

**ALINNE DO CARMO COSTA**

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INDUZIDAS PELA MOLÉCULA  
ORIENTADORA  $\alpha$  (RGM $\alpha$ ) SOLÚVEL DURANTE A MIOGÊNESE *IN VITRO***

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Julho/2018

**ALINNE DO CARMO COSTA**

**AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INDUZIDAS PELA MOLÉCULA  
ORIENTADORA  $\alpha$  (RGM $\alpha$ ) SOLÚVEL DURANTE A MIOGÊNESE *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Profa. Dra. Erika Cristina Jorge

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Julho/2018

043 Costa, Alinne do Carmo.  
Avaliação das vias de sinalização induzidas pela molécula orientadora a (RGMa) solúvel durante a miogênese *in vitro* [manuscrito] / Alinne do Carmo Costa. – 2019.

74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Erika Cristina Jorge.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Mioblastos. 3. Desenvolvimento Muscular. 4. Hiperplasia. I. Jorge, Erika Cristina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**  
**ALINNE DO CARMO COSTA**

306/2018  
entrada  
2º/2016  
2016713490

Às nove horas do dia 25 de julho de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INDUZIDAS PELA MOLÉCULA ORIENTADORA A (RGMA) DURANTE A MIOGENESE IN VITRO", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Erika Cristina Jorge**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADA
Dra. Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG/ICB	Aprovada
Dr. Vinícius Ribas	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 25 de julho de 2018.**

Dra. Erika Cristina Jorge (Orientadora)

Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

Dr. Vinícius Ribas

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação  
em Biologia Celular ICB/UFMG

## DEDICATÓRIA

*"If I have seen further, it is by standing upon the shoulders of giants". Isaac Newton*  
*Aos meus amores, especialmente minha mãe e avó (In memoriam), e todos aqueles que foram luz em meu caminho!*

## AGRADECIMENTOS

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” Arthur Schopenhauer*

*Agradeço a Profa. Dra. Erika Cristina Jorge minha querida orientadora desde 2013, que generosamente dedicou seu tempo e compartilhou tantos conhecimentos comigo. Eu não teria tido formação melhor, se tivesse feito outra escolha. Serei eternamente grata pelo aprendizado, pela confiança, pelas oportunidades profissionais e pela amizade ao longo desses anos!*

*À Profa. Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva co-orientadora de coração, com quem eu aprendi tantas coisas, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Serei sempre grata por ter convivido com você.*

*Ao Francisco de Assis, cuja ajuda e amizade foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.*

*Aos demais membros do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, pela convivência e auxílio. E por me estimularem a ser uma profissional melhor, seja direta ou indiretamente. Agradeço aos amigos que fiz no laboratório, e que tornaram os meus dias melhores: Bruno, Sarah, Juliano e Luiza.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, pelos conhecimentos transmitidos e por muitas vezes abrirem as portas de seus laboratórios para nós, em especial a Profa. Dra. Luciana Oliveira Andrade, Prof. Dr. Gregory T. Kitten, e a Profa. Dra. Vanessa Pinho. À Profa. Dra. Denise Cara Carmona pela orientação durante o estágio didático.*

*Aos colegas e amigos, também estudantes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular agradeço a companhia e auxílio ao longo dos anos.*

*À todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular-UFMG, é com muito orgulho que digo que faço parte desse programa!*

*Aos Professores membros da banca, Prof. Dr. Vinicuis de Toledo Ribas e a querida Profa. Dra. Cristina Guatimosim e à Dra. Priscila Aparecida Costa Valadão por aceitarem o meu convite, e cujas contribuições serão valiosas para o trabalho!*

*Às agências financiadoras, CNPq, FAPEMIG e Capes pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho e meu consequente desenvolvimento profissional.*

*Dedico minha dissertação à Deus, recorrer ao senhor seja nos momentos de dor ou agradecimento, foi sempre o pilar para minha caminhada. Obrigada Senhor por tudo que vêm me proporcionando! “Eu me lembro dos dias em que orei por coisas que tenho hoje.”*

*À minha família, pelo apoio e amor incondicional! À minha amada mãe por sempre acreditar no meu potencial mesmo quando eu mesma duvidei, seu apoio é o que me move! À minha Vó Maria do Carmo (In memoriam) cujo infinito amor e sabedoria me guiam em toda caminhada. Ao meu Tio Geraldo pelo carinho e dedicação.*

*Aos amigos que a vida me deu, que sempre se fazem presente, pelo carinho, apoio e pelas alegrias e sonhos compartilhados.*

*Finalmente a todos aqueles que contribuíram para que eu chegasse até aqui o meu muito obrigada!*

*Os resultados dessa dissertação são o que de físico, foi gerado de um sonho!*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural protéica das RGMs .....	16
Figura 2. Desenho esquemático das possíveis modificações pós-traducionais descritas para a proteína RGMa .....	16
Figura 3. Representação estrutural do receptor Neogenina .....	18
Figura 4. Vias de sinalização intracelulares associadas à RGMa.....	20
Figura 5. Desenho esquemático relacionando RGMa com a via de sinalização BMP.....	21
Figura 6. Representação da formação do complexo Neogenina-RGMs-BMP durante a ossificação endocondral.....	22
Figura 7. Expressão de RGMa e RGMb durante o desenvolvimento, manutenção e crescimento da musculatura estriada esquelética.....	23
Figura 8. Padrão de expressão das RGMs na musculatura esquelética adulta.....	24
Figura 9. Efeitos fenóticos da Superexpressão e <i>knockdown</i> de RGMa em células musculares esqueléticas.....	25
Figura 10. Esquema ilustrativo da sinalização envolvendo Fatores regulatórios miogênicos durante a embriogênese.....	27
Figura 11. Esquema representando etapas e fatores necessários para a diferenciação muscular esquelética.....	29
Figura 12. Ilustração do processo de fusão de mioblastos.....	30
Figura 13. Vias de sinalização que induzem a polimerização de actina durante a miogênese...	31
Figura 14. Desenho experimental do estabelecimento da dose ideal de rcRGMa a ser usada em mioblastos da linhagem C2C12.....	34

Figura 15. Efeitos de rcRGMa na fase tardia de diferenciação miogênica <i>in vitro</i> .....	46
Figura 16. Efeitos do tratamento com rcRGMa na expressão relativa de genes associados à diferenciação miogênica tardia.....	47
Figura 17. Efeitos de rcRGMa na fase inicial de diferenciação miogênica <i>in vitro</i> .....	48
Figura 18. Efeitos do tratamento com rcRGMa na expressão relativa de genes associados à fase inicial de diferenciação miogênica.....	49
Figura 19. Caracterização dos efeitos do tratamento com o bloqueador da sinalização BMP (Dorsomorfina) de células C2C12 por imunocitoquímica e <i>western Blot</i> .....	50
Figura 20. Análise dos efeitos do tratamento com dorsomorfina associado ou não à rcRGMa durante a diferenciação tardia de células C2C12 .....	52
Figura 21. Confirmação da super-expressão de Neogenina em células C2C12 por RT-PCRq....	53
Figura 22. Análise dos efeitos da super-expressão de Neogenina, associada ao tratamento com rcRGMa, durante a diferenciação das células C2C12 .....	54
Figura 23. Análise do perfil de expressão gênica relativa do tratamento com rcRGMa associado a super-expressão de Neogenina, durante a diferenciação miogênica.....	56
Figura 24. Análise dos efeitos do tratamento com rcRGMa por 1, 3 e 5 dias sobre a viabilidade das células C2C12.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características dos oligonucleotídeos obtidos para genes referência e alvos utilizados nas análises de expressão gênica.....42

Tabela 2. Representação dos resultados de expressão gênica relativa da associação de rcRGMa e seu receptor neogenina em células musculares esqueléticas.....57

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius

Abs: Absorbância

ActR: receptor Activina

ADAM: Disintegrina e Metaloprotease

ALK: Quinase semelhante ao Receptor Activina

ATP: Adenosiltrifosfato

BMP: Proteína Morfogenética Óssea

BMPR: Receptor para BMP

BSA: Albumina do Soro Bovino

C2C12: Linhagem de Mioblastos Imortalizados de Camundongos

CDO: Molécula Relacionada à Adesão Celular Subregulada por Oncogenes

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

DAB: Diaminobenzidino

DEPC: dietilpirocarbonato

DM: Dorsomorfina

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dragon: RGMb

EDTA: Ácido Tetraacético Etilenediamina 8

ERK: Quinase Regulada por Sinal Extracelular

FAK: Quinase de Adesão Focal

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

IL: Interleucina

kDa: quilodalton

LARG: Fator de Troca de Nucleotídeo Guanina Associado à Leucemia

MAPK: Proteína Quinase Mitógeno Ativada

MC: meio de crescimento

MD: meio de diferenciação

MF20: Miosina de Cadeia Pesada

Min: Minutos

MJ: meio de jejum

mL: mililitro

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NaCl: Cloreto de Sódio

NCAM: Molécula de Adesão da Célula Neural

ng: nanogramas

PAX: *Paired Box*

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: Expressão relativa da Reação em Cadeia da Polimerase

rcRGMa: proteína recombinante RGMa

RGD: Arginina-Glicina-Ácido Aspártico

RGM: moléculas de orientação por repulsão

RNA: Ácido Ribonucléico

ROCK: Rho Quinase

Rpm: rotações por minuto

RT-PCR: Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase

SDS: dodecilsulfato sódico

Shh: *Sonic Hedgehog*

siRNA: Ácido Ribonucléico de interferência

TA: temperatura ambiente

Ta: temperatura de anelamento

TGF- $\beta$ : Fator de Crescimento Transformador  $\beta$

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

$\mu$ M: micromolar

UNC5B: *Uncoordinated locomotion-5B*

WRC: complexo regulador de ondas

$\mu$ g: micrograma

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ m: Micrômetros

M $\beta$ CD: metil-beta-ciclodextrina

## RESUMO

RGMa é um dos membros da família de moléculas orientadoras repulsivas (RGM), que foram inicialmente descobertas atuando como pistas para migração de axônios em formação. Novos estudos vêm apontando uma maior abrangência das funções de RGMa, incluindo durante a miogênese. Trabalhos anteriores revelaram que a super-expressão de RGMa é capaz de induzir hipertrofia e hiperplasia de células musculares esqueléticas *in vitro*. Mas os mecanismos moleculares utilizados por RGMa para induzir estes efeitos importantes nas células musculares não foram elucidados. Em outros tipos celulares, RGMa foi descrito sinalizando via o receptor Neogenina ou como co-receptor da sinalização BMP; ambos isoladamente associados à fenótipos musculares similares aos observados para a super-expressão de RGMa. Neste trabalho, RGMa administrado na forma de proteína recombinante a mioblastos da linhagem C2C12, em fase final de diferenciação miogênica induziu hiperplasia (maior índice de fusão) e a diferenciação das células. Nas fases iniciais da diferenciação, RGMa induziu precocemente a diferenciação. O tratamento com RGMa de mioblastos sob efeito de um bloqueador da via BMP potencializou os efeitos de RGMa na hiperplasia celular; enquanto o tratamento com RGMa de mioblastos que super-expressam o receptor Neogenina também potencializou os efeitos na hiperplasia e induziu a diferenciação miogênica. Além disso, o tratamento com RGMa em meio de crescimento induziu uma maior viabilidade celular; enquanto em meio de diferenciação, a viabilidade foi reduzida. Estes resultados sugerem, portanto, que RGMa recombinante induz hiperplasia e diferenciação celular; os efeitos de hiperplasia são independentes da sinalização BMP; e os efeitos na diferenciação miogênica parecem ser exercidos via o receptor Neogenina. Fatores associados ao desenvolvimento muscular, são possíveis fontes de terapias gênicas para o tratamento de diversas miopatias e também alvos para programas de melhoramento genético de animais domésticos.

## ABSTRACT

RGMa is one of the members of the Repulsive Guidance Molecule (RGM) family, that were initially found playing roles as clues to guide axon migration. Recent new studies have been pointing to a higher range of biological functions for these molecules, including during myogenesis. Previous *in vitro* works revealed that the RGMa over-expression induces skeletal muscle cell hyperplasia and hypertrophy. However, the molecular mechanisms used by RGMa to induce these important skeletal muscle effects were not elucidated thus far. In other cell types, RGMa was found to signalize via Neogenin receptor or as coreceptors of the BMP signaling pathway; both of these paths were independently associated with muscle phenotypes similar to the ones we have observed for RGMa. In this work, RGMa administrated as recombinant protein to C2C12 myoblasts in terminal differentiation stage induced hyperplasia (higher fusion index) and differentiation of these cells. If administrated during the initial stages of differentiation, however, RGMa treatment can induce differentiation only. RGMa treatment of myoblasts under the effect of a BMP signaling inhibitor drug could potencialize its effects on hyperplasia; while RGMa treatment of myoblasts that were induced to over-express the receptor Neogenin could induce the expression of myogenic differentiation markers. Besides, the RGMa treatment of myoblasts in growth medium could induce a higher viability index; while in differentiation medium, the viability index was lower in the treated cells. Therefore, these results suggest that recombinant RGMa can induce both hyperplasia and skeletal muscle differentiation; the skeletal muscle hyperplasia effects induced by RGMa is BMP-independent; and that RGMa effects on myogenic differentiation are induced via Neogenin pathway. Genes associated with skeletal muscle development are sources for gene therapies to treat a number of myopathies and can also be used in genetic breeding programs.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	15
1.1. Moléculas de orientação por repulsão .....	15
1.2. Vias de sinalização associadas a RGMa.....	17
1.3. RGMa e a musculatura esquelética.....	22
1.4. Miogênese.....	25
1.5. Fusão de mioblastos e a dinâmica do citoesqueleto.....	29
1.6 Neogenina, BMP e o tecido muscular esquelético.....	31
2. OBJETIVOS .....	34
2.1. Objetivo geral .....	34
2.2. Objetivos específicos .....	34
3. METODOLOGIA .....	35
3.1. Cultura de células musculares esquelética.....	35
3.2. Análises dose-efeito e tratamento para a proteína recombinante RGMa (rcRGMa) durante a diferenciação celular.....	35
3.3. Tratamento de células C2C12 com rcRGMa.....	36
3.4. Análises dose-efeito do inibidor Dorsomorfina (DM).....	37
3.5. Tratamento de células C2C12 com rcRGMa e DM.....	38
3.6. Tratamento com rcRGMa em células induzidas a super-expressar o receptor Neogenina.....	38
3.7. Análises dos efeitos dos tratamentos de mioblastos da linhagem C2C12 com rcRGMa e/ou DM/Neogenina.....	39
3.7.1. Análise morfológica.....	39
3.7.2. Análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativa (RT-PCRq).....	40
3.8. Análise de expressão protéica por Western Blot.....	42
3.9. Ensaio de MTT.....	43
3.10. Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Análises dose-efeito no tratamento tardio de rcRGMa em mioblastos da linhagem C2C12.....	45
4.2 Avaliação dos efeitos do tratamento inicial de mioblastos com rcRGMa.....	48
4.3 Avaliação dos efeitos de rcRGMa na presença do inibidor da via de sinalização BMP, Dorsomorfina, em células musculares esqueléticas.....	49

4.3.1 Análises dose-efeito de DM em mioblastos da linhagem C2C12.....	49
4.3.2 Caracterização dos efeitos dos tratamentos de mioblastos com DM e rcRGMa.....	51
4.4 Avaliação dos efeitos hiperplásicos de rcRGMa em mioblastos que super-expressam o receptor Neogenina.....	53
4.5 Avaliação do efeito do tratamento com rcRGMa na viabilidade dos mioblastos.....	57
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Moléculas orientadoras por repulsão

Os circuitos neurais são a base da função neural e fundamentais tanto para o desenvolvimento embrionário quanto durante a vida adulta dos organismos (Stoeckli et al., 2018). Para que os circuitos neurais se formem corretamente, os axônios devem migrar através dos tecidos e encontrar seu destino final. Atualmente, cinco grupos de moléculas orientadoras de axônios e seus respectivos receptores atuam no cone de crescimento (ligante/receptor): Semaforinas/Plexins, Netrinas/Neogenina, Slits/Robo, Moléculas de Orientação Repulsivas (do inglês, *Repulsive Guidance Molecules*, RGM) /Neogenina e Efrinas/Eph (Van Battum et al., 2015). A ligação ligante-receptor induz uma cascata de sinalização intracelular, que leva ao direcionamento do cone de crescimento (i) a favor do sinal, caso sejam pistas atrativas; ou (ii) contra o sinal, caso sejam pistas repulsivas (Stoeckli et al., 2018). Estas moléculas podem atuar como pistas que são secretadas pelas células ou de forma ancorada à membrana plasmática (Stoeckli et al., 2018).

As RGMs são moléculas que atuam guiando os axônios exclusivamente por sinais repulsivos. Fazem parte da família os genes RGMa (foco de estudo desse trabalho), RGMb (também conhecido como DRAGON), RGMc (ou Hfe2) e RGMd.

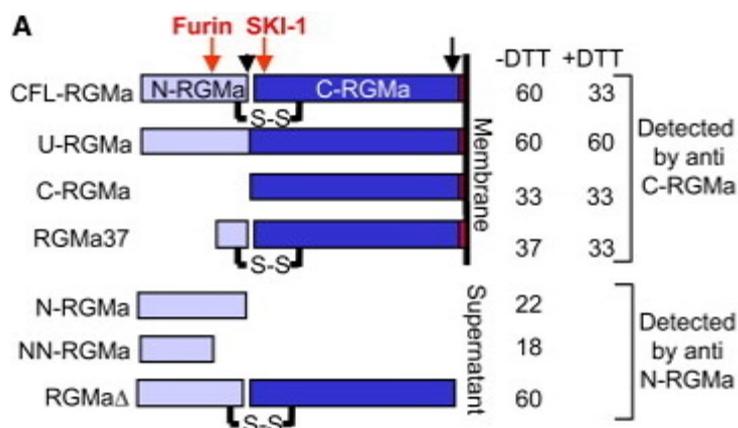
RGMa foi o primeiro membro da família a ser identificado atuando como pista para migração de axônios em formação no teto óptico, modelo mais usado para estudo do desenvolvimento do sistema nervoso central (Monnier *et al.*, 2002). RGMa é sintetizada como uma pré-proteína de 454 aminoácidos (aa) que contém uma sequência de sinal de 47 aa, um pro-segmento de 122 aa N-terminal, uma região madura de 258 (aa 170-427) e um pro-segmento de 27 aa C-terminal (Matsunaga et al., 2004). Todos os outros membros da família RGM foram identificados posteriormente contendo uma estrutura proteica semelhante (Figura 1). Na porção N-terminal é possível encontrar: (i) um peptídeo sinal; (ii) RGMa e RGMc possuem ainda um motivo RGD (tri-aminoácido Arg-Gly-Asp) nesta porção, classicamente conhecido como sítio de adesão à Integrina. Curiosamente, nenhuma relação das RGMs com Integrinas foi estabelecida até o momento; e (iii) um domínio parcial de von Willebrand tipo D (tipo vWF D), que inclui um sítio de autoproteólise altamente conservado denominado GDPH. A porção C-terminal é caracterizada pela presença de uma cauda GPI (Glicosilfosfatidilinositol),

responsável pela manutenção da forma ancorada da proteína à membrana plasmática das células (Monnier et al., 2002; Samad et al., 2004).



**Figura 1. Esquema representativo da estrutura proteica das RGMs.** RGD (tri-aminoácido Arg-Gly-Asp), ausente somente em RGMb e RGMd; vWFD (domínio parcial de von Willebrand tipo D), contendo o sítio de autoproteólise GDPH; e GPI (glicosilfosfatidilinositol). Figura adaptada de Siebold, 2016.

A proteína RGMa madura pode ainda sofrer clivagens proteolíticas mediada pelas proteases Furina e SKI-1 (*subtilisina/kexina isoenzima-1*) que resultam na formação de quatro fragmentos contendo apenas a porção C-terminal (C-RGMa) e, portanto atuando de forma ancorada à membrana plasmática: CFL-RGMa (60 kDa), U-RGMa (60 kDa), C-RGMa (33 kDa) e RGMa37 (37 kDa); e ainda três fragmentos contendo a porção N-terminal que atuam como proteínas solúveis: N-RGMa (30 kDa ou 22 kDa), NN-RGMa (30 kDa ou 18 kDa) e RGMaΔ (60 kDa ou 45 kDa) (Monnier et al., 2002; Tassew et al., 2009). Explantes neuronais cultivados na presença de RGMa solúvel ou transfectados com RGMa revelaram efeitos e níveis distintos no crescimento axonal, o que sugeriu que cada uma dessas diferentes formas de RGMa podem induzir fenótipos diferentes (Tassew et al., 2012).



