 2016)

O substrato tratado com AG73, em nosso presente estudo, demonstrou aumentar a diferenciação terminal de mioblastos C2C12, quando comparado com a LAM-111 e os demais peptídeos. Os efeitos biológicos descritos na literatura são causados pela interação do AG73 com células, o sindecano-1 e a integrina- $\beta$ 1 possui grande participação como ligante do peptídeo, estimulando vias celulares (MOCHIZUKI e colab., 2007; SIQUEIRA e colab., 2010; SUZUKI e colab., 2003). Apesar disso, o sindecano não é descrito como pró-miogênico, pois esse estimula fatores da família do TGF- $\beta$  e diminui a expressão de miogenina que afeta a diferenciação de mioblastos (LARRAI e colab., 1998).

Não foi possível reproduzir o efeito da LAM-111 na proliferação de mioblastos a fim de comparar com o efeito dos peptídeos derivados dessa. A LAM-111, em outros estudos, aumentou a proliferação de células musculares que é um evento importante na regeneração muscular e no transplante de mioblastos para tratamento de distrofias. Em células com a taxa proliferativa alta, a alternativa experimental é reduzir o SFB, avaliar o número de células em tempos mais tardios e com técnicas mais acuradas (GOUDENEGE e colab., 2010; SILVA-BARBOSA e colab., 2008).

Em nossos ensaios *in vitro*, os mioblastos foram responsivos ao peptídeo sobre a adesão, migração e diferenciação. Essas características elegem esse peptídeo como possível agente terapêutico para a DMD e outras distrofias. Pode contribuir no melhoramento do transplante de mioblastos e para mais, na melhora do músculo distrófico sendo administrado de forma intramuscular. Comparado com a LAM-111 íntegra administrada, o peptídeo AG73 é menos imunogênico, ponto relevante em terapias (RIEDERER e colab., 2015). Recentemente, um estudo relatou o remodelamento da MEC no nicho de células satélites desencadeado pelo dano muscular que inicia a regeneração. Nesse evento, há um aumento da MMP2 e MMP9 e posteriormente um depósito da cadeia  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 5 no nicho que modulam os progenitores musculares. O peptídeo AG73, presente na cadeia  $\alpha$ 1 da LAM-111, pode ser liberado por ação enzimática e principalmente pela MMP-9 (RAYAGIRI e colab., 2018; SIQUEIRA e colab., 2010). Possivelmente, o peptídeo AG73 está presente durante a regeneração muscular modulando as células satélites e seus nichos. Para mais, o AG73 pode ser utilizado no melhoramento de biomateriais para transplante autólogo muscular em caso de perda muscular volumétrica, devido às suas funções relatadas em nosso estudo. O aprimoramento do biomaterial visa favorecer a regeneração da porção muscular transplantada e diminuir o infiltrado inflamatório. A LAM-111 já foi apontada como componente enriquecedor no biomaterial de hidrogel, sendo

assim, possivelmente o AG73 pode ter efeitos similares nessa estratégia (GOLDMAN e colab., 2018). O peptídeo AG73 pode também contribuir no encapsulamento de fármacos, melhorando a especificidade ao músculo. O encapsulamento do fármaco PMO, terapia gênica da DMD, demonstrou benefícios na diminuição da toxicidade e a eficácia dessa terapia genética. Nesse contexto, o AG73 poderia contribuir ainda mais para a entrega do fármaco no músculo distrófico (NEGISHI e colab., 2011, 2014).

Antecedente as avaliações *in vivo* do efeito do peptídeo SIKVAV e da LAM-111 administrados intramuscularmente, realizamos padronizações de diferentes congelamentos do músculo, sendo que o método mais adequado o com isopentano congelado e goma de traga-canto. O músculo é muito peculiar em sua estrutura e o congelamento deve ser feito com cuidado a fim de evitar artefatos de congelamento. Para um procedimento satisfatório, devem-se considerar dois fatores: a temperatura e a rapidez. Outro componente geralmente não considerado é o líquido presente nas amostras. Quando o congelamento não é realizado de forma correta, há a formação de cristais intracelulares que comprometem a morfologia, resultando no “efeito queijo suíço”. Em contrapartida, feito de forma correta, o tecido é congelado de forma uniforme e rápida tornando-se vitrificado (KUMAR e colab., 2015; MENG e colab., 2014)