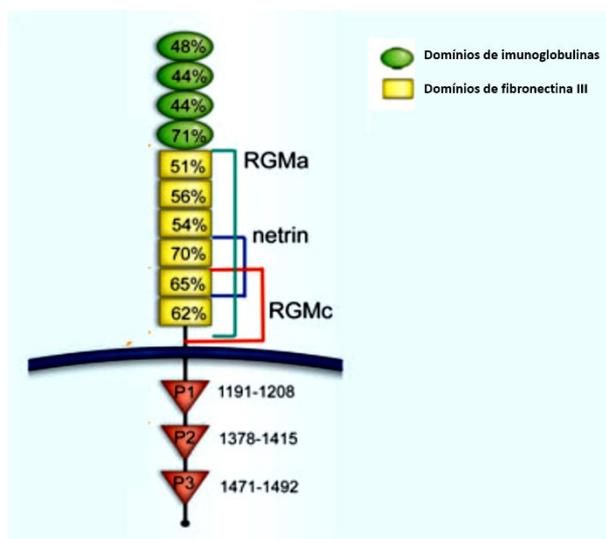
**Figura 2. Representação esquemática dos sete peptídeos gerados a partir da proteína RGMa pela clivagem com a Furina e SKI-1.** Quatro formas de RGMa ancoradas à membrana plasmática de células neuronais foram identificadas utilizando-se um anticorpo para a porção C-terminal de RGMa (C-RGMa); enquanto que três formas solúveis foram revelados utilizando-se um anticorpo para a região N-terminal da proteína (N-RGMa). A cabeça de seta preta indica o local de clivagem autocatalítico; a seta preta representa o local de clivagem conhecido; as setas vermelhas indicam os locais de clivagem sugeridos correspondentes à formas solúveis encontradas. Figura adaptada de Tassew et al. (2012).

Durante o desenvolvimento embrionário, RGMa foi encontrado amplamente expresso no sistema nervoso central, na cóclea, no pulmão, nos brotos dos membros e no intestino (Oldekamp et al., 2004; Metzger et al., 2005; Jorge et al., 2012). Em tecidos adultos, a expressão de RGMa foi encontrada não apenas no cérebro, como também no coração, nos pulmões, no fígado, na pele, nos rins, nos testículos e no intestino (Babbitt et al., 2005; Metzger et al., 2005; Corradini et al., 2009). Estudos funcionais vêm confirmando esta observação e sugerindo uma maior abrangência nas funções biológicas de RGMa em tecidos diferentes. RGMa foi associada ao fechamento do tubo neural (Niederkofler et al., 2004); e a processos de diferenciação e sobrevivência dos neurônios (Matsunaga et al., 2004; 2006). RGMa e RGMB foram ainda identificadas como moléculas inibidoras do crescimento e regeneração de axônios após injúria do sistema nervoso central (Samad et al., 2005; Hata et al., 2006). Mais recentemente as RGMs têm sido implicadas em várias doenças. RGMa e RGMB são expressas nos locais de danos ou injúria em casos de acidente vascular encefálico (Feng et al., 2012; Shabanzadeh et al., 2015); e vem sendo consideradas alvos promissores no tratamento de esclerose múltipla (Demicheva et al., 2015), Parkinson (Muller et al., 2016) e Alzheimer (Satoh et al., 2013). O uso de anticorpos neutralizadores da ação de RGMa vem apontando uma melhora na recuperação funcional nos casos de injúria do nervo óptico em modelos animais para esclerose múltipla (Demicheva et al., 2015). RGMa foi ainda apontado como supressor da angiogênese (Harada et al., 2016); e indutor da ossificação endocondral (Zhou et al., 2010). Além disso, outros estudos vêm apontando a ação de RGMa em respostas inflamatórias, onde a ligação de RGMa ao seu receptor Neogenina, presente nas células T CD4+, desencadeia o aumento da adesão dessas células aos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, o aumento na infiltração destas células nos parênquimas (Muramatsu et al., 2011). A expressão de RGMa também já foi relacionada com a gênese e evolução do câncer de colo retal (Zhao *et al.*, 2012).

## **1.2 Vias de sinalização associadas a RGMa**

Além de sinalizar nas células via o receptor Neogenina (Rajagopalan et al., 2004; Fujita et al., 2017), RGMa foi identificado atuando como co-receptor da via de sinalização induzida pelas Proteínas Morfogenéticas Ósseas (do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs) (Babbitt et al., 2005; Samad et al., 2005).

Neogenina é um receptor protéico transmembrana multifuncional membro da superfamília de imunoglobulinas do tipo III (Wilson et al., 2007). A estrutura do receptor compreende quatro domínios de imunoglobulina e seis de fibronectina de tipo III (FnIII) na sua região extracelular. O sítio de ligação a RGMa encontra-se dentro dos seis domínios de FnIII (Rajagopalan et al., 2004; De Vries & Cooper, 2008). Em seu domínio intracelular são encontrados três pequenos subdomínios, altamente conservados em vertebrados, conhecidos como P1, P2 e P3, importantes para a modulação da sinalização (De Vries & Cooper, 2008).



**Figura 3. Estrutura da Neogenina e sítio de ligação com RGMa.** RGMa se liga na porção extracelular da Neogenina dentro dos seis domínios de FnIII. RGMc, outro membro da família RGM, possui um sítio de ligação localizado na região justamembranar, dentro dos domínios FnIII-5 e FnIII-6. Já as Netrinas, que também atuam via ligação ao receptor Neogenina, ligam-se no domínio localizado entre FnIII-4 e FnIII-5. Figura adaptada de De Vries & Cooper (2008).

A interação RGMa-Neogenina induz a ligação da Quinase de Adesão Focal (do inglês, *Focal Adhesion Kinase*, FAK) ao domínio P3 do receptor, assim como de quinases SRC (Figura 3) (De Vries & Cooper, 2008). FAK é fosforilada por um mecanismo ainda desconhecido; as quinases SRC estabelecem um *feedback* positivo para induzir a fosforilação contínua de FAK. FAK fosforilada ativa diretamente a via RhoA-ROCK, que pertence a uma família de GTPases que desencadeiam a despolimerização de actina e retração dos filopódios neuronais, resultando no colapso do cone de crescimento axonal (De Vries & Cooper, 2008). A ativação de RhoA também induz a fosforilação da cadeia leve de Miosina II, que também desencadeia a despolimerização de filamentos de Actina (De Vries & Cooper, 2008). Em contraste, quando a Netrina se liga a Neogenina, o receptor é fosforilado, desencadeando um ciclo de resposta via

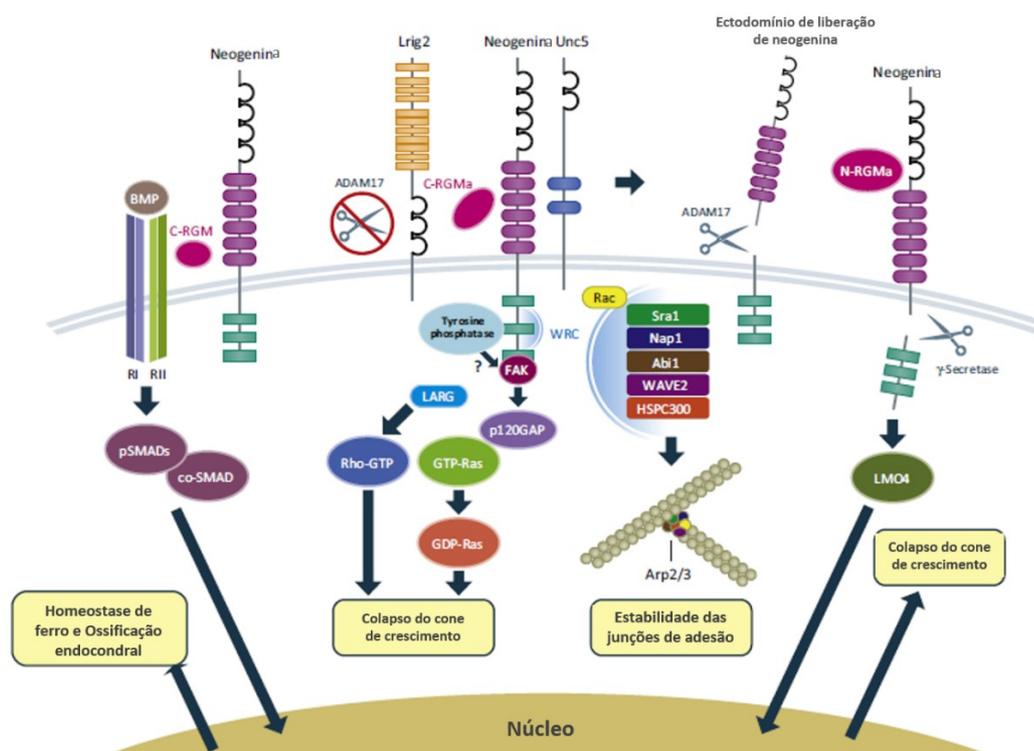
Rac1 e Cdc42, promovendo assim a atração e crescimento neural (De Vries & Cooper, 2008). Mais recentemente, ainda no desenvolvimento do sistema nervoso, o receptor Unc5 e o fator de permuta de nucleotídeos guanina associados a leucemia (do inglês, *leukemia-associated guanine nucleotide exchange factor*, LARG; Figura 4) também foram associados a via de sinalização RGMa-Neogenina (Hata et al., 2009). Unc5 foi encontrado como um co-receptor para RGMa, interagindo com LARG para mediar a ativação de RhoA e o colapso do cone de crescimento (Hata et al., 2009; Siebold et al., 2016).

A forma solúvel de RGMa também sinaliza nas células nervosas após a clivagem proteolítica de Neogenina por ADAM17, uma metaloprotease que atua liberando os ectodomínios de Neogenina (Bai et al., 2011). Lrig2 previne a clivagem de Neogenina por ADAM17 (Bai et al., 2011), mantendo a funcionalidade do complexo de sinalização via RhoA-ROCK ou RAS. RGMa solúvel também induz a clivagem dos domínios P1, P2 e P3 intracelulares de Neogenina (Figura 4; Siebold et al., 2016). Esta clivagem é mediada por uma  $\gamma$ -secretase. Após a clivagem, estes subdomínios são deslocados para o núcleo, para mediar a transcrição gênica via LMO4 (membro da família de proteínas de domínio único LIM; Siebold et al., 2016).

Neogenina foi apontada como uma proteína chave do mecanismo de nucleação de actina que governa a estabilidade das junções de adesão em células epiteliais (Lee et al., 2016). Nestes casos, a ligação de RGMa a Neogenina induziu a formação de anéis de actina nas junções de adesão, que levou a nucleação da actina mediada por Arp2/3 e pelo complexo regulador de ondas (WRC) (Figura 4; Siebold et al., 2016; Lee et al., 2016). O *Knockdown* de RGMa induziu defeitos na estabilidade das junções de adesão nas células epiteliais e, após a depleção de Neogenina, a localização de WRC não foi mais observada. A necessidade do recrutamento de RGMa e Neogenina para que as junções de adesão se mantenham estáveis sugere que ambos atuem em conjunto via Arp2/3 e complexo WRC (Lee et al., 2016).

A ligação RGMa-Neogenina também controla negativamente a morte celular no sistema nervoso (Matsunaga et al., 2004; 2006) e parece ser dependente da presença desse complexo nas jangadas lipídicas (Shabanzadeh et al., 2015). Os tratamentos de células com o peptídeo N-raft (que liga-se especificamente à Neogenina, evitando sua localização nas jangadas lipídicas) e com metil-beta-ciclodextrina (M $\beta$ CD, um quelante de colesterol que perturba as jangadas lipídicas), aumentaram a sobrevivência de células neuronais em 50% após isquemia (Shabanzadeh et al., 2015), revelando uma importante função da sinalização induzida por RGMa-Neogenina presentes nas jangadas lipídicas.

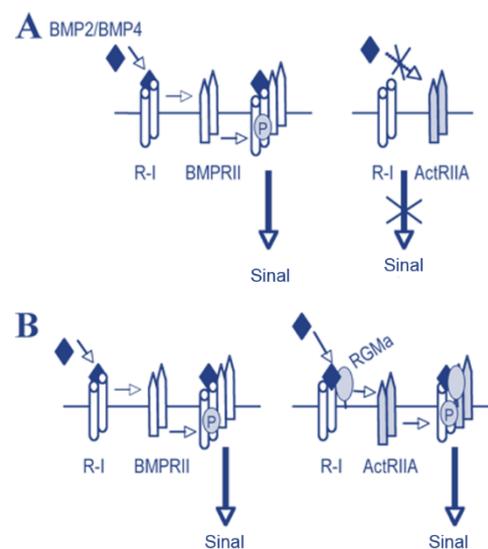
As RGMs também foram identificadas como co-receptores da sinalização BMP (Samad et al., 2005; Babitt et al., 2005; Figura 4). As BMPs foram inicialmente descritas como fundamentais para o desenvolvimento ósseo e de cartilagens (Corradini et al., 2009; Sartori & Sandri, 2015). Elas pertencem à superfamília TGF- $\beta$ , que incluem ainda as Activinas, Inibinas, Fatores de Crescimento e Diferenciação (GDFs), Nodal e Miostatina (Corradini et al., 2009). As BMPs sinalizam via os receptores tipo II (BMPRII, ActRIIA e ActRIIB) (Yamashita et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995) antes de promover o recrutamento de receptores do tipo I (BMPRIA/ALK3, BMPRII/ALK6 e ActRIA/ALK2) (Koenig et al., 1994; Ten Dijke et al., 1994; Sartori et al., 2015).



**Figura 4. RGMa pode atuar em diferentes tecidos por diferentes vias de sinalização intracelulares.**

As RGMs podem atuar como co-receptores para proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), ativando as SMADs como mensageiros secundários para regulação da homeostase de ferro e ossificação endocondral (Silvestri et al., 2007; Zhou et al., 2012). As RGMs também vem sendo descritas como formadoras de uma ponte estrutural entre BMPs e Neogenina (Zhou et al., 2012). Em geral, a ligação de C-RGMA (ancorada a membrana) à Neogenina leva à ativação de RhoA via Unc5 e LARG, e a inativação de Ras via FAK, p120GAP e Ras, induzindo o colapso do cone de crescimento. Já a ligação da forma solúvel N-RGMA à Neogenina induz a ativação da  $\gamma$ -secretase e LMO4, que clivam os domínios intracelulares de Neogenina, se deslocam para o núcleo e induzem transcrição gênica culminando na indução do colapso do cone de crescimento. Em células epiteliais, RGMa-Neogenina liga-se diretamente ao complexo regulador WAVE (WRC), levando à ativação de Rac1, que estimula à nucleação de filamentos de actina por Arp2/3, promovendo e a estabilidade das junções de adesão entre as células. Figura adaptada de Siebold (2016).

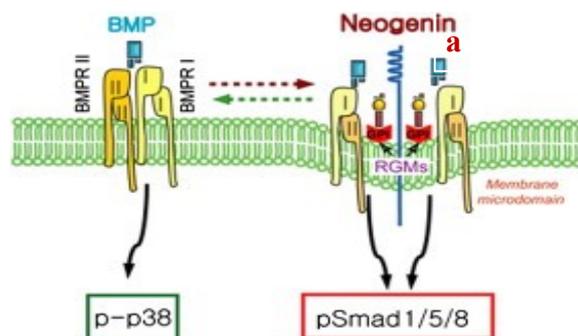
A via BMP canônica é induzida pela ligação do ligante BMP aos receptores do tipo I e tipo II, levando à ativação do complexo Smad1/5/8, que associa-se a Smad4 no citoplasma, para ser translocado para o núcleo e promover a transcrição gênica (Ono *et al.*, 2011, Massague *et al.*, 2008). Curiosamente, a ativação da sinalização BMP também parece estar associada à presença de seus receptores nas jangadas lipídicas, uma vez que a depleção de 30-33% de colesterol por um combinado de lovastatina e uma baixa concentração de mevalonato foi suficiente para inibir a sinalização induzida por BMP2 em células C2C12 (Hartung *et al.*, 2006). A associação de RGMa com a sinalização BMP foi identificada inicialmente em células ovarianas da granulosa e em células renais, onde RGMa induziu um maior recrutamento de receptores BMPs (Xia *et al.*, 2007). Em condições de homeostase, observou-se que o sinal de BMP2 e BMP4 era transduzido apenas via o receptor BMPRII; enquanto que na presença de RGMa, o sinal passou a ser transduzido também por ActRIIA (Xia *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2010).



**Figura 5. Desenho esquemático ilustrando a relação de RGMa com a via de sinalização BMP.** Em (A), sinalização da via BMP na ausência de RGMa. Em (B), a ligação de RGMa a receptores BMPRI induz uma amplificação na sinalização da via BMP, por ativar a sinalização dos receptores ActRIIA. Figura retirada de Xi *et al* (2007).

No entanto, a ligação de ligantes BMP aos mesmos receptores pode induzir também a ativação de uma via não-canônica, independente das Smads, que é regulada pela fosforilação de membros das vias MAPK/ERK, JNK/p38, PKC/RhoA e PI3K/AKT (Aubin *et al.*, 2004 ; Scarfi, 2016). As RGMs parecem atuar como co-receptores tanto na via canônica de BMP, quanto na não-canônica. Lee *et al* (2011) revelaram que a ligação RGMb(DRAGON)-BMP-BMPRI-BMPRII inibe a fosforilação de JNK/p38 e MAPK/ERK, reprimindo a transcrição de IL-6.

RGMa e RGMc já foram descritos atuando num complexo Neogenina-BMP-RGMs, como uma “ponte” para que o receptor Neogenina se associe aos receptores da sinalização BMP (especialmente BMPRIA) durante o processo de ossificação endocondral (Zhou et al., 2012; Figura 6). Esta associação ocorre preferencialmente em microdomínios de jangas lipídicas das membranas plasmáticas (Zhou et al., 2012). Nesse complexo, RGMa se apresenta como uma molécula necessária (co-receptora) para que o receptor de BMP migre para a jangadas lipídicas, juntamente com a Neogenina, onde a sinalização é efetivamente ativada.



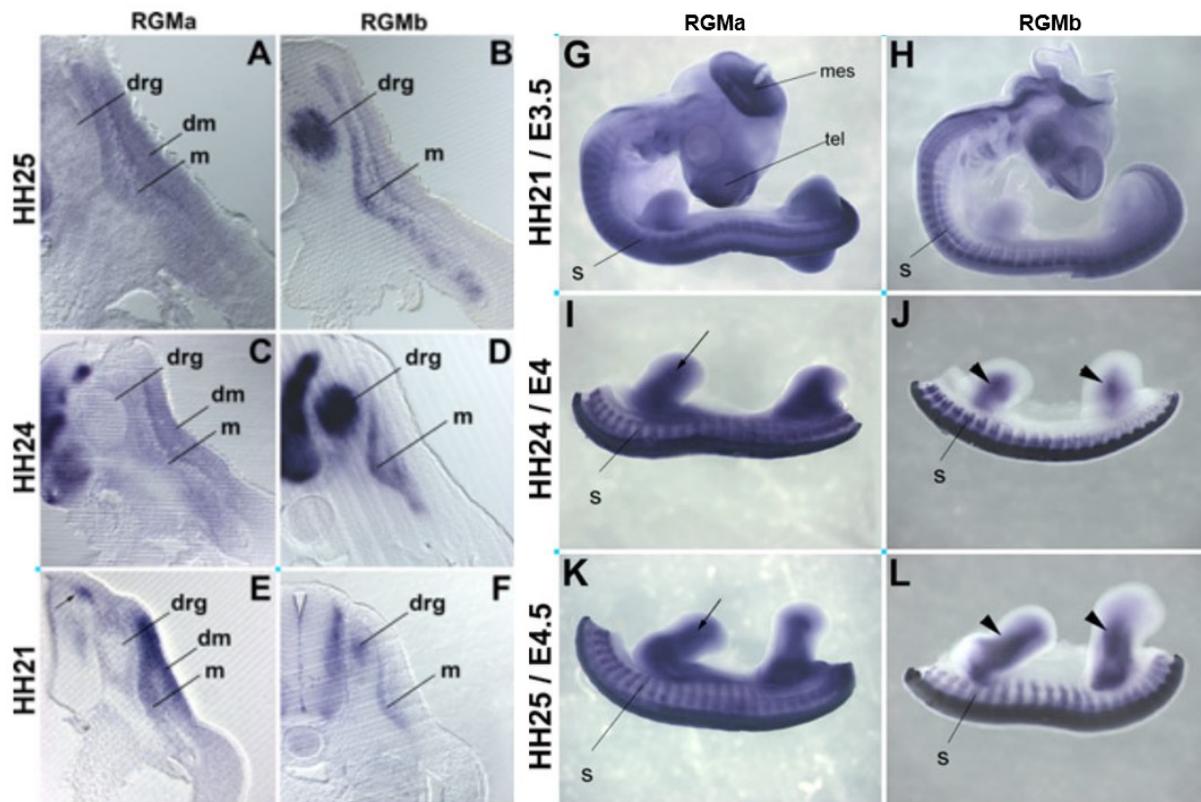
**Figura 6. Representação da formação do complexo Neogenina-RGMs-BMP durante a ossificação endocondral.** A associação dos receptores de BMPRI e BMPRII em microdomínios de membrana é necessária somente para a indução da sinalização canônica de BMP. As RGMs parecem mediar a interação de Neogenina com os receptores BMP nos condrócitos, promovendo sua translocação para as jangadas lipídicas. Figura adaptada de Zhou et al. (2010).

### 1.3 RGMa e a musculatura esquelética

A primeira evidência da presença das RGMs no tecido muscular esquelético ocorreu nos estudos de Kanomata et al. (2009). Estes autores identificaram transcritos de RGMa, RGMb e RGMc em diversos tecidos de camundongos adultos, incluindo na musculatura esquelética. Jorge et al. (2010) também detectaram RGMa como um transcrito altamente expresso no tecido muscular esquelético em um ensaio de microarray com transcritos de *Gallus gallus*.

Achados de Jorge et al. (2012) e Martins et al. (2015) estreitaram os domínios de ação de RGMa e RGMb para o desenvolvimento, manutenção e crescimento da musculatura estriada esquelética. Transcritos de *RGMa* e *RGMb* foram observados nos somitos de embriões de galinha, que são estruturas embrionárias transitentes, derivadas de mesoderma paraxial, que dão origem à derme, à musculatura esquelética do tronco e membros, aos tendões, vértebras e costelas. Mais especificamente, transcritos de *RGMa* foram detectados nos sítios de origem de precursores da musculatura esquelética e das células tronco musculares - as células

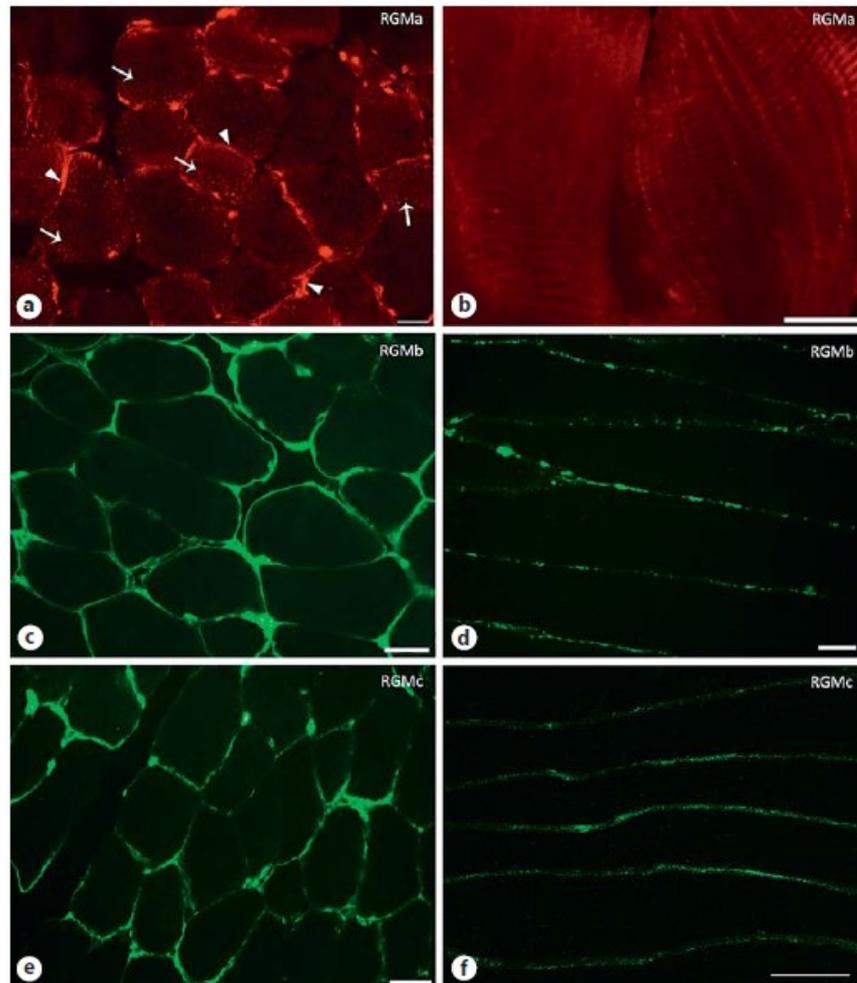
satélites; enquanto que transcritos de *RGMb* foram detectados nos sítios de sobreposição das células musculares já diferenciadas (Jorge et al., 2012).



**Figura 7. RGMa e RGMb são expressos durante o desenvolvimento, manutenção e crescimento da musculatura estriada esquelética.** Em (A-F) observamos secções transversais de embriões de galinha, a nível de tronco segundo estagiamento Hamburger e Hamilton (HH). RGMa é expresso em células mesenquimais envolta do glânglio da raiz dorsal (DRG) e nas regiões do miotomo (M) e dermomyotomo (DM) dos somitos. Já RGMb se mostra expresso no DRG, e assim como RGMa nas regiões do miotomo (M) e dermomyotomo (DM) dos somitos, regiões que darão origem aos precursores da musculatura esquelética. Em (G-L), observamos uma visão dorsal de embriões inteiros cuja os estagios estão indicados a esquerda. Destaque para a expressão de RGMa e RGMb nos somitos (S) e nos membros em desenvolvimento (seta). Imagem adaptada de Jorge et al. (2012).

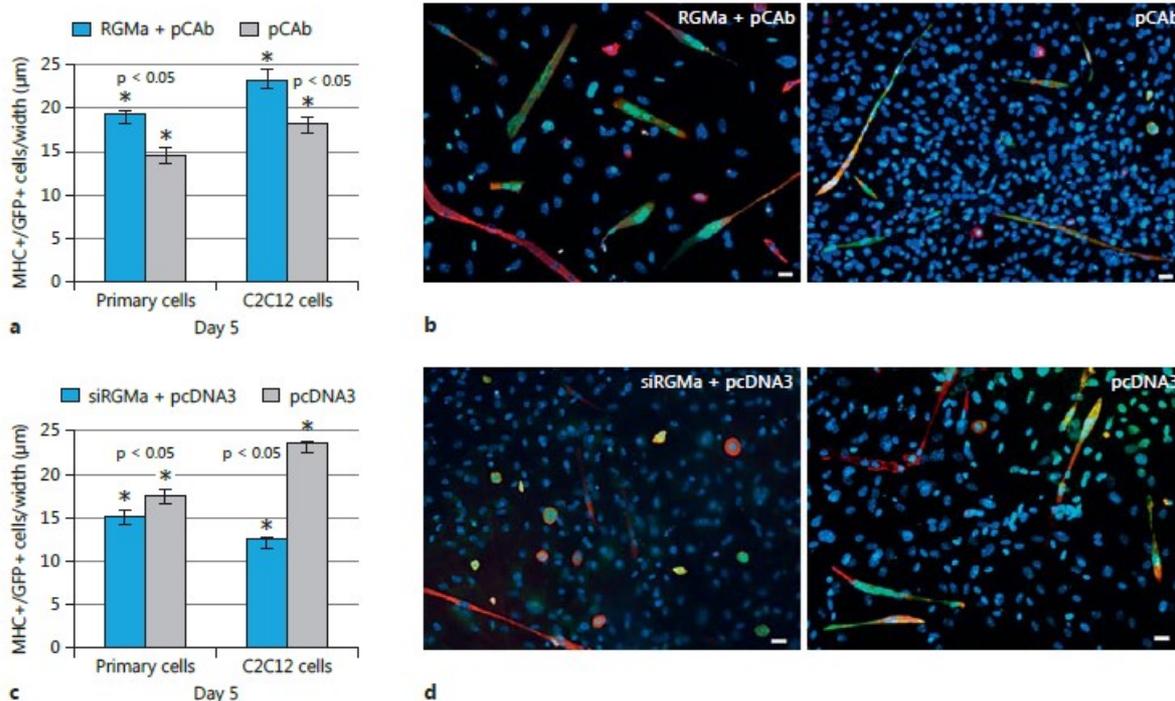
RGMa, RGMb e RGMc também foram detectadas na célula muscular esquelética adulta (Figura 8), com as três RGMs apresentando um padrão sobreposto no sarcolema das células e RGMa também encontrada no sarcoplasma, com um padrão estriado similar ao de proteínas sarcoméricas (Martins et al., 2015). O mesmo trabalho identificou que o tecido muscular esquelético produz dois peptídeos de RGMa, sendo um com 60 kDa e outro com 33 kDa. RGMa foi associada a diferenciação muscular durante todos os estágios de diferenciação *in vitro*. A super-expressão da região codificante (CDS) de RGMa em células musculares induziu a hipertrofia das células musculares (Figura 9), com a formação de células com largura e

consequentemente área maiores do que as células que super-expressaram o controle; e o *knockdown* de RGMa induziu a formação de células menores, com características atróficas (Martins et al., 2015).



**Figura 8: Padrão de expressão das RGMs na musculatura esquelética adulta.** Em (A), RGMa é expressa no sarcolema e no sarcoplasma (B) das fibras musculares esqueléticas. Em (C-D) RGMb e RGMc (E-F) são expressas apenas no sarcolema das fibras musculares esqueléticas. Retirada de Martins et al. (2015).

A super-expressão de RGMa nessas células também induziu uma maior eficiência de fusão de mioblastos para a formação de miotubos multinucleados: as células que super-expressaram RGMa apresentaram um maior número de núcleos, quando comparado às células que super-expressaram o controle (Martins et al., 2015). No entanto, a forma como RGMa sinaliza nas células musculares para induzir a hiperplasia e a hipertrofia muscular ainda permanece desconhecida.



**Figura 9: Superexpressão de RGMa em células musculares esqueléticas promove hipertrofia e *knockdown* de RGMa induz a formação de células atróficas.** Em (A), células musculares esqueléticas primárias e a linhagem imortalizada C2C12, quando superexpressas com RGMa, após 5 dias em diferenciação formam células mais largas do que somente as transfectadas com o controle pCAB. Já em (B) quando as células primárias e C2C12 são transfectadas com o RNA de interferência de RGMa, após 5 dias em diferenciação essas células apresentam menor largura do que o grupo controle pcDNA3. Imagem retirada de Martins et al. (2015).

#### 1.4 Miogênese

A miogênese é o processo embrionário que induz a diferenciação de células-tronco fundadoras mesodérmicas em um miotubo multinucleado (revisado por Tajbakhsh, 2009). Estas “células-tronco fundadoras” estão localizadas nos somitos, que são as estruturas embrionárias transitientes formadas pela segmentação da mesoderme paraxial.

A diferenciação das células-tronco fundadoras em miotubos multinucleados é coordenadamente regulada pela família de fatores de transcrição conhecidos como Fatores Regulatórios Miogênicos (do inglês, *Miogenic Regulatory Factors*, MRFs): MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4. Estes fatores de transcrição compartilham o domínio bHLH (Hélice-loop-hélice básico; revisado por Asfour et al., 2018). A atuação das MRFs é combinada com outros fatores. Por exemplo, Wnt1 e Wnt3 provenientes do tubo neural induzem a expressão de Myf5 e MyoD (Figura 7; Musumeci et al., 2015).

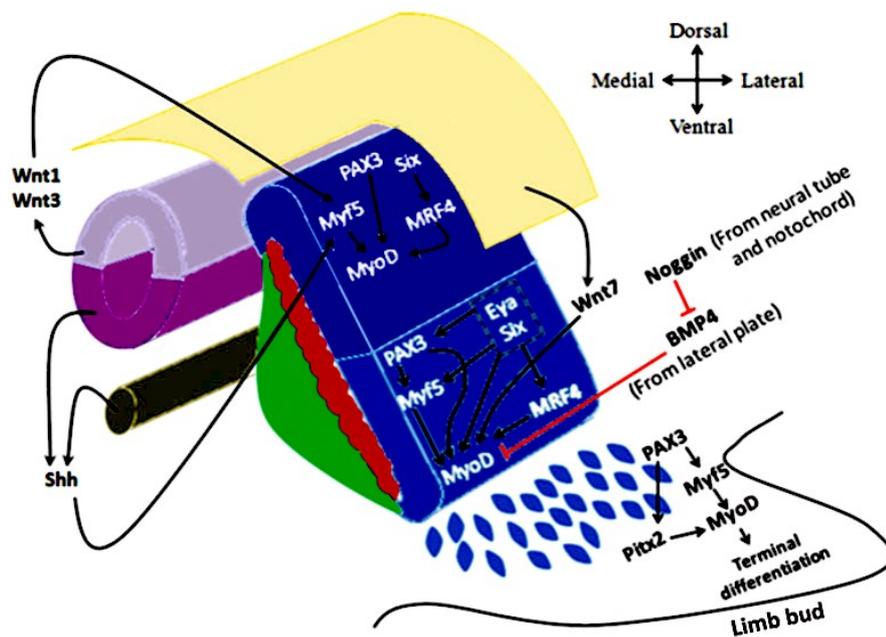
O fator de transcrição box pareada 3 (do inglês, *Transcription Factor paired box*, Pax3) é difusamente detectado como o primeiro fator de transcrição miogênico expresso no mesoderma paraxial (Magli et al., 2013). Pax3 é responsável por recrutar e orientar a migração das células indiferenciadas em direção ao programa miogênico (Asfour et al., 2018). Quando atingem o destino designado, estas células proliferam e gradualmente começam a expressar MRFs, o que resulta na diminuição gradual da expressão de PAX3.

A diferenciação em mioblastos pode ocorrer tanto pela via canônica quanto pela via não-canônica miogênica. A via miogênica canônica é mediada pela ativação de Myf5 mediada por Pax3; seguida de Myf5 direcionando a expressão de MyoD (Bajard et al., 2006). Na via miogênica não-canônica, PAX3 ativa Pitx2 que ativa diretamente a expressão MyoD (Figura 7).

Os MRFs eram inicialmente divididos em fatores iniciais (MyoD e Myf5), envolvidos no comprometimento e proliferação das células miogênicas; e fatores tardios (Miogenina e MRF4), que regulam a diferenciação terminal das células comprometidas (Asfour et al., 2018). Hoje, no entanto, sabe-se que MyoD pode estar também envolvido na regulação da diferenciação terminal e MRF4 pode ter um papel no comprometimento muscular inicial (Francetic et al., 2011), e que todos os MRFs, exceto o Myf5, podem induzir os precursores musculares a saírem da fase proliferativa e se direcionarem para a diferenciação (Valdez et al., 2000). Portanto, todos os MRFs podem induzir a diferenciação muscular (Asfour et al., 2018).

Ao se comprometerem com a identidade muscular, os mioblastos passam por um processo de proliferação celular altamente regulado (Musumeci et al., 2015). Fatores de crescimento ou altas concentrações de soro no meio de cultura induzem um aumento na expressão de cJun e conseqüentemente de ciclina D1 nos mioblastos, tornando-os altamente proliferativos (Diehl & Sherr, 1997). Ciclina D1 tem o papel de se associar a cdk4 no citoplasma para conduzi-lo para o núcleo dos mioblastos, onde o complexo bloqueia então a ação de diferenciação miogênica de MyoD (Zhang et al., 1999; Wei & Paterson, 2001; Singh & Dilworth, 2013; Fu et al., 2004; Kislinger et al., 2005; De Falco et al., 2006). Estas células param então de se dividir e entram no programa de diferenciação muscular (Kim et al., 2015). A saída do ciclo celular envolve a retirada do sinal de crescimento e a substituição para um meio propício para a diferenciação miogênica, de forma que o complexo ciclina D1/cdk4 não é mais produzido,

liberando MyoD para ativar a expressão de Miogenina, o fator miogênico associado à diferenciação muscular (Liu et al., 2010; Singh & Dilworth, 2013).

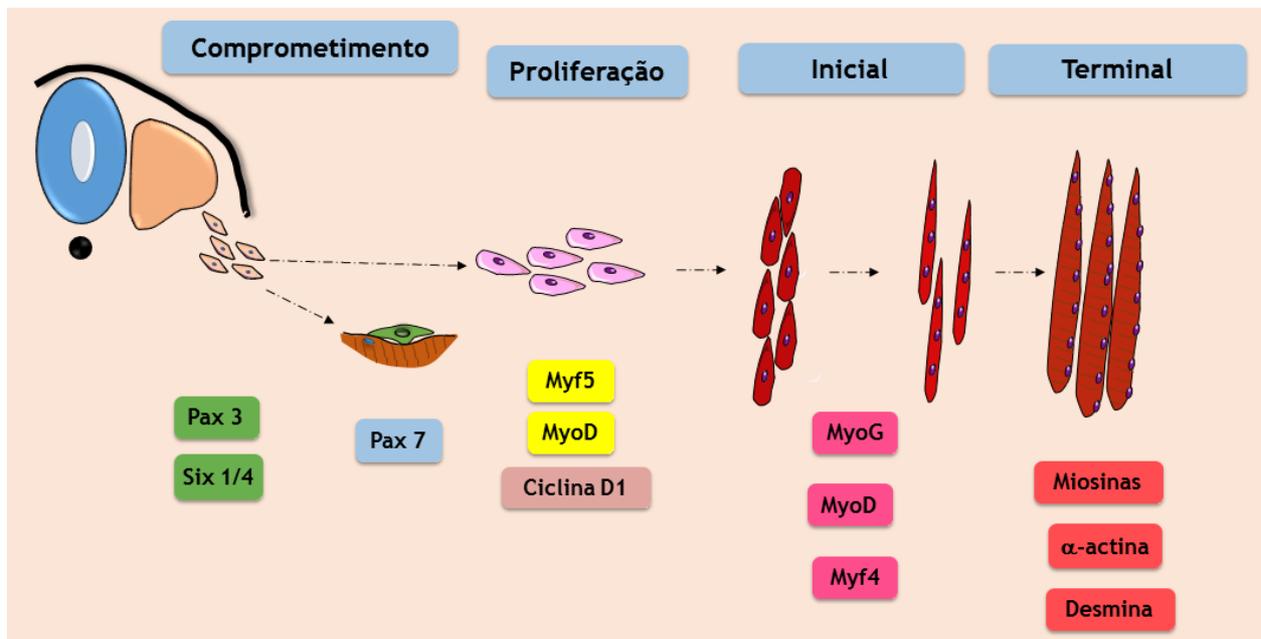


**Figura 10. Fatores Regulatórios miogênicos e suas vias.** Os sinais Wnt1, Wnt3 e Shh ativam Myf5 no dermomiótomo epaxial, que por sua vez ativa a expressão MyoD. Além disso, seis proteínas e Pax3 podem ativar a expressão MyoD independente do Myf5. No dermomiótomo hipaxial, a expressão de Myf5 é dependente das proteínas Pax3, Six e Eya. BMP4 inibe a expressão de MyoD no dermomiótomo hipaxial, evitando a conversão de esclerótomo em músculos. Nos brotos dos membros, as células indiferenciadas (Pax3+/MRFs-) não expressam MyoD até que cheguem ao seu destino. Figura retirada de Asfour et al. (2018).

Os mioblastos se diferenciam em miócitos, que são as primeiras células musculares esqueléticas formadas no embrião. Esta fase é controlada pela Miogenina, que induz a expressão de proteínas especializadas do citoesqueleto da célula muscular, incluindo Miosinas de cadeia pesada (tipo I, Myh7) e embrionária (Myh3),  $\alpha$ -Actinas [cardíaca (Actc1) e Desmina (Babai et al., 1990; Lyons et al., 1991; Sassoon et al., 1988; Chal et al., 2017)]. A transição de mioblastos para fibras musculares multinucleadas é acompanhada por alterações significativas na síntese e acúmulo de proteínas específicas (Chal et al., 2017). Nos miotubos recém formados surgem bandas transversais devido à montagem de miofibrilas e sarcômeros; e após alguns dias as fibras formadas tornam-se excitáveis e com capacidade de contração (Musumeci et al., 2015).