O modelo murino da DMD, o camundongo mdx, apresenta um fenótipo mais brando comparado ao paciente distrófico (PARTRIDGE, Terence A, 2013). Ao estudar a doença ou propor novas terapias utilizando-o, deve-se considerar esses interferentes experimentais. O dano induzido em camundongos mdx deixa o fenótipo mais fidedigno exacerbando a patologia. Temos disponíveis: danos por isquemia, danos físicos e danos por toxinas, sendo que cada um apresenta uma ação e gravidade distinta. A CTX é uma toxina e compromete os canais de cálcio rompendo o sarcolema, porém sem afetar o nicho de células satélites (MAHDY, 2018). Já foi demonstrado o aumento do infiltrado inflamatório e da degeneração no quarto dia após com a CTX. No sétimo dia, o caráter histológico é de menor inflamação e mais regeneração (MAHDY e colab., 2015). Em nossa abordagem, a CTX mostrou eficácia na exacerbação do fenótipo do camundongo mdx para avaliação da nossa terapia.

No nosso trabalho foi observada uma diminuição da população de linfócitos no tecido muscular com tratamento preventivo mediante ao dano induzido por CTX. Os linfócitos participam de forma importante na lesão inflamatória da DMD. Através do cruzamento de mdx com camundongos *nude*, atímicos e conseqüentemente sem células T, apontou os linfócitos T como grandes contribuintes para a fibrose no músculo e em outros órgãos. Em contrapartida, uma subpopulação de linfócitos T, as células  $\gamma\delta$ , tem um papel imunomodulador protetor no tecido cardíaco de camundongos mdx. A depleção dessas, recruta ainda mais outros tipos de

células patogênicas, agravando o quadro cardíaco (CASCABULHO e colab., 2016; MORRISON e colab., 2000).

Os macrófagos foram pouco alterados com o tratamento sem CTX, tendo apenas uma tendência à diminuição. Esses são de grande importância para DMD e podem ter fenótipos distintos em sua polarização. Os macrófagos M1 estão presentes na fase mais inicial da doença e têm um perfil mais inflamatório. O outro perfil é o M2, com características mais pró-reparo e de resolução da inflamação. Sabe-se que intervenções que aumentam os M2 melhoram o fenótipo da doença. De qualquer forma, a diminuição do infiltrado é benéfica à doença independentemente do seu perfil (VILLALTA e colab., 2011).

No presente estudo, o tratamento intramuscular de LAM-111 preveniu a fibrose do décimo dia após a CTX. Porém esse evento não foi observado com o tratamento com o peptídeo SIKVAV. Considerando que a fibrose é um evento muito presente na DMD, estratégias terapêuticas que visam atenuá-la são importantes. Um grande contribuinte para fibrose é o TGF- $\beta$ , portanto, inibidores de TGF- $\beta$  possuem efeitos relevantes. Curiosamente, os inibidores de enzima conversora de angiotensinogênio diminuem a fibrose e são promissores para o tratamento (KORNEGAY e colab., 2014). A redução da população de linfócitos com o tratamento pode estar relacionada com a diminuição da fibrose no décimo dia, pois esse tipo celular já foi apontado como pró-fibrótico na DMD (MORRISON e colab., 2000). Portanto, a ação antifibrótica da LAM-111 fomenta seus efeitos benéficos em DMD.

Das citocinas avaliadas, a IL-6 mostrou um aumento com o tratamento da LAM-111. Essa citocina possui caráter pleiotrópico com funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. No cenário muscular, essa pode tanto promover, paradoxalmente, a hipertrofia e a regeneração ou a persistência inflamatória e a atrofia das fibras (MUÑOZ-CÁNOVES e colab., 2013). Injeções de IL-6 nos músculos de neonatos mdx mostra um aumento da expressão gênica e proteica da utrofina, proteína capaz de repor funcionalmente a distrofina (FUJIMORI e colab., 2002). Além disso, a neutralização do receptor da IL-6 em camundongos mdx mostrou aumento do infiltrado inflamatório (KOSTEK e colab., 2012). Portanto, o aumento da IL-6 com o tratamento preventivo de LAM-111 pode estar relacionado ao seu efeito protetor contra o dano induzido pela CTX.