As células C2C12 são de uma linhagem imortalizada de mioblastos isolados de camundongos (Blau et al., 1983), que são amplamente utilizadas para mimetizar o processo miogênico *in*

*in vitro*. Nestas células, a indução da diferenciação é induzida pela retirada do soro (para um meio contendo apenas 2% de soro de cavalo), que leva: (i) à saída rápida dos mioblastos do ciclo celular; e (ii) uma série de alterações graduais na expressão gênica, que vão conduzindo a conversão morfológica de células únicas em miotubos fundidos, alongados e multinucleados (Abmayr et al., 2012; Musumeci et al., 2015). Essa fase inclui rearranjos do citoesqueleto, adesão intercelular aumentada e a maturação tanto do aparato contrátil quanto de organelas inteiras, como peroxissomos e mitocôndrias. MyoD está intimamente relacionado à ativação da fase de diferenciação miogênica *in vitro*, juntamente com o Fator Potencializador Específico de Miócito 2 (do inglês, *Myocyte Enhancer Factor 2*, MEF2) membro da família de fatores de transcrição MADS (Kislinger et al., 2005). Outros reguladores importantes para a diferenciação miogênica nesta fase incluem as proteínas homeobox Six1 e Six4 (Kislinger et al., 2005). Em estágios mais avançados de formação de miotubos *in vitro* é possível detectar níveis elevados de transportadores de cálcio e de outras proteínas ligadas à excitação/contração do músculo esquelético (como os fatores citoesqueléticos Actina, Miosina, Troponina, Nebulina, Titina, Desmina e  $\alpha$ -Actinina) (Kislinger et al., 2005). À esses estágios foram ainda associados indução de componentes específicos do complexo Distrofina, como Distroglicana e Sarcoglicano, além de proteínas de tecido conjuntivo, que fornecem a estabilização física durante as forças extremas de tração geradas durante a contração: colágeno  $\alpha$ , integrinas ( $\alpha$ 5,  $\alpha$ v,  $\alpha$ 7,  $\beta$ 1 e  $\beta$ 5), lamininas ( $\alpha$ -2,  $\alpha$ -5,  $\beta$ -1 e  $\gamma$ -1) e fibronectina (Kislinger et al., 2005). Em contraste, Notch 3 e 4 são detectados preferencialmente nos mioblastos em proliferação; assim como as Smad 3, 4 e 5, que também são detectados somente precocemente durante a miogênese (Kislinger et al., 2005).

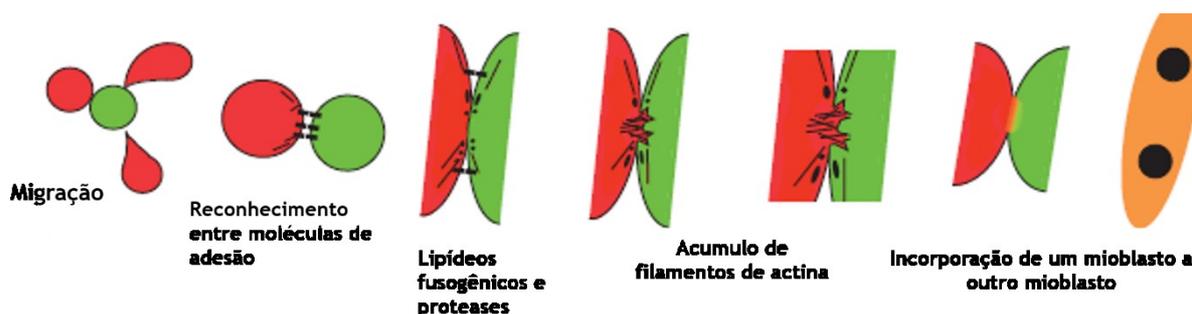


**Figura 11: Esquema representando etapas e fatores necessários para a diferenciação muscular esquelética.** A diferenciação das células-tronco fundadoras somáticas em miofibrilos multinucleados é um processo altamente regulado por diferentes fatores miogênicos (os retângulos destacam os principais). O processo envolve etapas de comprometimento, proliferação, diferenciação inicial (mioblastos em miócitos ou miofibrilos primários) e finalmente a diferenciação terminal que culmina na formação de miofibrilos maduros.

### 1.5 Fusão de mioblastos e a dinâmica do citoesqueleto

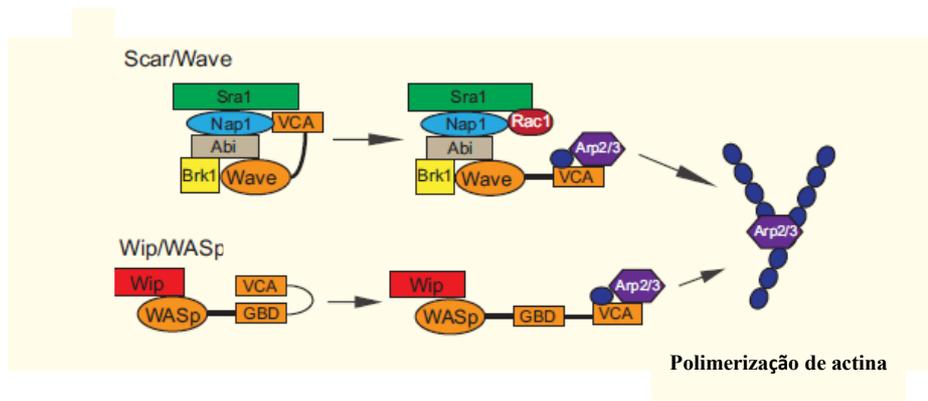
Várias classes de moléculas adesivas já foram associadas à fusão de mioblastos para a formação de miofibrilos multinucleados, como por exemplo as Caderinas e a Superfamília Ig (revisado por Krauss et al., 2005, 2010). A Superfamília Ig compreende proteínas de superfície celular, com repetições de Ig e Fibronectina tipo III (FNIII) (Krauss et al., 2005). As NCAMs (do inglês, *Neural cell adhesion molecules*), outro exemplo, foram associadas aos estágios iniciais da fusão dos mioblastos (Peck & Walsh, 1993; Fazeli et al., 1996). CDO é uma outra classe Superfamília Ig que também foi associada à indução da diferenciação, aumento da expressão de proteínas músculo-específicas e a formação de miofibrilos (Kang et al., 1998; 2003). Neogenina-CDO-Netrina foi descrita ativando bHLH e NFAT, que são fatores de transcrição pró-miogênicos (De Vries & Cooper, 2008).  $\beta$ -1-Integrinas são moléculas de adesão entre a célula e a matriz extracelular, que são reconhecidas por proteínas que possuem o domínio RGD, e necessárias para a fusão de mioblastos de camundongos (Schwander et al., 2003).

O processo de fusão de mioblastos para a formação de miotubos multinucleados envolve os seguintes passos: (1) migração de mioblastos; (2) reconhecimento e adesão entre mioblastos competentes para a fusão; (3) formação de vesículas elétricas densas nos pontos de contato, contendo lipídios fusogênicos ou proteases que facilitam o processo de fusão; (4) acúmulo de filamentos de F-actina na superfície da membrana plasmática formando uma protrusão; (5) mistura dos conteúdos citoplasmáticos; e, por fim, (6) a expansão do poro permite que finalmente os mioblastos sejam incorporados ao miotubo, ou que um mioblasto se incorpore a outro mioblasto fusionando-se em uma única célula sincicial (Abmayr et al., 2012).



**Figura 12: Processo de fusão de mioblastos.** Esquema representando as etapas que envolvem o processo de fusão de dois mioblastos ou incorporação de um mioblasto a um miotubo. Adaptada de Abmayr et al. (2012).

A polimerização de Actina desempenha um papel fundamental na fusão de mioblastos. Os focos dinâmicos de F-Actina são formados e dissolvem-se em pontos coincidentes com o local de fusão dos mioblastos, normalmente associados à pontos de contato célula-célula (Abmayr et al., 2012). Por isso, reguladores do citoesqueleto de actina tem sido identificados como participantes da fusão de mioblastos e, conseqüentemente, também da miogênese (Figura 8). A maioria desses reguladores afeta a polimerização da Actina via o complexo Arp2/3 (Kim et al., 2015), que é um complexo formado por 7 subunidades que forma um centro inicial de nucleação e alongação dos filamentos de Actina (Gildor et al., 2010; Kim et al., 2015). A ativação de Arp2/3 requer a sinalização de fatores citoplasmáticos, chamados de Fatores Promotores de Nucleação (do inglês, *Nucleation Promoter Factors*, NPF), que são ativados em resposta às vias de transdução de sinal e assim interligam a comunicação intercelular com o comportamento dinâmico do citoesqueleto. Os membros das famílias de proteínas SCAR/WAVE e WASp (Figura 8) foram identificados como os dois principais NPFs de Arp2/3. SCAR/WAVE é regulado por um complexo protéico, em conjunto com Rac GTPases, WASp e várias moléculas de sinalização, incluindo CDC42 (Gildor et al., 2010).



**Figura 13. O complexo Arp2/3 é um nucleador conservado da polimerização da Actina.** Este complexo é ativado por fatores promotores de nucleação de actina (NPFs) que incluem Wip/ WASp e Scar/Wave (Scar em *Drosophila*; Wave em vertebrados). Figura adaptada de Abmayr et al., (2012).

A via de sinalização clássica envolvida na dinâmica da Actina em camundongos é dependente da M-Caderina, que são importantes moléculas de adesão para o processo de fusão, juntamente com integrinas, N-caderinas e Nefrinas. O envolvimento da M-Caderina medeia a ativação da Rac1 via Trio. Um complexo multiproteico composto por M-caderina, Rac1 e Trio é formado durante a fusão. Arf6 é o responsável pela formação do complexo M-Caderina/Rac1/Trio e regula a fusão de mioblastos através da ativação da Fosfolipase D, e a produção de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PI (4,5 P2)] uma molécula que regula a reorganização do citoesqueleto da actina na membrana plasmática, o tráfego de vesículas e a curvatura da membrana (Abmayr et al., 2012).

### 1.6 Neogenina, BMP e o tecido muscular esquelético

Ambas as vias de sinalização associadas a RGMa até o momento já foram isoladamente relacionadas com o tecido muscular esquelético. Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão de Neogenina foi observada na diferenciação de músculos e cartilagens de embriões no estágio E14.5 (Fitzgerald et al., 2006). Neogenina foi encontrada como altamente expressa no tecido muscular de camundongos e apresentou um padrão de expressão mais forte no sarcolema do que no sarcoplasma das fibras musculares (Rodriguez et al., 2007). A Neogenina também já foi associada à miogênese juntamente com seu ligante Netrina, um orientador de axônio (Kang et al., 2004). Células musculares que super-expressaram Neogenina e foram simultaneamente tratadas com Netrina-2, apresentaram miotubos mais largos, com aumento no número total de núcleos, sugerindo um fenótipo hiperplásico dessas

células pela incorporação de novos núcleos (Kang et al., 2004). Camundongos homozigotos apresentando mutação do gene que codifica a Neogenina apresentaram miotubos menores e com menor quantidade de núcleos. Esses defeitos foram associados a baixos níveis das formas ativadas das quinases FAK e ERK e a ineficiente expressão de Miogenina (Bae et al., 2009). Fenótipos semelhantes foram observados para os ligantes de Neogenina, Netrina e RGMc (Bae et al., 2009). Neogenina-CDO-Netrina foi descrita ativando bHLH e NFAT, que são fatores de transcrição pró-miogênicos (De Vries & Cooper, 2008).

Estudos também vêm mostrando que a via BMP-Smad1/5/8 atua como um importante regulador positivo do crescimento das miofibras adultas (Sartori et al., 2013; Winbanks et al., 2013). A regulação da sinalização ocorre por meio da competição entre BMP e a via da Miostatina/Ativina/TGF $\beta$  (via regulatória negativa da massa muscular), pela ligação aos receptores do tipo II, ou durante o recrutamento de receptores do tipo I diferentes (Sartori & Sandri, 2015). A sinalização BMP também possui um papel no controle funcional de células satélites, as células-tronco musculares adultas, uma vez que durante sua ativação e proliferação, as células satélites expressam altos níveis de ALK3, ativando a fosforilação de Smad1/5/8 (Sartori & Sandri, 2015). Os mecanismos responsáveis por promover um quadro hipertrófico por meio de BMP envolvem, aparentemente, uma conexão entre BMP/ALK3/Smad1/5/8 e Akt/mTOR já que, como mostrado por Sartori e Sandri (2015), a inibição da sinalização por mTOR é suficiente para parcialmente prevenir a hipertrofia da musculatura esquelética mediada por BMP. Durante a diferenciação *in vitro*, a sinalização BMP tem um papel oposto: células C2C12 tratadas com inibidor da sinalização de BMP, dorsomorfina e seu antagonista Noggin, promovem o aumento da expressão de proteínas miogênicas e da formação de miotubos (Horbelt et al., 2015). A super-expressão de BMP4 impediu a diferenciação miogênica de células-tronco; enquanto que o tratamento com Noggin promoveu nessas células indução a diferenciação em miotubos (Jiqing et al., 2015).

A sinalização BMP na musculatura esquelética mostrou ser necessária na fase de manutenção da proliferação das células satélites e dos progenitores musculares (Ono et al., 2011; Friedrichs et al., 2011); enquanto que a inibição da sinalização BMP induziu a saída do ciclo celular e a indução a formação de miotubos (Friedrichs et al., 2011).

Nesse contexto RGMa, Neogenina e BMP foram associados a fenótipos de hiperplasia e hipertrofia da musculatura esquelética, mas de formas independentes. Portanto, este

trabalho pretende investigar se RGMa está associado a BMP e/ou Neogenina para induzir hipertrofia e hiperplasia nas células musculares esqueléticas.

O tecido muscular esquelético é um dos órgãos mais dinâmicos do corpo, pois possui alta plasticidade sendo capaz de alterar seu fenótipo em resposta a alterações fisiológicas ou ambientais em termos de tamanho, composição e metabolismo. Estímulos hipertróficos induzem aumento de massa ou número de fibras formadas, e ocorrerem durante o desenvolvimento embrionário, indução de sobrecarga mecânica, estimulação hormonal ou através de melhoramento genético (Fiems *et al.*, 2012; Schiaffino *et al.*, 2013). Já estímulos atróficos modulam o fenótipo muscular através de diminuição da massa e força muscular, que podem ser induzidos pelo envelhecimento, desnutrição, câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, perda de conexão neural e miopatias musculares hereditárias como a Distrofia Muscular de Duchenne (Schiaffino *et al.*, 2013). Várias de sinalizações são envolvidas na regulação de massa (Schiaffino *et al.*, 2013), no entanto novas moléculas, como RGMa, também vem sendo associadas. Elucidar os mecanismos que resultam em perda e ganho de massa muscular podem gerar alvos biotecnológicos tanto para a indústria, como para o tratamento de perda muscular.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo investigar as vias de sinalização induzidas pela Molécula Orientadora Repulsiva a (RGMa) que levam a hipertrofia e hiperplasia das células musculares esqueléticas durante sua diferenciação.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Caracterizar os efeitos de RGMa na forma de proteína recombinante (rcRGMa; R&D Systems) na fase tardia da diferenciação de células C2C12;
2. Avaliar os efeitos do tratamento de rcRGMa na fase inicial da diferenciação de células C2C12;
3. Avaliar se os efeitos de rcRGMa nas células C2C12 podem ser observados na presença de um inibidor da via de sinalização BMP, conhecido como Dorsomorfina;
4. Avaliar se os efeitos de rcRGMa nas células C2C12 podem ser potencializados com a super-expressão do receptor Neogenina;
5. Avaliar os efeitos de rcRGMa na viabilidade das células musculares esqueléticas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Cultura de células musculares esqueléticas

Mioblastos de camundongos da linhagem C2C12 foram cultivados em meio de crescimento (MC): *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose* (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®) e 1% de antibiótico e antimicótico (Anti-anti Gibco®), a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As passagens das células ocorreram quando as células atingiam 70% de confluência, pela ação da Tripsina 0,25%/EDTA (Gibco®). As células foram usadas entre a terceira e décima passagens.

Os experimentos foram realizados em placas de cultura de 24 poços, com as células C2C12 plaqueadas na densidade de 2x10<sup>4</sup> células/ml/poços, sem lamínula, com o fundo tratado com gelatina suína (Sigma-Aldrich®) 3% em PBS.

Mioblastos começam a se diferenciar de duas formas: (i) alta confluência (contato célula a célula) e (ii) por redução da porcentagem e tipo de soro introduzido no meio de cultura. Neste trabalho, a diferenciação celular foi induzida após 24 horas de incubação, pela substituição do MC por meio de diferenciação (MD): DMEM (Gibco®) suplementado com 2% de soro de cavalo (Gibco, Life Technologies®) e 1% de antibiótico e antimicótico (Anti-anti Gibco®).

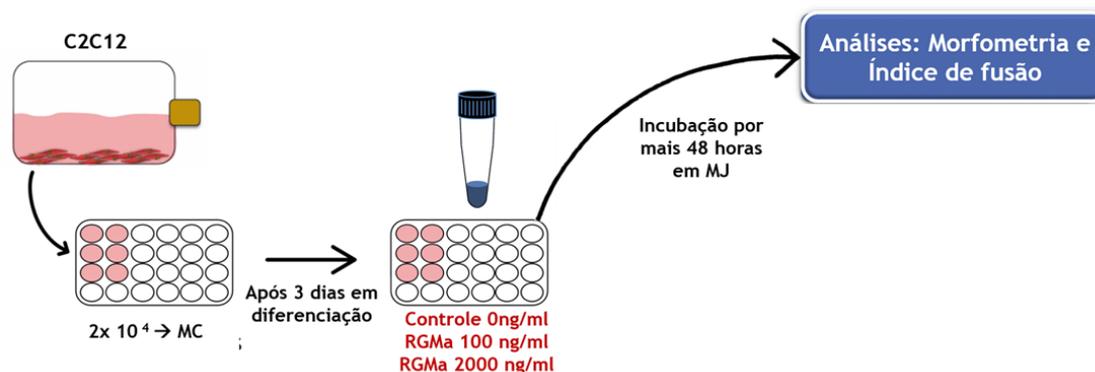
Nos experimentos envolvendo dorsomorfina e da proteína recombinante foi utilizado o meio de jejum (MJ): DMEM-*high* suplementado com 0,2% de SFB (Horbelt *et al.*, 2015) por 3 horas antes da adição dos tratamentos, desse modo reduzimos a interferência do soro nos tratamentos.

Após a adição de MD ou MJ as células foram incubadas por 3 dias (para a indução da diferenciação inicial caracterizada pelo aparecimento inicial de células sinciciais/miotubos); e 5 dias (para a indução da diferenciação tardia, quando foi possível observar um número de miotubos multinucleados na cultura, suficiente para as análises). Os experimentos foram realizados uma vez, utilizado 3 poços por grupo, devido a utilização de uma linhagem celular imortalizada e homogênea e o n amostral foi obtido a partir do número de células.

#### 3.2 Análise dose-efeito da proteína recombinante RGMA (rcRGMA) durante a diferenciação celular

A forma de RGMA utilizada nos experimentos foi rcRGMA, que possui 25-37 KDa (R&D Systems) vai dos aminoácidos Cys48 (pro-proteína) & Pro170 (madura) sendo portanto

considerada como apenas uma parte da proteína RGMa, na forma solúvel. Determinamos as seguintes concentrações de rcRGMa: 100 e 2000 ng/ml, em função dessas concentrações, da mesma proteína, já terem sido utilizadas previamente na literatura para outros tipos celulares (O'Leary *et al.*, 2013; Harada *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Para isso, as células C2C12 foram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^4$  células/ml/poço em placas de 24 poços, em MC e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o MC foi substituído por MD e as células incubadas por 3 dias (Figura 9). Após este período de diferenciação inicial, as células foram incubadas por 3 horas em MJ, seguido do tratamento com rcRGMa adicionada nas concentrações determinadas, também em MJ. As células C2C12 utilizadas como controle foram incubadas apenas com meio de cultura uma vez que o veículo de ressuspensão da proteína recombinante foi PBS. As células foram incubadas por um período adicional de 48 horas, nas mesmas condições totalizando 5 dias em diferenciação, seguido de análise morfométrica (descrita no item 3.7.1).



**Figura 14. Desenho experimental da análise dose-efeito rcRGMa.** Para o estabelecimento da concentração de rcRGMa em mioblastos da linhagem C2C12, as células foram tratadas com rcRGMa 100 ng/ml e 2000 ng/ml.

### 3.3 Tratamento de células C2C12 com rcRGMa

Os experimentos foram realizados após o estabelecimento da concentração ideal de rcRGMa (100 ng/ml). Neste trabalho, rcRGMa foi adicionada às células em dois momentos diferentes do processo de diferenciação miogênica:

*(i) tratamento de diferenciação tardio:*

Corresponde ao período de diferenciação da cultura que forma um número de miotubos considerável e suficiente para análise. Para isso as células C2C12 foram plaqueadas em MC e,

após 24h, o meio foi substituído por MD e incubadas por 3 dias. Após 3 dias, as células foram incubadas com MJ por 3 horas, seguido da adição de DM e/ou rcRGMa, nas concentrações previamente determinadas, por um período adicional de 2 dias. As células C2C12 utilizadas como controle foram incubadas apenas com meio de cultura. Os efeitos do tratamento tardio dos mioblastos com rcRGMa foram avaliados nas células já diferenciadas em miotubos multinucleados, pelo (a) análise morfométrica e índice de fusão (descrita no item 3.7.1); (b) quantificação de todas as células MF20 positivas presentes em 20 campos; e (c) pela análise da expressão de genes miogênicos por RT-PCR quantitativa (descrita no item 3.7.2).

*(ii) tratamento de diferenciação inicial:*

Correspondeu à análise dos efeitos do tratamento com rcRGMa antes do início do processo de diferenciação. Para isso, as células C2C12 foram plaqueadas à  $2 \times 10^4$  células/ml/poço em placas de 24 poços, em MC e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o MC foi substituído por MJ por 3 horas e posteriormente tratadas com 100 ng/ml de rcRGMa por 3 dias. As células C2C12 utilizadas como controle foram incubadas apenas com meio de cultura. Os efeitos do tratamento inicial dos mioblastos com rcRGMa foram avaliados nas células já diferenciadas em miotubos multinucleados, pela (a) quantificação de todas as células MF20 positivas presentes em 15 campos; e (b) pela análise da expressão de genes miogênicos por RT-PCR quantitativa (item 3.7.2).

### **3.4 Análise dose-efeito do inibidor Dorsomorfina (DM)**

O bloqueio da via de sinalização BMP foi promovido pelo tratamento dos mioblastos da linhagem C2C12 com um inibidor conhecido como Dorsomorfina (DM). A DM é uma molécula que inibe tanto a sinalização canônica quanto a não-canônica de BMP, por sua afinidade de ligação com os receptores do tipo I (ALK1, 2, 3 e 6) e do tipo II (ActRIIA e ActRIIB).

Trabalhos publicados na literatura do tratamento com DM (Sigma®) em células C2C12, mostraram que o bloqueio nas vias de sinalização de BMP acarreta em indução da diferenciação das células musculares esqueléticas, com concentrações variando entre 5 e 10 µM (Boergemann *et al.*, 2010; Horbelt *et al.*, 2015). Para determinar a menor e mais eficiente concentração de DM para induzir o bloqueio da sinalização BMP nas células C2C12, uma análise dose-efeito foi estabelecida nas concentrações de 5 e 10 µM. Para isso, as células C2C12 foram plaqueadas em MC e, após 24h, o meio foi substituído por MD e incubadas por 3 dias. Após 3 dias, as células foram incubadas com MJ por 3 horas, seguido da adição de DM

nas concentrações estabelecidas. Como controle foi utilizada a cultura de células C2C12 tratadas com o veículo de ressuspensão da droga (DMSO). As células foram incubadas por um período adicional de 48 horas, nas mesmas condições, seguida da análise de aumento na indução da diferenciação celular por western blot. Adicionalmente também foram caracterizados os efeitos morfológicos nas células musculares, após a escolha da concentração a ser utilizada nesse trabalho (descrita no item 3.7.1).

### **3.5 Tratamento de células C2C12 com rcRGMa e DM**

As células C2C12 foram plaqueadas em MC e, após 24h, o meio foi substituído por MD e incubadas por 3 dias. Após 3 dias, as células foram incubadas com MJ por 3 horas, seguido dos seguintes tratamentos: (i) C2C12 tratadas com 5  $\mu$ M de DM; (ii) C2C12 tratadas com 100 ng/ml de rcRGMa; (iii) C2C12 tratadas com 5  $\mu$ M de DM e 100 ng/ml de rcRGMa; e (iv) C2C12 incubadas apenas com meio de cultura como controle. As células foram incubadas por um período adicional de 48h, nas mesmas condições, seguida da análise (a) morfológica e índice de fusão (descrita no item 3.7.1); (b) quantificação de todas as células MF20 positivas.

### **3.6 Tratamento com rcRGMa em células induzidas a super-expressar o receptor Neogenina**

A construção pcDNA3-Neogenina utilizada para promover a super-expressão deste receptor em células C2C12 foram obtidas em colaboração com o Dr. Alain Chédotal (Institut De La Vision, Paris, França). O clone foi construído com base na sequência de *Gallus gallus*, que apresenta 100% de similaridade com a sequência de aminoácidos de *Mus musculus*.

Para promover a super-expressão de Neogenina nos mioblastos da linhagem C2C12, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços pré-revestidas com gelatina, na densidade de  $2 \times 10^4$  células/ml/poço, ainda em MC, e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, as células foram transfectadas seguindo-se o protocolo dos fabricantes do reagente Lipofectamina 3000 (Life Technologies). Resumidamente, 1,5  $\mu$ l de Lipofectamina 3000 foi diluído em 25  $\mu$ l de meio Opti-MEM. Em outro tubo, 2  $\mu$ g do DNA de pcDNA3-Neogenina ou do clone controle pcDNA (vazio) foram diluídos em 50  $\mu$ l de Opti-MEM e 2  $\mu$ l de P3000 Reagent (fornecido pelos fabricantes do *kit*). Em seguida, os dois tubos foram misturados na proporção de 1:1 (25  $\mu$ l de cada) e incubados por 5 min a TA. Após a incubação, os 50  $\mu$ l totais do complexo

Lipofectamina:DNA foram adicionados às células (cultivadas em MC), que foram incubadas por 48 h à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio foi substituído por MD e incubados por um período de 24 e 72 h. A super-expressão de Neogenina foi confirmada por RT-PCR quantitativa (conforme descrito no 3.7.2).

Após a confirmação do sucesso da super-expressão, mioblastos da linhagem C2C12 foram novamente transfectados conforme descrito acima e, após 48 horas em meio de transfecção, as células foram incubadas por 3 horas em meio de jejum (MJ). A proteína rcRGMa foi então adicionada ao MJ e as células novamente incubadas por um período adicional de 48 h. Os efeitos da super-expressão de Neogenina e/ou tratamento com rcRGMa foram avaliados por (a) índice de fusão (descrita no item 3.7.1); (b) quantificação de todas as células MF20 positivas; e (c) pela análise da expressão de genes miogênicos por RT-PCR quantitativa (descrita no item 3.7.2).

### **3.7 Análises dos efeitos dos tratamentos de mioblastos da linhagem C2C12 com rcRGMa e/ou DM/Neogenina**

#### **3.7.1 Análise morfológica**

Os efeitos dos tratamentos (tardio e inicial) de mioblastos com rcRGMa e/ou DM foram avaliados apenas em células já diferenciadas, marcadas pela expressão de Miosina de Cadeia Pesada (MHC), detectadas por imunocitoquímica.

Para isso, as células C2C12 foram plaqueadas a uma densidade de 2x10<sup>4</sup> células/ml/poço em placas de 24 poços, e submetidas aos tratamentos descritos acima. Ao final de cada tratamento, as células foram fixadas em PFA 4% em PBS por 15 min, e lavadas por três vezes em PBS. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi feito por incubação de 5 minutos em 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com BSA 1% em PBS e incubado por 30 min a temperatura ambiente (TA). Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário anti-mouse MF20 (monoclonal, Hybridoma Bank), diluído 1:200 em PBS, e incubado a 4 °C *overnight*. A incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase foi realizada por 60 min com o sistema EnVision® Systems Dual Link (anti-mouse e anti-rabbit, Dako), à TA. A revelação do conjugado foi realizada por Diaminobenzidina (DAB; Dako) e os núcleos foram contracolorados com hematoxilina por 1 min. Após fixação em PFA 4% por 15 min, as células foram lavadas em PBS.

As imagens utilizadas para análise morfométrica da cultura de células foram obtidas por microscopia óptica invertida (Motic®AE31, USA), acoplado ao sistema de captura Moticom 2300. O comprimento, largura (obtida no ponto de maior largura das células) e área (dada pela multiplicação do comprimento pela largura) de 50 células MF20-positivas por grupo (miotubos primários contendo 2-4 núcleos e miotubos maduros que contém >5 núcleos), provenientes de 20-50 campos analisados, foram utilizados para a obtenção de médias para a análise morfométrica.

O índice de fusão foi determinado pela porcentagem da somatória de núcleos de todas as células MF20-positivas que apresentavam mais de 3 núcleos em um determinado campo, pelo número de núcleos total desse campo, conforme determinado por Millay et al. (2012) e Martins et al. (2015). O índice de fusão foi determinado em 50 campos para cada grupo.

$$\% \frac{\Sigma \text{ núcleos de todas células MF20-positivas}}{\text{Total de núcleos do campo}}$$

Para quantificação do número de células MF20 por campo, foram contabilizadas as células MF20 positivas (>= 3 núcleos) presentes nos 50 campos analisados por grupo. Para quantificação do número de células MF20 por campo no tratamento inicial, aos 3 dias de diferenciação, todas as células MF20 foram quantificadas, independentemente do número de núcleos, provenientes de 15 campos por grupos.

### ***3.7.2 Análise de expressão gênica por RT-PCR quantitativa (RT-PCRq)***

O RNA total das amostras foi isolado seguindo-se as instruções dos fabricantes do Tri Reagent (Sigma-Aldrich). As amostras foram coletadas em triplicata (três poços de placas de 24 poços em 1 ml de Tri Reagent) e os experimentos realizados em duplicata experimental. Resumidamente, às células coletadas em 1 ml de Tri Reagent foram adicionados 200 µl de clorofórmio e os tubos misturados vigorosamente. Após incubação por 5 min em TA, as amostras foram centrifugadas a 13.000 RPM por 15 min a 4 °C. A sobrefase foi transferida para um tubo eppendorf limpo (~400 µl) e o RNA total precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 min de incubação à TA, as amostras foram novamente centrifugadas à 13.000 RPM por 10 min a 4°C. O pellet de RNA total foi lavado com etanol 75% em água tratada com DEPC e ressuspenso em 20 µl de água DEPC. A qualidade do RNA total isolado

foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%; e a quantidade e pureza determinada em espectrofotometro da marca NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher).

O RNA total de cada amostra foi convertido em cDNA utilizando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher). Em resumo, a 1 µg de RNA total (em 10 µl) foram adicionados 2 µl de RT *Buffer* 10X, 2 µl de dNTP *Mix* 25X (100 mM), 0.8 µl de RT *random primers* 10X, 2 µl de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 1 µl de RNase *Inhibitor* e 3.2 µl de água *Nuclease-free* por amostra, totalizando um volume final de 20 µl de reação. As amostras foram incubadas à 25 °C por 10 min, seguido de incubação por 120 min à 37°C e finalmente à 85°C por 5 min, em termo ciclador (MyCycler™ Bio-rad). As amostras de cDNA foram testadas por amplificação de transcritos do gene constitutivo GAPDH por reações de amplificação (RT-PCR), utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 15 seg, 55°C por 15 seg e 72°C por 30 seg.

As reações de amplificação por RT-PCR quantitativa foram realizadas utilizando-se o *Kit iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) no termociclador RotorGene 3000 (Corbett Research, Qiagen), em reação contendo 5 µl de master mix (2x), iniciadores *forward* e *reverse* (Tabela 1) nas concentrações variando de 0,4 a 0,8 µM, 1 µl de cDNA diluído 1:10 (v/v) e 3,2 µl de água. O ciclo da PCR ocorreu a 50°C por 2 min (ativação UDG), 95°C por 2 min (ativação da Taq), seguido de 45 ciclos de 94°C por 15 seg; 60-62°C por 15 seg e 72°C por 20 seg. A detecção da fluorescência ocorreu ao final de cada período de extensão. A confirmação da amplificação específica ocorreu pela análise da curva de *melting*. A quantificação relativa da expressão dos genes foi realizada utilizando-se o software REST 2009 (Pfaffl et al, 2001, 2002). O limiar de detecção (*threshold*, Ct) foi definido como valor de fluorescência 0,05. Foi usado GAPDH como gene referência, neogenina para confirmação da super-expressão; Genes de desenvolvimento muscular: MyoD, Myf5, Miogenina (MyoG); Genes de diferenciação muscular: Desmina, miosina de cadeia pesada 3 (MyH3), miosina de cadeia pesada 5 (MyH5a); Gene associado ao ciclo celular: Ciclina D1. A linha vermelha dos gráficos de qPCR representam a expressão gênica dos grupos controles. Todos os *box plots* que estão acima da linha vermelha representam genes que tiveram sua expressão aumentada pelo tratamento em relação ao controle. Os *box plots* que estão abaixo da linha vermelha representam genes que tiveram expressão regulada negativamente pelo tratamento.

**Tabela 1.** *Primers* referência e alvos utilizados nas análises de expressão gênica.

Alvo	Genbank	Sequência (Foward e Reverse)	Tamanho (pb)	Ta (°C)
GAPDH	NM_001289726.1 NM_008084.3	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	200	62
Neogenina	NM_001042752.1	TCCGTTTTATTTTCTGGTGGGA CGTCAGGCTTATTGTGTTTGG	218	62
MyoD1	GI_170172578	GTG GCA GCG AGC ACT ACA GAC ACA GCC GCA CTC TTC	178	62
Myf5	GI_240120094	ACT GGC GTG TCT CC TCT CT TCA AAC TGG TCC CCA AAC TC	154	62
Miogenina	GI_162287254	TGA GAG AGA AGG GGG AGG AG CGG TAT CAT CAG CAC AGG AG	161	62
Desmina	GI_33563249	GTG GAG CGT GAC AAC CTG AT - ATG TTC TTA GCC GCG ATG GT	335	60
MyH3	NM_001099635.1	GCAAAGACCCGTGACTTCAC GCATGTGGAAAAGTGATA	155	60
MyH5a	GI_115511051	TTC CCC CAC TTC CCT AAT CT CTG CTG TGC TGG TGT GTC TT	206	62
Ciclina D1	GI_119672895	TCTACACTGACAACTCTATCC G TAGCAGGAGAGGAAGTTGTTG G	304	60

### **3.8 Análise de expressão proteica por Western Blot**

Para as análises de Western Blot, as células C2C12 tratadas foram coletadas em 0,6 ml de PBS com triton X100 (a cada 4 poços) na presença de inibidores: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF-Sigma-Aldrich), Pepstatina A (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich), E-64 *trans*-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane, L-*trans*-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, N-(*trans*-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide (Sigma-Aldrich) e Ortovanato de sódio (Sigma-Aldrich). Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex, centrifugadas a 10.000 RPM, 4°C por 5 min e armazenadas a -80°C. As proteínas foram quantificadas por ensaio de Bradford. Posteriormente 30 ug de proteínas foram diluídas 4:0,5 em solução do tampão Tris 0,5 M (pH 6,8) com SDS 10% (Sigma-Aldrich), glicerol, β-mercapetanol e azul de bromofenol 10%, e incubado em banho-seco a 100°C por 5 min.

Alíquotas de 30 µg de cada proteína foram separadas por eletroforese durante aproximadamente 3h de corrida a 24A, em gel de SDS poliacrilamida desnaturada à 12-20% (dependendo do tamanho da proteína alvo) e transferidas a 100 mA por 60 min, para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare). O bloqueio foi realizado com BSA 1% (Albumin bovine, Sigma) e 5% de leite desnatado por 5 min. A incubação com os anticorpos primários contra β-Actina (camundongo monoclonal 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) e Desmina (coelho policlonal 1:500 Imuny), foram realizadas ON a 4°C. Após lavar com PBST (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> com Tween 0,5%), as membranas foram incubadas por 30 min com os anticorpos secundários biotinizados anti-cabra (Vectastain® ABC Kit), e posteriormente incubados com ABC reagente ou anticorpo anti-coelho (EnVision® Systems Dual Link), seguida por novas lavagens com PBST. A revelação foi realizada com 3,30-47 diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich), 4-Chloro-1-Naphthol (Amresco) e peróxido de hidrogênio 30% (Sigma-Aldrich) por 1 min a TA. As imagens foram obtidas usando um *scanner*.

### **3.9 Ensaio de MTT**

A viabilidade das células tratadas por 1, 3 e 5 dias com 100ng/ml de rcRGMa em MC e por 1, 3 e 5 dias com rcRGMa em MD foi determinado pelo ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolin] (Life Technologies). O ensaio de MTT baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, de converter o sal de tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de azul de formazan, que são insolúveis em água e de cor azul escura. A quantidade de cristais de azul de formazan produzidos é proporcional ao número de células viáveis na cultura. Células ativas produzem mais formazan do que as células com baixa atividade metabólica, o que permite a medida da viabilidade, mesmo na ausência de proliferação (Mosmann, 1983).

As células C2C12 foram plaqueadas conforme descrito anteriormente (Item 3.1). Após 24 h de incubação, o MC foi substituído por MJ e as células incubadas por 3 h. Em seguida, foi adicionado 100 ng/ml de rcRGMa e as células incubadas por 1, 3 e 5 dias em MC; ou por 1, 3 e 5 dias em MJ. As células utilizadas como controle foram incubadas apenas com meio de cultura. Ao final de cada período de cultivo, as células foram incubadas com MTT (5 mg/mL em PBS) por 2 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após lavagem com PBS para retirada do meio de cultura, acrescentou-se 1 ml de isopropanol ácido por poço, para que os cristais de formazan fossem

dissolvidos. Alíquotas de 100 ul de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços em triplicata, para leitura em ELISA (Elx 800-Biotek) e determinação da densidade óptica a 595 nm. As análises foram realizadas em 3 experimentos independentes.