O tratamento com a LAM-111 foi capaz de reduzir o número de fibras recém-regeneradas no 4 dia após a CTX. O que sugere um efeito protetor contra o dano induzido da CTX ao sarcolema, no qual resultou em menos regeneração muscular. Esse evento não foi observado no tratamento com o peptídeo SIKVAV. A proteção do sarcolema pelo o tratamento com a LAM-111 ocorre possivelmente devido ao aumento de proteínas de adesão compensatórias, utrofina e integrina  $\alpha 7\beta 1$ . Ambas são associadas à melhora do fenótipo e aumentam a

estabilidade do sarcolema. Em outro estudo com uma abordagem similar, os camundongos mdx foram tratados de forma intramuscular com LAM-111 e na pata contralateral PBS sendo expostos ao dano induzido por exercício excêntrico. Os músculos tratados com LAM-111 apresentaram maior estabilidade do sarcolema com diminuição drástica do dano (ROONEY e GURPUR e BURKIN, 2009).

Em outros modelos experimentais de distrofias, o tratamento com LAM-111 já foi proposto. Na distrofia muscular de merosina congênita, no qual ocorre o comprometimento da laminina-211 que resulta em comprometimento da função muscular. O tratamento intramuscular com LAM-111 previne a degeneração muscular e promove a hipertrofia, além de melhorar a sobrevivência dos animais (ROONEY e colab., 2012). Com a distrofia que afeta a expressão da integrina  $\alpha 7$ , o tratamento com LAM-111 melhorou a capacidade regeneração comprometida do modelo animal dessa doença (ROONEY e GURPUR e YABLONKA-REUVENI e colab., 2009).

O peptídeo SIKVAV foi eleito para nossas avaliações *in vivo* devido seus efeitos em outros sistemas biológicos, como promoção da angiogênese e revascularização, aumento da malignidade de tumores e melhoramento da cicatrização (CHEN, Xionglin e colab., 2017; FREITAS e colab., 2007; GRANT e ZUKOWSKA, 2000). Porém, no contexto do músculo distrófico não observamos efeitos terapêuticos desse peptídeo. Em contrapartida, nossas abordagens *in vitro* e *in vivo* reforçaram o papel da LAM-111 na fisiologia muscular e seu efeito terapêutico em distrofias. Ela pode ser administrada como componente farmacológico ou co-administrada no transplante celular promovendo a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células transplantadas. Em ambas abordagens, devemos considerar a resposta imune contra a LAM-111 administrada e a produção dessa a fim de tratar pacientes (RIEDERER e colab., 2015).

## 6 CONCLUSÃO

Nesse presente estudo, investigamos o efeito de peptídeos biologicamente ativos derivados da LAM-111 no contexto do ambiente muscular, *in vivo e in vitro*.

Em nossas hipóteses iniciais, elegemos a partir da literatura três peptídeos com grande relevância biológica com predominância em neoplasias. Em mioblastos esses se comportam de maneira diferente, o AG73 afetou a migração e a adesão de forma equivalente a LAM-111. Tratando-se da diferenciação de células musculares, o AG73 aumentou a hipertrofia dos mio-tubos, efeito distinto da molécula íntegra.

Mesmo com efeitos diversos como o aumento da migração, adesão e proliferação em células tumorais, os peptídeos SIKVAV e C16 não modularam esses eventos em células musculares. Assim, é evidente que não podemos correlacionar achados em neoplasias com o tecido muscular e miogênese. Em nossas avaliações *in vivo*, confirmamos o efeito terapêutico da LAM-111 no modelo animal da DMD, diminuição do infiltrado de células T, da fibrose e do dano induzido pela CTX. O peptídeo SIKVAV apenas diminuiu o infiltrado de linfócitos não apresentando efeitos significativos a fim de eleger-lo como agente terapêutico.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, Bruce e colab. **Biologia molecular da célula**. Biologia Molecular da Celula, p. 1269–1602, 2008. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Biologia+Molecular+da+Célula#5>>.
- ANGELINI, Corrado e PETERLE, Enrico. **Old and new therapeutic developments in steroid treatment in Duchenne muscular dystrophy**. n. 13, p. 9–15, 2012.
- ARAÚJO, Alexandra P.Q.C. e colab. **Consenso brasileiro sobre distrofia muscular de duchenne. Parte 1 diagnóstico, corticoterapia e perspectivas**. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 75, n. 8, p. 589–599, 2017.
- AUMAILLEY, Monique. **The laminin family**. Cell Adhesion and Migration, v. 7, n. 1, p. 48–55, 2013.
- BANI, Cristiane e LAGROTA-CANDIDO, Jussara. **PATTERN OF METALLOPROTEASE ACTIVITY AND MYOFIBER REGENERATION IN SKELETAL MUSCLES OF mdx MICE**. n. May, p. 583–592, 2008.
- BLAKE, Derek J e colab. **Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle**. Physiological reviews, v. 82, n. 2, p. 291–329, 2002.
- BLAT, Yuval e BLAT, Shachar. **Drug discovery of therapies for duchenne muscular dystrophy**. Journal of Biomolecular Screening. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1087057115586535>>. , Dez 2015
- BRESALIER, Robert S e colab. **The laminin alpha 1 chain Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV)-containing peptide promotes liver colonization by human colon cancer cells**. Cancer research, v. 55, n. 11, p. 2476–80, 1 Jun 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758002>>.
- BRIGUET, Alexandre e colab. **Effect of calpain and proteasome inhibition on Ca<sup>2+</sup> - dependent proteolysis and muscle histopathology in the mdx mouse**. n. February, 2015.
- BULFIELD, G e colab. **X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 81, n. 4, p. 1189–1192, 1984.
- BUSHBY, Katharine e colab. **Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management**. The Lancet Neurology, v. 9, n. 1, p. 77–93, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6)>.
- CASCABULHO, Cynthia M. e colab. **Chemotaxis and Immunoregulatory Function of Cardiac  $\gamma\delta$  T Cells in Dystrophin-Deficient Mice**. The Journal of Immunology, p. 1600335, 2016. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/early/2016/10/06/jimmunol.1600335>%5Cn<http://www.jimmunol.org/content/early/2016/10/06/jimmunol.1600335.short>%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27707996>>.
- CASCABULHO, Cynthia M. e colab. **Defective T-lymphocyte migration to muscles in dystrophin-deficient mice**. American Journal of Pathology, v. 181, n. 2, p. 593–604, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.023>>.