### **3.10 Análises estatísticas**

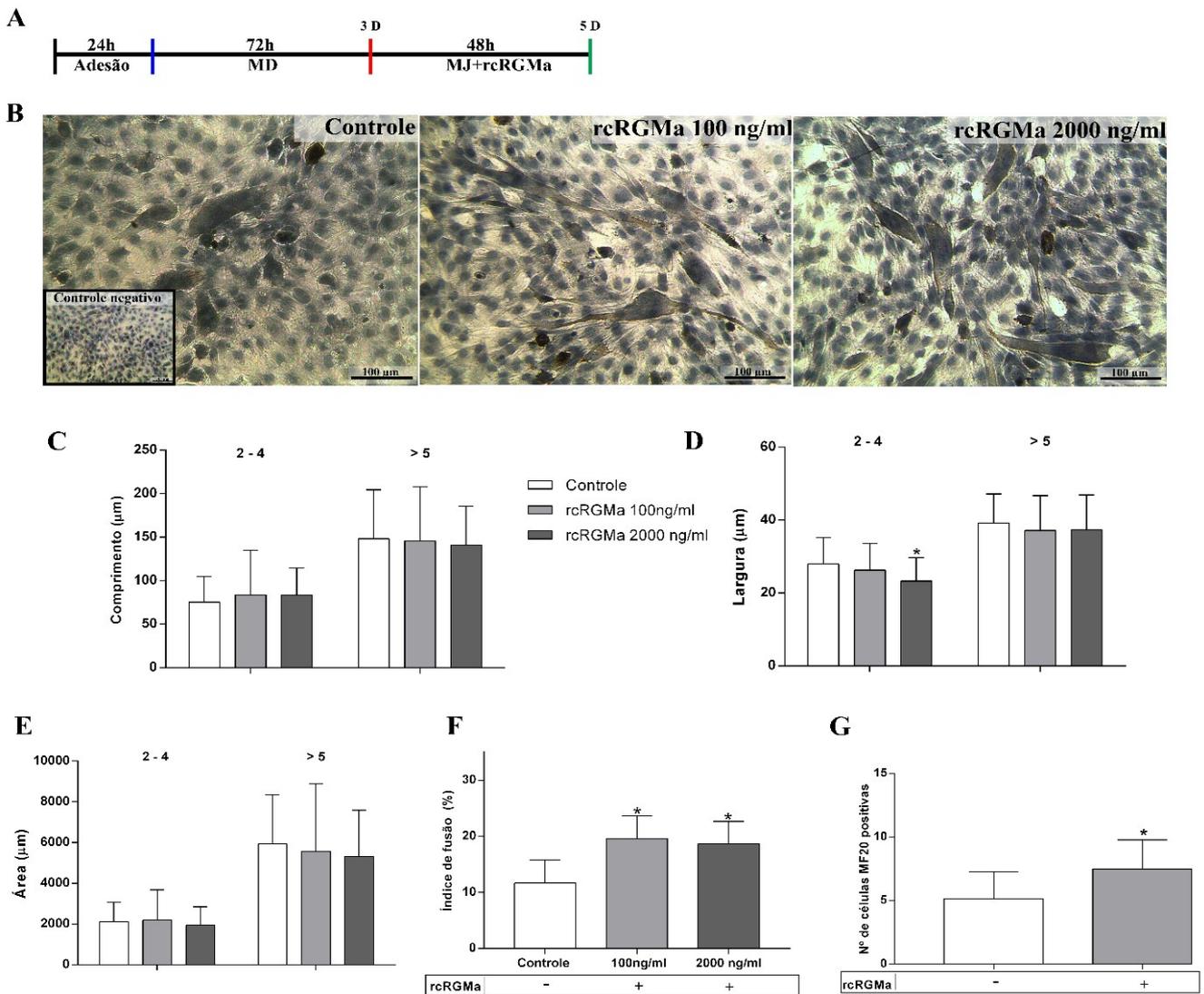
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Prisma<sup>®</sup> versão 6.01 (2012). As análises estatísticas foram performadas baseando-se no número de células ou campos dos diferentes grupos. Para as análises de alinhamento celular e quantificação do número de células MF20-positivas foi utilizado o t-test não pareado. Para análises de comparações entre mais de 3 grupos foi utilizado ANOVA. One-way ANOVA foi utilizado quando um parâmetro apenas era analisado; e Two-way ANOVA quando mais de um parâmetro foi analisado simultaneamente. Todas as análises foram realizadas pelo teste secundário de Sidack's. Os resultados observados foram significativos quando  $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$ . Para análises de quantificação relativa de expressão gênica foi utilizando o *software* REST 2009 (Pfaffl et al., 2001; 2002).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos efeitos de rcRGMa na fase de diferenciação tardia em mioblastos da linhagem C2C12

O tratamento tardio de células C2C12 com rcRGMa solúvel, induziu um efeito significativo ( $*p < 0,01$ ) no índice de fusão de mioblastos em miotubos multinucleados, em ambas as concentrações utilizadas (100 e 2000 ng/ml; Figura 15F). Não houve diferença significativa no índice de fusão obtido entre a menor e maior concentração (Figura 15F). Por outro lado, rcRGMa não foi capaz de influenciar significativamente o comprimento (Figura 15C), a largura (Figura 15D) e conseqüentemente a área (Figura 15E) dos miotubos multinucleados. Na concentração de 2000 ng/ml, rcRGMa induziu uma diminuição significativa da largura de células contendo de 2 a 4 núcleos (Figura 15C). Em (Figura 15G) rcRGMa 100ng/ induziu um aumento no número de células MF20 positivas.

Juntos, estes resultados indicaram (i) um efeito significativo de rcRGMa exclusivamente na indução da hiperplasia muscular e (ii) que a concentração de 100 ng/ml era suficiente para induzir esses efeitos nestas células *in vitro*.

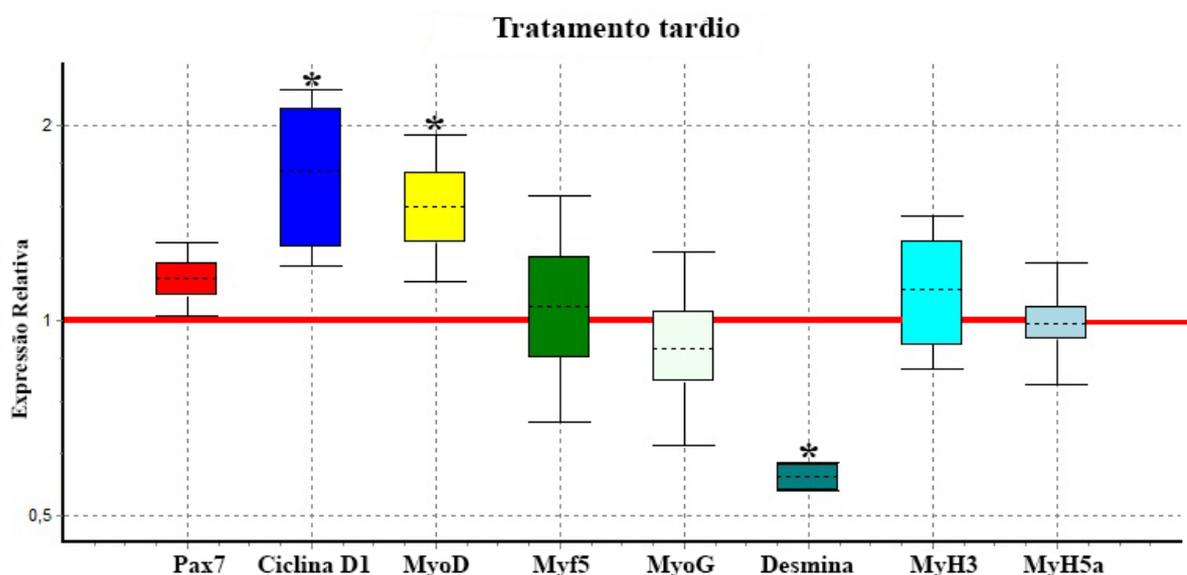


**Figura 15. Determinação da concentração e caracterização dos efeitos do tratamento tardio de mioblastos da linhagem C2C12 com rcRGMa.** Em (A) esquema representativo do delineamento experimental. Em (B), imagem representativa dos resultados de imunocitoquímica para Miosina sarcomérica de células controle e tratadas, com 100 ng/ml de rcRGMa, e 2000 ng/ml de rcRGMa. Em menor destaque o controle negativo experimental. Em (C, D e E), resultados das análises morfológicas dos efeitos das diferentes concentrações de rcRGMa no comprimento (C), largura (D) e área (E), as análises foram realizadas em células em estágio inicial de diferenciação (contendo de 2-4 núcleos; n=50) e maduras (> 5 núcleos, n=50). Em (F), resultados da análise do índice de fusão indicando efeitos positivos de rcRGMa na indução da hiperplasia muscular: rcRGMa induziu um maior índice de fusão (Aproximadamente o dobro; hiperplasia) com ambas as concentrações testadas, n= 20 campos. Em (G), resultados da análise do número de células MF20 induzidas indicando efeitos positivos de rcRGMa 100 ng/ml na indução a formação de um maior número de células diferenciadas, cujo n=20 campos. \*p<0,01 vs. Controle. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando one-way e Two-way ANOVA e teste secundário de Sidack's.

Os efeitos do tratamento tardio de células C2C12 com 100ng/ml de rcRGMA também foram avaliados sobre o número de células que expressavam miosina sarcomérica. Nossos resultados mostraram que rcRGMA induziu um aumento no número de células MF20 positivas (Figura 15G).

Os efeitos do tratamento tardio de células C2C12 com rcRGMA também foram avaliados sobre a expressão de marcadores miogênicos por RT-PCRq (Figura 16). O tratamento de diferenciação tardio de mioblastos com rcRGMA induziu um aumento significativo de MyoD (1,5 vezes) e de Ciclina D1 (1,6 vezes), comparado ao controle (\* $p < 0.05$ ; Figura 16). Curiosamente, este tratamento também induziu uma diminuição significativa na expressão de Desmina (2 vezes), comparado ao controle (\* $p < 0.05$ ; Figura 16). Não observamos diferença estatística na expressão de Pax 7, Mfy5, Miogenina, MyH3 e MyH5a.

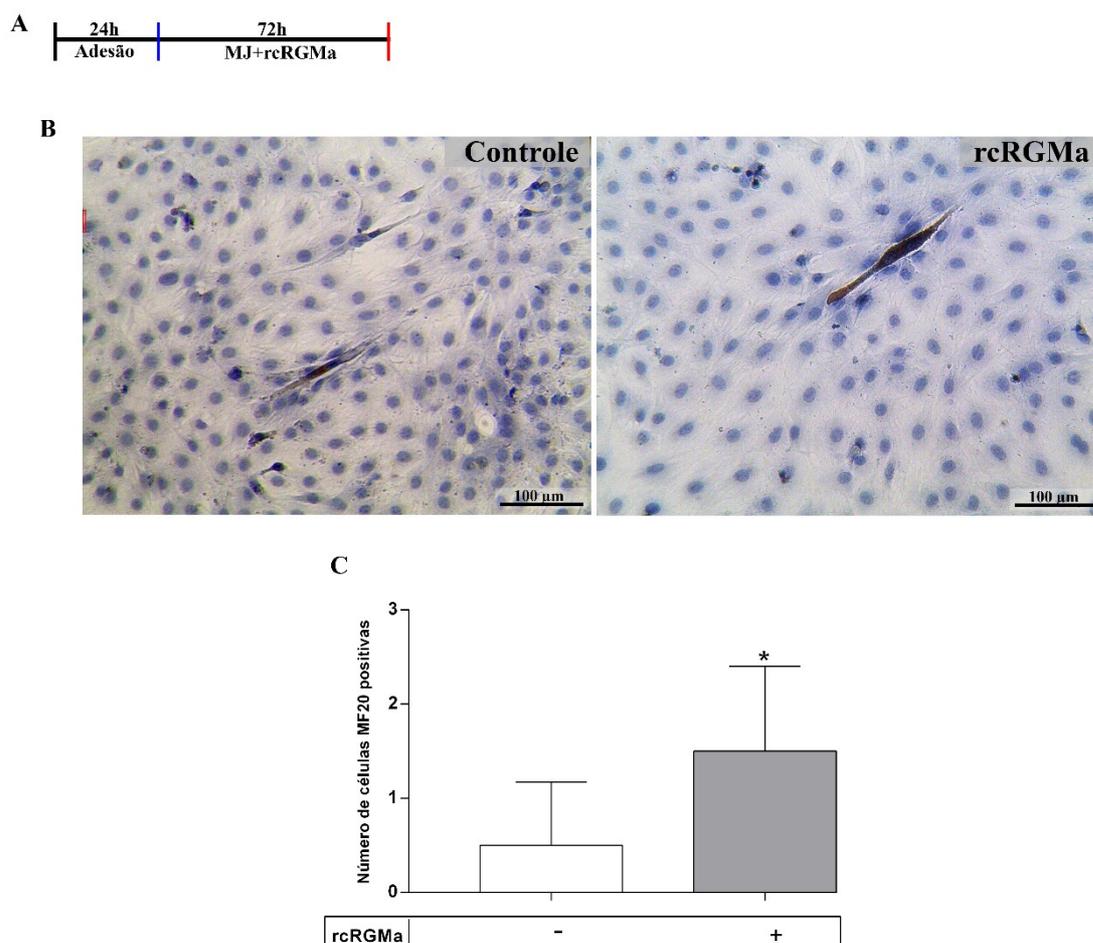
Estes resultados sugerem que (i) rcRGMA é capaz de induzir um aumento no número de células diferenciadas, comparado ao controle; e que (ii) o tratamento com rcRGMA de células que já iniciaram o processo de diferenciação miogênica induziu a re-ativação de fatores de que determinam a proliferação de mioblastos, e reprimiu a expressão de marcadores de diferenciação tardia.



**Figura 16. Quantificação da expressão relativa de genes do programa miogênico e de ciclo celular em células musculares esqueléticas tratadas com rcRGMA na diferenciação tardia.** O gráfico representa os resultados obtidos por qRT-PCR. Nossos resultados mostraram que rcRGMA é capaz de induzir aumento significativo na expressão relativa de MyoD e Ciclina D1; e uma diminuição significativa a expressão relativa de Desmina. \* $p < 0,05$  vs. Controle. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando REST (Pffal et al., 2001, 2002).

## 4.2 Avaliação dos efeitos rcRGMa na fase de diferenciação inicial de mioblastos

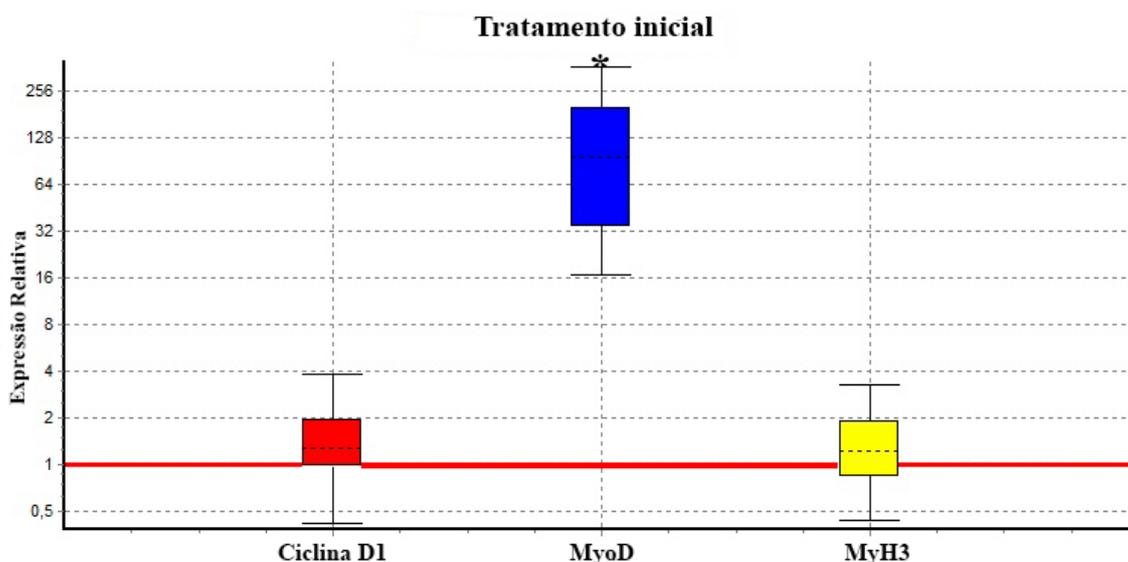
O tratamento inicial de mioblastos da linhagem C2C12 com rcRGMa induziu a formação de poucos ou nenhum miotubos primários contendo de 1-3 núcleos (Figura 17B), impossibilitando a análise do índice de fusão. Efeitos significativos foram apenas observados no número de miotubos que expressavam Miosina sarcomérica (chamadas de células MF20 positivas), comparado ao controle (Figura 17C).



**Figura 17. O tratamento inicial de mioblastos com rcRGMa induz a diferenciação miogênica.** Em (A) esquema representativo do delineamento experimental. Em (B), imagem representativa dos resultados de imunocitoquímica para Miosina sarcomérica de células controle e tratadas com rcRGMa. Em (C), o tratamento inicial dos mioblastos com rcRGMa induziu um aumento significativo no número de células MF20 positivas, cujo n=15 campos. \* $p < 0,01$  vs. controle. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando T-test não pareado.

Os efeitos do tratamento inicial de células C2C12 com rcRGMa também foram avaliados sobre a expressão de marcadores miogênicos por RT-PCRq (Figura 18). O tratamento inicial de mioblastos com rcRGMa induziu um aumento significativo na expressão de MyoD (77 vezes), comparado ao controle (Figura 18). O tratamento inicial não alterou a expressão de Miosina de Cadeia Pesada 3 (MyH3) e de Ciclina D1 (Figura 18).

Estes resultados sugeriram que (i) rcRGMa é capaz de induzir a diferenciação precoce de células musculares; (ii) provavelmente via uma hiper-ativação de MyoD.



**Figura 18.** Efeitos do tratamento inicial com rcRGMa na expressão relativa de genes do programa miogênico. Por qRT-PCR, rcRGMa se mostrou capaz de induzir aumento significativo na expressão relativa de MyoD. \* $p < 0,05$  vs. Controle. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando REST (Pffal et al., 2001; 2002).

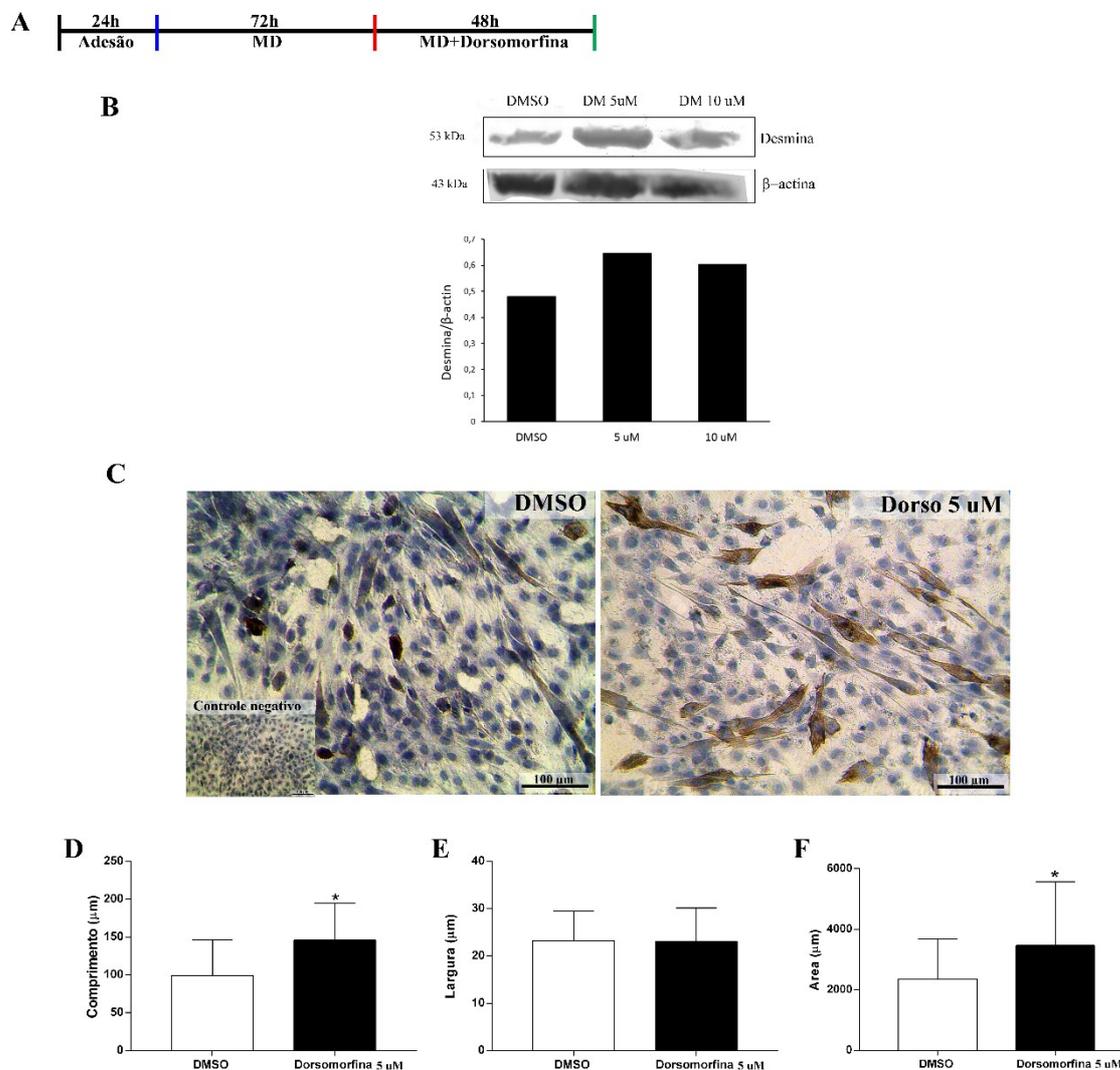
### 4.3 Avaliação dos efeitos de rcRGMa na presença do inibidor da via de sinalização BMP, DM, em células musculares esqueléticas

#### 4.3.1 Dose-efeito de DM em mioblastos da linhagem C2C12

Para determinar a menor e mais eficiente concentração de DM para induzir o bloqueio da sinalização BMP nas células C2C12, foram testadas as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  já descritas na literatura. Ambas as concentrações de DM testadas foram capazes de induzir um aumento na expressão de Desmina (Figura 19B). O tratamento com DM 5  $\mu\text{M}$  provocou um aumento significativo (\* $p < 0.01$ ) no comprimento das células, comparado com o controle (Figura 19D). Um aumento significativo na área das células tratadas com esta concentração também foi

observado (Figura 19F); mas não observamos efeitos significativos na largura dessas células (Figura 19E).