- CHEN, Xiaoping e LI, Yong. **Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle**. n. December, p. 337–341, 2009.
- CHEN, Xionglin e colab. **Peptide-Modified Chitosan Hydrogels Accelerate Skin Wound Healing by Promoting Fibroblast Proliferation, Migration, and Secretion**. *Cell Transplantation*, v. 26, n. 8, p. 1331–1340, 2017.
- CRISPI, Vassili e MATSAKAS, Antonios. **Duchenne muscular dystrophy: genome editing gives new hope for treatment**. *Postgraduate Medical Journal*, p. postgradmedj-2017-135377, 2018. Disponível em: <<http://pmj.bmj.com/lookup/doi/10.1136/postgradmedj-2017-135377>>.
- DEARDON, Rob e colab. **Inference for individual-level models of infectious diseases in large populations**. *Statistica Sinica*, v. 20, n. 4, p. 239–261, 2010.
- DECARY, S. e colab. **Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children**. *Neuromuscular Disorders*, v. 10, n. 2, p. 113–120, 2000.
- DECONINCK, Nicolas e DAN, Bernard. **Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy : Current Hypotheses**. 2007.
- DOMOGATSKAYA, Anna e RODIN, Sergey e TRYGGVASON, Karl. **Functional Diversity of Laminins**. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 28, n. 1, p. 523–553, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101011-155750>>.
- DUNCAN, C. J. **Dystrophin and the integrity of the sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy**. *Experientia*, v. 45, n. 2, p. 175–177, 1989.
- DURBEEJ, Madeleine. **Laminins**. *Cell and Tissue Research*, v. 339, n. 1, p. 259–268, 2010.
- DURBEEJ, Madeleine e CAMPBELL, Kevin P. **Muscular dystrophies involving the dystrophin–glycoprotein complex: an overview of current mouse models**. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 12, n. 3, p. 349–361, Jun 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X0200309X>>.
- EMERY. **The muscular dystrophies**. *Bailliere’s clinical neurology*, v. 3, n. 2, p. 407–430, 1994.
- ENGEL, Jürgen e colab. **Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix**. *Journal of Molecular Biology*, v. 150, n. 1, p. 97–120, 1981.
- ENNEN, James P. e VERMA, Mayank e ASAKURA, Atsushi. **Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy**. *Skeletal Muscle*, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2013.
- FAIRCLOUGH, Rebecca J. e WOOD, Matthew J. e DAVIES, Kay E. **Therapy for Duchenne muscular dystrophy: Renewed optimism from genetic approaches**. *Nature Reviews Genetics*, v. 14, n. 6, p. 373–378, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3460>>.
- FLANIGAN, Kevin M. **The Muscular Dystrophies**. 2012.
- FRANTZ, C. e STEWART, K. M. e WEAVER, V. M. **The extracellular matrix at a glance**. *Journal of Cell Science*, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.023820>>.

- FREITAS, Vanessa M. e colab. **SIKVAV, a Laminin  $\alpha$ 1-Derived Peptide, Interacts with Integrins and Increases Protease Activity of a Human Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma Cell Line through the ERK 1/2 Signaling Pathway.** *The American Journal of Pathology*, v. 171, n. 1, p. 124–138, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010619499>>.
- FUJIMORI, Keita e colab. **Interleukin 6 induces overexpression of the sarcolemmal utrophin in neonatal mdx skeletal muscle.** *Human gene therapy*, v. 13, n. 4, p. 509–18, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874629>>.
- GAMA-DE-SOUZA, Letícia N. e colab. **Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and  $\beta$ 1 integrin.** *Matrix Biology*, v. 27, n. 5, p. 402–419, 2008.
- GARRY, Glynnis A e ANTONY, Marie Lue e GARRY, Daniel J. **Skeletal Muscle Regeneration in the Mouse.** v. 1460, p. 61–71, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3810-0>>.
- GILLIES, Allison R. e LIEBER, Richard L. **Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix.** *Muscle nerve*, v. 44, n. 3, p. 318–331, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mus.22094>>.
- GOLDMAN, Stephen M e colab. **Co-delivery of a laminin-111 supplemented hyaluronic acid based hydrogel with minced muscle graft in the treatment of volumetric muscle loss injury.** *PLoS ONE*, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2018.
- GONZÁLEZ, Mariela Natacha e colab. **HGF potentiates extracellular matrix-driven migration of human myoblasts: Involvement of matrix metalloproteinases and MAPK/ERK pathway.** *Skeletal Muscle*, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- GOUDENEGE, Sébastien e colab. **Laminin-111: a potential therapeutic agent for Duchenne muscular dystrophy.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 18, n. 12, p. 2155–63, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/mt.2010.165>>.
- GRANT, D. S. e colab. **The Role of Basement Membrane in Angiogenesis and Tumor Growth.** *Pathology Research and Practice*, v. 190, n. 9–10, p. 854–863, 1994.
- GRANT, D S e ZUKOWSKA, Z. **Revascularization of ischemic tissues with SIKVAV and neuropeptide Y (NPY).** *Advances in experimental medicine and biology*, 2000.
- GUIRAUD, Simon e DAVIES, Kay E. **Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 34, p. 36–48, Jun 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2017.04.002>>.
- HALL, John E. e GUYTON, Arthur C. **Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica.** *Physiology*, 2011.
- HOREJS, C.-M. e colab. **Biologically-active laminin-111 fragment that modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in embryonic stem cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 16, p. 5908–5913, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1403139111>>.
- HOZUMI, Kentaro e colab. **Identification of cell adhesive sequences in the N-terminal region of the laminin  $\alpha$ 2 chain.** *The Journal of biological chemistry*, v. 287, n. 30, p. 25111–

22, 20 Jul 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22654118>>.

KARALAKI, Maria e colab. **Muscle regeneration: cellular and molecular events**. In vivo (Athens, Greece), v. 23, n. 5, p. 779–96, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779115>>.

KHARRAZ, Yacine e colab. **Understanding the process of fibrosis in duchenne muscular dystrophy**. BioMed Research International, v. 2014, 2014.

KHURANA, Tejvir S e DAVIES, Kay E. **Pharmacological strategies for muscular dystrophy**. Nature Reviews Drug Discovery. [S.l: s.n.], 2003

KIKKAWA, Yamato e colab. **Laminin-111-derived peptides and cancer**. Cell adhesion & migration, v. 7, n. 1, p. 150–256, 27 Jan 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.22827>>.

KLINGLER, Werner e colab. **The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy**. Acta Myologica, v. 31, n. 3, p. 184–195, 2012.

KORNEGAY, Joe N. e colab. **Pharmacologic management of duchenne muscular dystrophy: Target identification and preclinical trials**. ILAR Journal, v. 55, n. 1, p. 119–149, 2014.

KOSTEK, Matthew C e colab. **IL-6 signaling blockade increases inflammation but does not affect muscle function in the mdx mouse**. BMC Musculoskeletal Disorders, v. 13, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <BMC Musculoskeletal Disorders>.

KUMAR, Ajay e colab. **Do's and Don'ts in the Preparation of Muscle Cryosections for Histological Analysis**. Journal of Visualized Experiments, n. 99, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/52793/do-s-don-ts-preparation-muscle-cryosections-for-histological>>.

KURATOMI, Y e colab. **Laminin gamma 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells**. British journal of cancer, v. 86, n. 7, p. 1169–1173, 2002.

LARRAI, Juan e CAREY, David J e BRANDAN, Enrique. **Syndecan-1 Expression Inhibits Myoblast Differentiation through a Basic Fibroblast Growth Factor-dependent Mechanism** \*. v. 273, n. 48, p. 32288–32296, 1998.

LEE, Ariff Bongso and Eng Hin. **Cancer Stem Cells: From Bench to Bedside**. Biology of Blood and Marrow Transplantation, v. 13, n. SUPPL. 1, p. 47–52, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167509>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1858645>><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879106007130>>.

LIANG, Wen-chen e colab. **ScienceDirect The natural history of the patients with Duchenne muscular dystrophy in Taiwan : A medical center experience**. Pediatrics and Neonatology, v. 59, n. 2, p. 176–183, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.02.004>>.

LIBERIO, Michelle S e colab. **Differential effects of tissue culture coating substrates on prostate cancer cell adherence, morphology and behavior**. PLoS ONE, v. 9, n. 11, 2014.

LIN SHIAU, S. Y. e colab. **Mechanism of action of cobra cardiotoxin**. Toxicon, v. 14, n. 6, p. 418–419, 1976. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1263122>>.