Juntos, estes resultados indicaram que a concentração de 5  $\mu\text{M}$  era suficiente para induzir a diferenciação miogênica nestas células *in vitro*.



**Figura 19. Caracterização da indução miogênica em cultura de mioblastos a partir do bloqueio da sinalização BMP por Dorsomorfina (DM).** Em (A) esquema representativo do delineamento experimental. Em (B), resultados de western blot para Desmina de células controle (0,05% de DMSO) e tratadas, com 5 e 10  $\mu\text{M}$  de Dorsomorfina. A expressão de Desmina se mostrou maior quando comparado ao controle em ambas as concentrações utilizadas,  $n=1$ . Em (C) imagem representativa dos resultados de imunocitoquímica para Miosina sarcomérica. Em (D, E e F), resultados das análises morfométricas dos efeitos do bloqueio da via de BMP, no comprimento (D), largura (E) e área (F) de maneira independente do número de núcleos,  $n=100$  células. \* $p<0,01$  vs. Controle. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando T test não pareado e teste secundário de Sidack's.

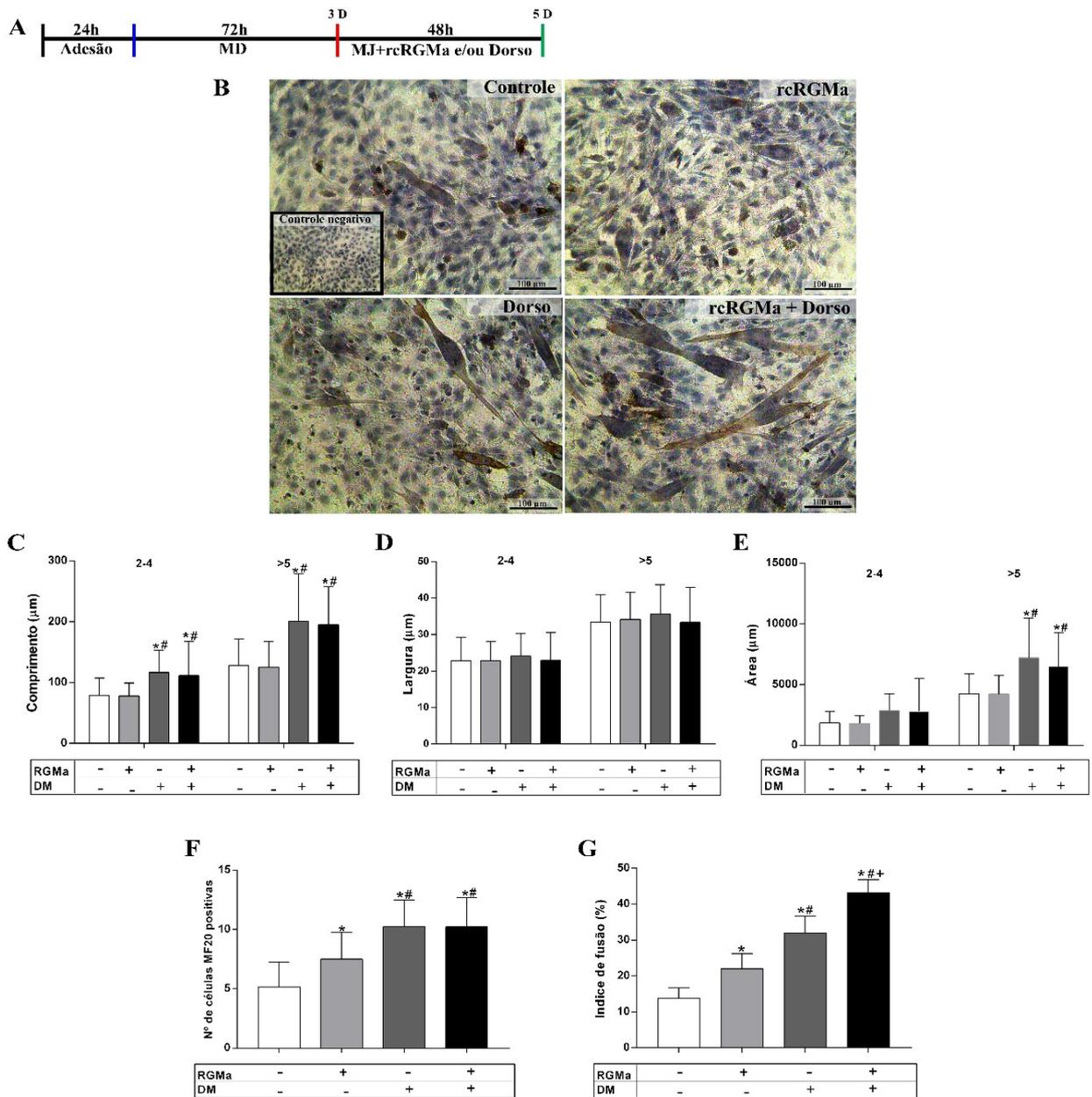
### **4.3.2 Caracterização dos efeitos dos tratamentos de DM e rcRGMa nas células musculares esqueléticas**

O tratamento tardio de mioblastos exclusivamente com rcRGMa efetivamente não foi capaz de induzir alterações no comprimento, largura e área de miotubos primários (2-4 núcleos) e de miotubos maduros (>5 núcleos; Figura 20C-E). Efeitos significativos na morfologia das células foram observados com o tratamento com DM: o bloqueio da via de sinalização BMP induziu um aumento no comprimento de miotubos primários e miotubos maduros e também na área de miotubos maduros (Figura 20C e E). O tratamento simultâneo de mioblastos com rcRGMa+DM também induziu um aumento significativo no comprimento de ambos os tipos de miotubos (Figura 20C) e aumento da área de miotubos maduros (Figura 20E), mas este aumento foi similar ao efeito observado com o tratamento de DM apenas (Figura 20C e E). Tanto o tratamento com rcRGMa, DM e rcRGMa+DM não induzem efeitos na largura dos miotubos (Figura 20D).

Os efeitos também foram analisados quanto a capacidade dos tratamentos induzirem a formação de células MF20 positivas. Os resultados revelaram que rcRGMa foi capaz de induzir um aumento no número destas células (Figura 20F); mas um número ainda maior de células MF20 positivas foi observado com tratamento com DM (Figura 20F). A associação rcRGMa+DM, no entanto, não revelou um efeito sinérgico (Figura 20F).

Os resultados mostraram ainda que os tratamentos isolados com rcRGMa ou DM foram capazes de induzir um aumento significativo no índice de fusão de mioblastos em miotubos multinucleados, quando comparados ao controle (Figura 20H). O tratamento simultâneo rcRGMa+DM foi capaz de induzir um índice de fusão maior do que o que foi observado em todos os tratamentos isolados (Figura 20H).

Juntos, estes resultados sugeriram que (i) rcRGMa efetivamente não interfere na hipertrofia das células musculares, mesmo com a via BMP bloqueada; (ii) os efeitos de rcRGMa na diferenciação das células musculares parecem ser independentes da via de sinalização BMP; mas que (iii) o bloqueio da sinalização BMP com DM potencializa o papel de rcRGMa no índice de fusão/hiperplasia dos mioblastos.

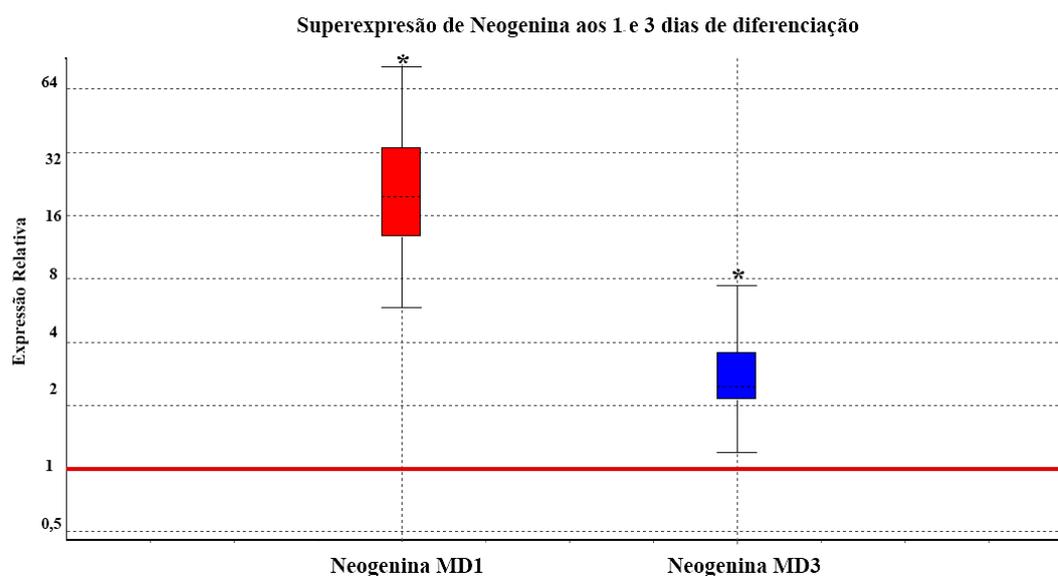


**Figura 20. Efeitos do tratamento de mioblastos com rcRGMa na ausência da via de sinalização BMP.**

Em (A) esquema representativo do delineamento experimental. Em (B), imagem representativa dos resultados de imunocitoquímica para Miosina sarcomérica. Em menor destaque o controle negativo experimental. Em (C), efeitos no comprimento; em (D), na largura e em (E) na área das células. As análises foram feitas em células em estágio inicial de diferenciação (contendo de 2-4 núcleos; n=50) e maduras (> 5 núcleos, n=50). Em (F) a quantificação do número de células MF20 positivas, n= 50 campos. Em (G), o índice de fusão, n= 50 campos. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando one-way ANOVA, Two-way ANOVA e teste secundário de Sidack's. (\*) p<0,01 vs. controle; (#) p<0,01 vs. RGMa e (+) p<0,01 vs. DM.

#### 4.4 Avaliação dos efeitos hiperplásicos de rcRGMA em mioblastos que super-expressam o seu receptor Neogenina

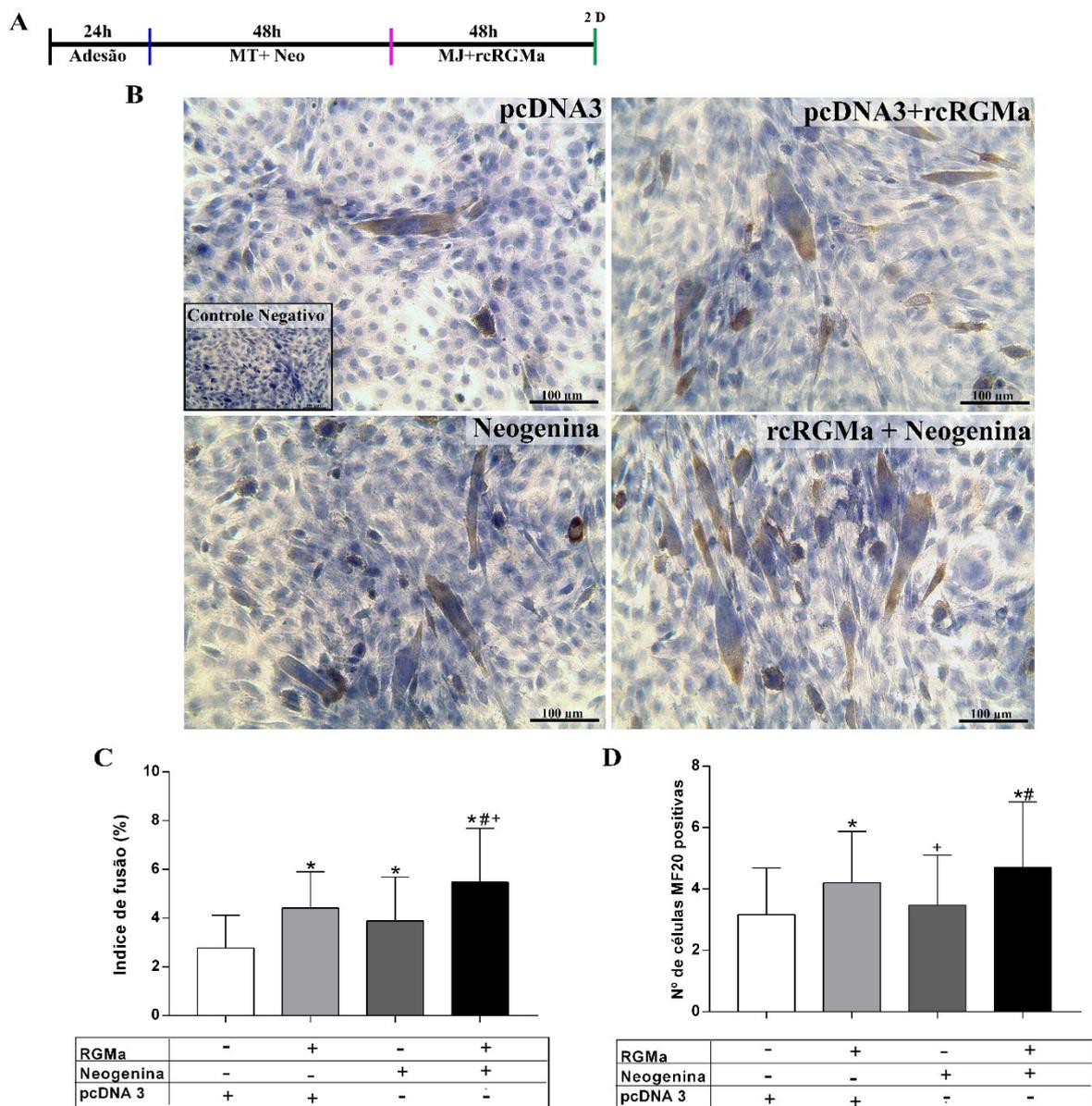
Inicialmente nós buscamos confirmar o sucesso da super-expressão do receptor Neogenina em mioblastos, por RT-PCRq (Figura 21). Os resultados mostraram um aumento de 20,3 vezes na expressão de Neogenina após um dia; e de 2,7 vezes após 3 dias em meio de diferenciação. Estes resultados sugeriram que é possível atingir um aumento na produção dos transcritos que codificam Neogenina em mioblastos pelo protocolo de Lipofectamina.



**Figura 21. Confirmação da super-expressão do receptor Neogenina em mioblastos, por RT-PCRq.** A expressão de Neogenina se mostrou induzida significativamente nos períodos de 1 e 3 dias de cultivo em meio de diferenciação. \* $p < 0,05$  vs. Controle. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando REST (Pffal et al., 2001, 2002).

A fim de avaliar se o efeito de rcRGMA na indução da hiperplasia de mioblastos eram então exercidos via o receptor Neogenina, nós realizamos o tratamento com rcRGMA em mioblastos que estavam super-expressando este receptor. Os resultados mostraram que tanto rcRGMA (4.2 vezes) quanto a super-expressão de Neogenina (3.8 vezes) isoladamente foram capazes de induzir o aumento do índice de fusão de mioblastos, quando comparados ao controle (Figura 22C). Um efeito ainda maior foi observado em mioblastos tratados com a associação rcRGMA+Neogenina: a associação rcRGMA+Neogenina induziu um aumento (5.5 vezes) da fusão de mioblastos em miotubos multinucleados, significativamente maior do todos os outros tratamentos isoladamente (Figura 22C).

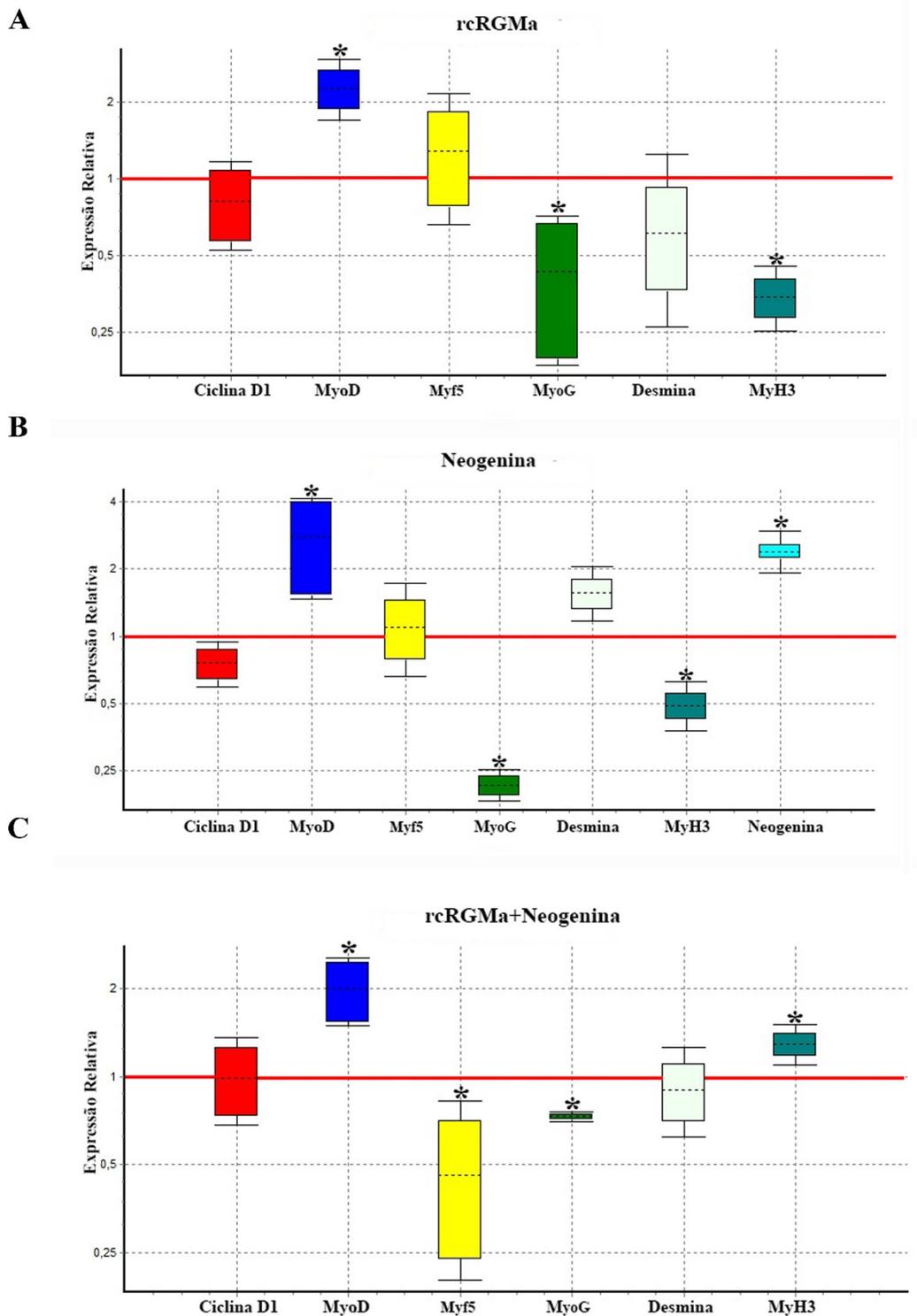
A análise do número de células MF20 positivas revelou que: tanto rcRGMa quanto Neogenina isoladamente aumentaram o número de células MF20 positivas, quando comparados ao controle (Figura 22D). A associação rcRGMa+Neogenina aumenta ainda mais o número de células positivas quando comparados ao controle; mas estes efeitos não foram significativamente maiores quando comparados ao número de células induzidas a produzir Miosina pelo tratamento com rcRGMa isoladamente.



**Figura 22. Efeitos do tratamento com rcRGMa em mioblastos que super-expressam o receptor Neogenina.** Em (A), esquema representativo do delineamento experimental. Em (B), imagem representativa dos resultados de imunocitoquímica para Miosina sarcomérica. Em menor destaque o controle negativo experimental. Em (C), efeitos dos tratamentos sobre o índice de fusão de mioblastos, n= 50 campos; e em (D), sobre o número de células MF20 positivas, n= 50 campos. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando one-way ANOVA e teste secundário de Sidack's. \*p< 0,01 vs. pcDNA3; #p<0,05 vs. pcDNA3 +RGMa e +p<0,01 vs. Neogenina.