- LUGASSY, C. e colab. **C16 laminin peptide increases angiotropic extravascular migration of human melanoma cells in a shell-less chick chorioallantoic membrane assay**. *British Journal of Dermatology*, v. 157, n. 4, p. 780–782, 2007.
- MAH, Jean K. **Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy**. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. [S.l: s.n.], 2016
- MAHDY, Mohamed A.A. e colab. **Comparative study of muscle regeneration following cardiotoxin and glycerol injury**. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, v. 202, p. 18–27, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2015.07.002>>.
- MAHDY, Mohamed A A. **Glycerol-induced injury as a new model of muscle regeneration**. *Cell and Tissue Research*, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29754258>%0Ahttp://link.springer.com/10.1007/s00441-018-2846-6>.
- MAURO, Alexander. **Satellite cell of skeletal muscle fibers**. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, v. 9, p. 493–495, 1961.
- MENG, Hui e colab. **Tissue Triage and Freezing for Models of Skeletal Muscle Disease**. *Journal of Visualized Experiments*, n. 89, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/51586/tissue-triage-and-freezing-for-models-of-skeletal-muscle-disease>>.
- MIYAGOE-SUZUKI, Yuko e TAKEDA, Shin'ichi. **Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem cells - induction and application**. *World journal of stem cells*, v. 9, n. 6, p. 89–97, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28717411>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5491631>.
- MIYATAKE, Shouta e colab. **Anti-inflammatory drugs for duchenne muscular dystrophy: Focus on skeletal muscle-releasing factors**. *Drug Design, Development and Therapy*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/anti-inflammatory-drugs-for-duchenne-muscular-dystrophy-focus-on-skele-peer-reviewed-article-DDDT>>. , Ago 2016
- MOCHIZUKI, Mayumi e colab. **Angiogenic activity of syndecan-binding laminin peptide AG73 (RKRLQVQLSIRT)**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 459, n. 2, p. 249–255, 2007.
- MORRISON, J e colab. **T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse**. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 80, n. 6, p. 881–891, 2000.
- MUÑOZ-CÁNOVES, Pura e colab. **Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword?** *FEBS Journal*. [S.l: s.n.], 2013
- NEGISHI, Yoichi e colab. **Bubble liposomes and ultrasound exposure improve localized morpholino oligomer delivery into the skeletal muscles of dystrophic mdx mice**. *Molecular Pharmaceutics*, v. 11, n. 3, p. 1053–1061, 2014.
- NEGISHI, Yoichi e colab. **Effects of doxorubicin-encapsulating AG73 peptide-modified liposomes on tumor selectivity and cytotoxicity**. *Results in Pharma Sciences*, v. 1, n. 1, p. 68–75, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rinphs.2011.10.001>>.
- NEGISHI, Yoichi e colab. **Preparation and characterization of laminin-derived peptide**

**AG73-coated liposomes as a selective gene delivery tool.** Biological & pharmaceutical bulletin, v. 33, n. 10, p. 1766–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20930391>>.

PARTRIDGE, T. A. e colab. **Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts.** Nature. [S.l: s.n.], 1989

PARTRIDGE, Terence A. **The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy.** v. 280, p. 4177–4186, 2013.

PARTRIDGE, Terry. **Myoblast transplantation.** Neuromuscular Disorders, v. 12, n. SUPPL., p. S3–S6, Out 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896602000767>>.

PONCE, M L e colab. **Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain.** Circulation research, v. 84, n. 6, p. 688–94, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10189356>>.

PRUFER DE QUEIROZ, Alexandra e colab. **Diagnosis delay of Duchenne Muscular Dystrophy Demora no diagnóstico da Distrofia Muscular de Duchenne.** Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife, v. 4, n. 2, p. 179–183, 2004.

RAHIMOV, Fedik e KUNKEL, Louis M. **Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy.** Journal of Cell Biology, v. 201, n. 4, p. 499–510, 2013.

RAYAGIRI, Shantisree Sandeepani e colab. **Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal.** Nature communications, n. 2018, p. 1–12, 2018.

RENAULT, V. e colab. **Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock.** Experimental Gerontology, v. 35, n. 6–7, p. 711–719, 2000.

RIEDERER, Ingo e colab. **Laminin therapy for the promotion of muscle regeneration.** FEBS Letters, v. 589, n. 22, p. 3449–3453, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.004>>.

ROONEY, Jachinta E e colab. **Laminin-111 Protein Therapy Reduces Muscle Pathology and Improves Viability of a Mouse Model of Merosin-Deficient Congenital Muscular Dystrophy.** AJPA, v. 180, n. 4, p. 1593–1602, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.12.019>>.

ROONEY, Jachinta E e GURPUR, Praveen B e YABLONKA-REUVENI, Zipora e colab. **Laminin-111 restores regenerative capacity in a mouse model for alpha7 integrin congenital myopathy.** The American journal of pathology, v. 174, n. 1, p. 256–264, 2009.

ROONEY, Jachinta E e GURPUR, Praveen B e BURKIN, Dean J. **Correction for Win and Smolke, A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 36, p. 15514–15514, 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0908785106>>.

RYDER, S. e colab. **The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: An evidence review.** Orphanet Journal of Rare Diseases, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2017.

SCHENK, Susann e QUARANTA, Vito. **Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix.** Trends in Cell Biology. [S.l: s.n.], 2003

- SCHIAFFINO, Stefano. **Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies.** FEBS Journal, n. Vimm, p. 1–7, 2018.
- SETO, Jane T. e BENGTTSSON, Niclas E. e CHAMBERLAIN, Jeffrey S. **Therapy of Genetic Disorders: Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy.** Current Pediatrics Reports, v. 2, n. 2, p. 102–112, 11 Jun 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40124-014-0044-x>>.
- SHARMA, Alok e colab. **A clinical study shows safety and efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy to improve quality of life in muscular dystrophy patients.** Cell Transplantation, v. 22, n. SUPPL.1, p. 127–138, 2013.
- SIENKIEWICZ, Dorota e colab. **Duchenne muscular dystrophy: current cell therapies.** Therapeutic Advances in Neurological Disorders, v. 8, n. 4, p. 166–177, 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756285615586123>>.
- SILVA-BARBOSA, Suse D. e colab. **Human myoblast engraftment is improved in laminin-enriched microenvironment.** Transplantation, v. 85, n. 4, p. 566–575, 2008.
- SIQUEIRA, Adriane S. e colab. **Laminin-111 peptide C16 regulates invadopodia activity of malignant cells through  $\beta 1$  integrin, Src and ERK 1/2.** Oncotarget, v. 7, n. 30, p. 47904–47917, 2016.
- SIQUEIRA, Adriane S. e colab. **Laminin-derived peptide AG73 regulates migration, invasion, and protease activity of human oral squamous cell carcinoma cells through syndecan-1 and  $\beta 1$  integrin.** Tumor Biology, v. 31, n. 1, p. 46–58, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-009-0008-x>>.
- STRAUB, Volker e colab. **Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption.** Journal of Cell Biology, v. 139, n. 2, p. 375–385, 1997.
- SUZUKI, Nobuharu e colab. **Syndecan Binding Sites in the Laminin  $\alpha 1$  Chain G Domain.** Biochemistry, v. 42, n. 43, p. 12625–12633, 2003.
- TEDESCO, Francesco Saverio e colab. **Review series Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells.** Journal of Clinical Investigation, v. 120, n. 1, p. 11–19, 2010.
- THOMAS, Kelsey e ENGLER, Adam J e MEYER, Gretchen A. **Extracellular Matrix Regulation in the Muscle.** Connect Tissue Res, v. 56, n. 1, p. 1–8, 2015.
- TIDBALL, J. G. e DORSHKIND, K. e WEHLING-HENRICKS, M. **Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration.** Development, v. 141, n. 6, p. 1184–1196, 2014. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.098285>>.
- TIMPL, R e colab. **Laminin--a glycoprotein from basement membranes.** The Journal of biological chemistry, v. 254, n. 19, p. 9933–9937, 1979.
- VILLALTA, S. Armando e colab. **Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype.** Human Molecular Genetics, v. 20, n. 4, p. 790–805, 2011.
- VILLALTA, S. Armando e colab. **Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy.** Human Molecular Genetics, v. 18, n. 3, p. 482–496, 2009.

VILLALTA, S Armando e ROSENBERG, Amy S e BLUESTONE, Jeffrey A. **The immune system in Duchenne muscular dystrophy: Friend or foe.** Rare Diseases, v. 3, n. 1, p. e1010966, 2015. Disponível em:  
<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21675511.2015.1010966>>.

WHITEHEAD, Nicholas P. e YEUNG, Ella W. e ALLEN, David G. **Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: Role of calcium and reactive oxygen species.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 33, n. 7, p. 657–662, 2006.

YAMADA, Yuji e colab. **Biomaterials Cell behavior on protein matrices containing laminin a 1 peptide AG73.** Biomaterials, v. 32, n. 19, p. 4327–4335, 2011. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.052>>.