Curiosamente, os tratamentos com rcRGMa e Neogenina independentes induziram um perfil de expressão de marcadores miogênicos similar: ambos os tratamentos foram capazes de induzir um aumento significativo da expressão de MyoD; e uma diminuição na expressão de MyH3 e Miogenina, comparados ao controle (Figura 23A e B). A associação de rcRGMa+Neogenina manteve os efeitos positivos sobre a expressão de MyoD e negativos sobre a expressão de Miogenina; mas foi capaz de promover um aumento significativo na expressão de MyH3 e de promover uma diminuição também significativa na expressão relativa de MyF5, quando comparados ao grupo controle (Figura 23C). Nenhum efeito foi observado na expressão de Desmina e Ciclina D1.

Com bases nesses resultados, sugerimos (i) rcRGMa exerce seus efeitos hiperplásicos via ligação com seu receptor Neogenina; (ii) rcRGMa e Neogenina são capazes de promover efeitos similares na expressão relativa de genes relacionados à diferenciação muscular; e que (iii) a associação rcRGMa+Neogenina promove uma indução na expressão de marcadores tardios de diferenciação.



**Figura 23. Expressão relativa de genes do programa miogênico em mioblastos tratados com rcRGMa e seu receptor Neogenina, por RP-PCRq.** Em (A), o tratamento com rcRGMa induziu um aumento significativo da expressão de MyoD e uma diminuição significativa da expressão de MyH3 e Miogenina. Em (B), o tratamento com Neogenina também foi capaz de induzir um aumento na expressão de MyoD; e a diminuição da expressão de MyH3 e Miogenina. Em (C), o tratamento rcRGMa+Neogenina induz um aumento significativo na expressão de MyH3 e a diminuição da expressão de Miogenina e Myf5. \* $p < 0,05$  vs. Controle (células expressando o vetor vazio pcDNA3). Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando REST2009 (Pffal et al., 2001, 2002).

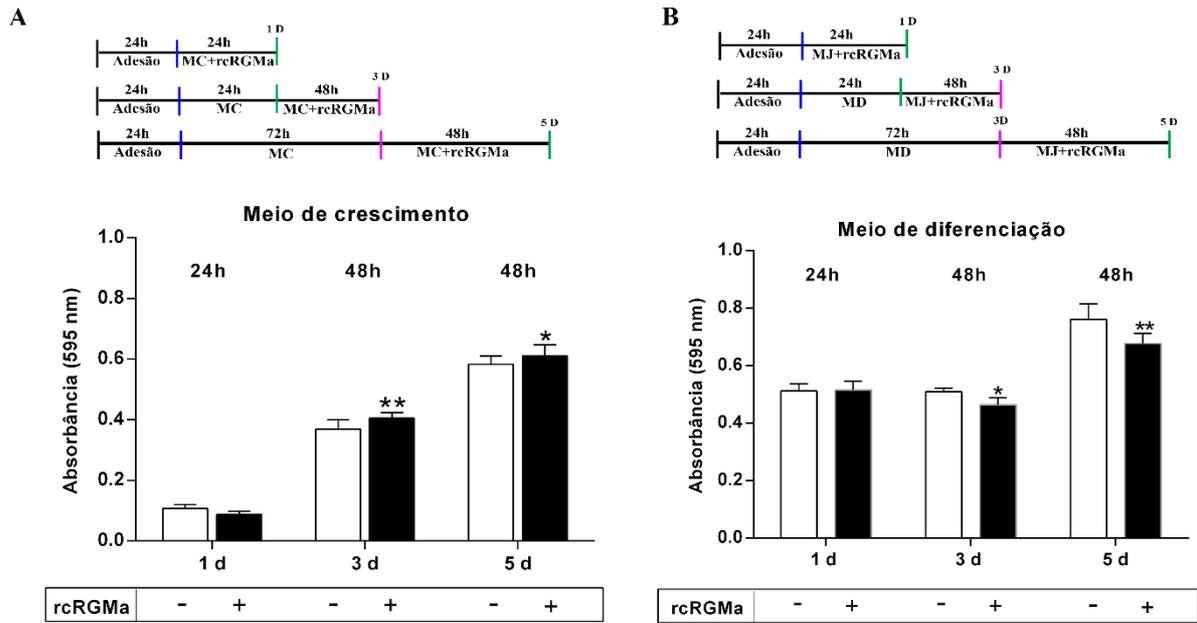
	Desmina	MyoD	Ciclina D1	MyH3	MyoG	MyF5	Neogenina
rcRGMa							
Neogenina							
rcRGMa+Neogenina							

**Tabela 2. Resumo dos resultados de expressão relativa de genes do programa miogênico após o tratamento rcRGMa+Neogenina em células musculares esqueléticas.** Células em vermelho representam genes que apresentaram um aumento significativo na expressão relativa; e em azul, uma diminuição significativa. \* $p < 0,05$  vs. Controle (pcDNA3). Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando REST pelo método de Pfal.

#### **4.5 Avaliação dos efeitos de rcRGMa na viabilidade das células musculares esqueléticas**

Nós também buscamos avaliar possíveis efeitos de rcRGMa sobre a viabilidade dos mioblastos. Os resultados mostraram que o tratamento com rcRGMa induziu um aumento significativo da viabilidade de mioblastos mantidos por 3 e 5 dias em meio de crescimento, comparado ao controle (Figura 24A). Por outro lado, quando os mioblastos foram induzidos à diferenciação miogênica e simultaneamente tratados com rcRGMa, observou-se uma diminuição significativa da viabilidade dessas células, em relação ao controle (Figura 24B).

Estes resultados sugeriram que (i) rcRGMa aumenta a viabilidade das células musculares esqueléticas, em condições de crescimento; e que (ii) rcRGMa diminui a viabilidade das células musculares esqueléticas, em condições de diferenciação.



**Figura 24. Efeitos do tratamento de mioblastos com rcRGMa sobre a viabilidade celular.** Resultados obtidos pelo ensaio de MTT com a leitura a 595 nm de absorbância, obtidas dos grupos controle e tratado com rcRGMa. Em (A), o tratamento com rcRGMa em mioblastos cultivados em meio de crescimento induziu um aumento significativo da viabilidade dessas células após 3 e 5 dias, quando comparados ao grupo controle. Em (B), o tratamento com rcRGMa de mioblastos induzidos à diferenciação induziu a diminuição da viabilidade das células após 3 e 5 dias, comparados ao grupo controle. n=3 experimentos independentes. \*\*p<0,01 vs. Controle; \* p<0,05 vs. Controle. Diferenças entre os grupos foram avaliadas quanto a significância usando T-test não pareado, Two-way ANOVA e teste secundário de Sidack's.

## 5. DISCUSSÃO

Desde 2010, com achados de Jorge et al. a relação entre a molécula RGMa e a célula muscular esquelética vem sendo investigada por nosso grupo de pesquisa. Martins et al. (2015) caracterizaram o local de expressão de RGMa, RGMB e RGMc na célula muscular adulta e identificaram que RGMa estava presente no sarcolema e no sarcoplasma dessas células, sendo neste último com um padrão muito similar ao observado para proteínas sarcoméricas. Os estudos iniciais sobre as possíveis funções que RGMa poderia exercer na musculatura esquelética sugeriram efeitos de hipertrofia e hiperplasia. Qualquer gene com a capacidade de induzir estes dois efeitos na célula muscular esquelética pode se tornar alvo biotecnológico para o desenvolvimento (i) de terapias gênicas que auxiliem pacientes com miopatias, como por exemplo Distrofia Muscular de Duchenne e esclerose lateral amiotrófica; ou idosos e pacientes acamados que desenvolvem atrofia/perda de massa muscular; ou ainda (ii) da indústria de produção de carnes, como um gene alvo de seleção genética de animais domésticos.

Hipertrofia e hiperplasia foram observadas após a indução da super-expressão de RGMa nas células musculares via vetor de expressão (pCAB) e transfecção por Lipofectamina (Martins et al., 2015). No entanto a linhagem de células C2C12 é caracteristicamente conhecida por apresentar uma baixa eficiência de transfecção (Dodds., et al 1998; Neuhuber et al., 2002; Balci et al., 2009; Martins et al., 2015). Na tentativa de superar estas dificuldades e aprofundar nosso conhecimento biológico de RGMa na célula muscular, no presente trabalho nós optamos por fornecer RGMa na forma de uma proteína recombinante, que é disponível comercialmente (R&D Systems). No entanto, a maior porção desta proteína comercial é composta pela porção N-terminal de RGMa, o que poderia diferir da proteína que foi gerada a partir do gene clonado em vetor indutor de super-expressão, que passa pelos processos de introdução na célula, transcrição, tradução e todos os possíveis processamentos pós-transcricionais e pós-traducionais pelas células (Martins et al., 2015). Logo, apesar da introdução da proteína recombinante pronta em meio de cultura ter o potencial de influenciar um maior número de células e induzir uma resposta mais rápida em cultura, nós tivemos que inicialmente confirmar se os efeitos de rcRGMa eram similares aos obtidos no trabalho anterior, realizado por vetor de super-expressão.

De fato, os experimentos realizados neste trabalho revelaram que rcRGMa isoladamente, sem efeito de componentes do soro fetal bovino, são exclusivos de hiperplasia celular; não

observamos efeitos no tamanho das células como havíamos observado anteriormente. As células diferenciadas em cultura exclusivamente sob o tratamento de rcRGMa apresentaram um aumento de ~10 vezes no índice fusão de mioblastos multinucleados, comparado aos miotubos multinucleados formados na cultura controle, um efeito ainda mais significativo do que o que foi observado no trabalho anterior (Martins et al., 2015). Estes resultados sugerem que a porção N-terminal de RGMa seja responsável apenas pela indução da hiperplasia por fusão de novos núcleos. No tecido neural, a clivagem proteolítica de RGMa resulta na formação de sete moléculas diferentes, sendo que em quatro delas o motivo de âncora-GPI (C-terminal) permanece e, por isso, estas formas podem permanecer ligadas à membrana plasmática; enquanto que três delas perdem esta capacidade de ancoragem, e tornam-se solúveis (contendo principalmente a porção N-terminal; Tassew et al., 2009; 2012). Estudos funcionais vem revelando particularidades nas funções de cada uma delas. Por exemplo, a porção N-terminal de RGMa foi capaz de influenciar o crescimento e orientação axonal *in vitro*; enquanto que a C-terminal influenciou apenas o crescimento do axonal (Tassew et al., 2012; Siebold 2016).

Além de maior fusão de mioblastos, o tratamento tardio com rcRGMa parece também induzir uma maior diferenciação miogênica, uma vez que um maior número de células contendo mais do que três núcleos e expressando Miosina sarcomérica (MF20 positivas) foi encontrado quando houve tratamento com rcRGMa, comparado ao controle. Juntos, estes dados morfométricos sugerem que a proteína rcRGMa induz maior adesividade e/ou fusão de mioblastos em miotubos multinucleados e também a formação de células contendo mais do que três núcleos com expressão de Miosina.

Em nível de expressão gênica, o tratamento tardio com rcRGMa induziu a expressão de MyoD e Ciclina D1; enquanto que marcadores de diferenciação miogênica foram reprimidos (Desmina) ou mantidos inalterados (Myf5, Miogenina, MyH3, MyH5). A expressão de MyoD está associada tanto à proliferação quanto à diferenciação de precursores miogênicos (Zhang et al., 2010; Megeney et al., 1996). O que determina seu efeito em um ou outro programa é justamente a presença de Ciclina D1. Na presença de sinais mitogênicos no meio, a Ciclina D1 associa-se à Cdk4 formando um complexo que sequestra MyoD para mantê-lo inativo no núcleo celular. Com a retirada do sinal mitogênico, Ciclina D1 é degradada por fosforilação, permitindo que Cdk4 migre para o compartimento citoplasmático e libere MyoD para formar complexos com proteínas E no núcleo para ativar a transcrição de genes músculo-específicos

característicos da diferenciação terminal miogênica (Zhang et al., 1999). Dessa forma na presença de Ciclina D1, MyoD é impedido de induzir o início da diferenciação miogênica.

O que observamos interessante, foi a (re)indução da expressão de MyoD e Ciclina D1, fatores proliferativos, em células que já estavam no programa de diferenciação por três dias na ausência de soro. O que sugere que (rc)RGMa possa ter um importante papel para na regeneração miogênica, e possivelmente influência nas células satélites (Megoney et al., 1996; Shadrach et al., 2011). Curiosamente, rcRGMa não induziu a transcrição das miosinas MyH3 e MyH5, mas induziu um aumento do número de células MF20 positivas, o que sugere que os efeitos de rcRGMa não sejam diretos sobre a expressão de Miosina e sim sobre fatores que possivelmente modulam sua expressão.

Este possível papel na diferenciação de mioblastos em conjunto com a reativação de fatores proliferativos, foi identificado quando rcRGMa foi administrado após três dias em meio de diferenciação miogênica, seguindo os métodos que haviam sido padronizados na literatura (Martins et al., 2015). Logo, a administração em uma fase anterior a diferenciação de rcRGMa conseguiria induzir precocemente a diferenciação mioblastos? A fim de responder esse questionamento, nós administramos rcRGMa precocemente na cultura, assim que o meio de crescimento foi substituído para meio de diferenciação miogênica. Embora não tenhamos observado um número maior de miotubos multinucleados nas culturas tratadas com rcRGMa, nós observamos que o tratamento precoce induziu um aumento no número de células MF20 positivas, comparado ao controle. E por RT-PCRq, nós observamos um aumento significativo na expressão de MyoD (72X), mas não observamos um aumento na transcrição de Ciclina D1 e de MyH3. Neste caso, portanto, o aumento na expressão de MyoD na ausência de um aumento similar em Ciclina D1 sugere que MyoD esteja ativo como fator de transcrição no núcleo, induzindo a expressão de genes de diferenciação miogênica (Zhang et al., 1999). A retirada do sinal mitogênico associada ao tratamento com rcRGMa aumenta a tendência para o programa de diferenciação miogênico.

Mas como (rc)RGMa induz estes efeitos nas células musculares? Até o momento, a literatura indica que as RGMs podem sinalizar nas células via o receptor Neogenina (Rajagopalan et al., 2004; De Vries et al., 2008; Fujita et al., 2017) ou como co-receptores da via de sinalização induzida por BMP (Samad et al., 2005; Babitt et al., 2005).

A fim de avaliar se os efeitos observados pelo tratamento de mioblastos com rcRGMa eram efetuados via o complexo de sinalização BMP, nós administramos Dorsomorfina (DM) aos

mioblastos, uma droga inibidora desta via de sinalização (Horbelt *et al.*, 2015; Boergermann *et al.*, 2010), e verificamos se a administração de rcRGMa ainda era competente para ativar a adesão/fusão dos mioblastos em miotubos multinucleados e induzir a formação de um maior número de células MF20 positivas.

A repressão dos receptores da via BMP parece fornecer um ambiente favorável para que (rc)RGMa potencialize seus efeitos de adesão/fusão de mioblastos. Tanto rcRGMa quanto DM induziram um aumento do índice de fusão; mas este aumento foi muito maior no tratamento simultâneo rcRGMa+DM. Os efeitos inibitórios da sinalização BMP sobre a diferenciação miogênica já são bem conhecidos (Hirsinger *et al.*, 1997; Reshef *et al.*, 1998; Amthor *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 2011; Friedrichs *et al.*, 2011). No dermomiótomo dos somitos, a sinalização BMP deve ser bloqueada para permitir a determinação e diferenciação dos precursores miogênicos (Hirsinger *et al.*, 1997; Reshef *et al.*, 1998; Amthor *et al.*, 1998). A super-expressão ou o tratamento de precursores mesodérmicos ou de mioblastos da linhagem C2C12 com BMP4 induz a diferenciação dessas células na linhagem osteogênica (Katagiri *et al.*, 1994; Dahlqvist *et al.*, 2003). Em células satélites, a sinalização BMP permite a expansão/proliferação dessas células por prevenir a diferenciação prematura delas em miotubos (Ono *et al.*, 2011; Stantzou *et al.*, 2017). O bloqueio da via BMP com dorsomorfina ou com o antagonista da via BMP, Noggin, induz um aumento da expressão de proteínas miogênicas e formação de miotubos (Horbelt *et al.*, 2015; Friedrichs *et al.*, 2011). Estes resultados corroboram para sugerir que rcRGMa esteja atuando como um fator sinérgico ao bloqueio da via BMP para permitir a fusão de mioblastos.

O mesmo não ocorre na indução da diferenciação terminal dos mioblastos. Apesar de rcRGMa induzir um aumento no número de células MF20 positivas, o número destas células foi maior quando a cultura foi tratada com DM e não observamos um efeito adicional quando as células foram tratadas simultaneamente com rcRGMa + DM. Estes resultados sugeriram então que os efeitos de rcRGMa na diferenciação são secundários e independentes da sinalização BMP.

Este efeito na diferenciação terminal parece ser exercido por rcRGMa associado ao seu outro possível receptor, a Neogenina. A maior disponibilidade deste receptor (por super-expressão) aumentou o efeito de rcRGMa sobre o número de células MF20 positivas. A ligação rcRGMa+Neogenina promoveu inclusive um aumento na transcrição de MyoD e MyH3, genes associados a estágios mais tardios de diferenciação, o que não havia sido obtido até o momento nos tratamentos isolados. Esses resultados reforçam que os efeitos fenotípicos

observados na hiperplasia e conseqüente maior diferenciação das células musculares esqueléticas são sinalizados via ligação com Neogenina. A associação de rcRGMa+Neogenina mostra-se como uma importante via para a promoção da diferenciação muscular, superando inclusive os efeitos da associação Netrina-2 + Neogenina, que também estimulou uma maior formação de miotubos *in vitro*, mas sem alterar significativamente a expressão de genes músculo-específicas como MyoD, Miogenina e MyH (Kang et al., 2004).

Mensageiros secundários diferentes podem ser induzidos por Neogenina. Em neurônios, a interação entre a porção C-terminal de RGMa com Neogenina induz a ligação de FAK aos domínios intracelulares de neogenina. A fosforilação de FAK ativa diretamente a via RhoA-ROCK e desencadeiam a despolimerização de actina e retração dos filopódios neuronais (De Vries & Cooper, 2008). Em células epiteliais, a ligação entre a porção C-terminal de RGMa e Neogenina promove a estabilidade das junções de adesão via Arp2/3 e complexo WRC. Interessantemente, RGMa solúvel (N-terminal) também pode ligar-se à Neogenina, mas induzindo uma via intracelular específica via clivagem por uma  $\gamma$ -secretase dos domínios P1, P2 e P3 intracelulares desse receptor (Siebold et al., 2016). Estes subdomínios são deslocados para o núcleo, para mediar a transcrição gênica via LMO4 (Siebold et al., 2016). Em nosso trabalho, no entanto, nós não conseguimos elucidar qual via celular é induzida após a ligação entre rcRGMa e Neogenina. Dada a complexibilidade e multiplicidade de efeitos induzidos pela ligação RGMa-Neogenina, novos estudos devem ser feitos buscando esclarecer as moléculas induzidas pela interação RGMa-Neogenina.

Por fim, mostramos ainda que rcRGMa aumenta a viabilidade das células musculares esqueléticas cultivadas em meio de crescimento, sugerindo que rcRGMa possa influenciar o aumento na proliferação dessas células na presença do sinal mitogênico, uma vez que células mais viáveis tende a ter uma maior taxa proliferativa. No sistema nervoso, RGMa foi associada à sobrevivência e diferenciação de neurônios (Matsunaga et al., 2004; Matsunaga et al., 2006), similar aos efeitos no tecido muscular. O mesmo efeito não foi observado quando as células foram cultivadas em condições de diferenciação: observamos uma diminuição na viabilidade celular quando as células foram transferidas para este meio. Esta diminuição da viabilidade celular pode ser conseqüência da indução a diferenciação celular estimulada por rcRGMa, uma vez que a biogênese mitocondrial diminuiu durante a transição para a diferenciação celular (Birket et al., 2011; Xu et al., 2013; Reis et al., 2015). Mais estudos, no entanto, se fazem necessários para elucidar de forma mais clara a relação entre rcRGMa e a atividade mitocondrial.

## 6. CONCLUSÕES

- rcRGMa solúvel induz a hiperplasia das células musculares esqueléticas *in vitro*;
- rcRGMa solúvel promove a transcrição de fatores miogênicos como MyoD, responsáveis pelo início do programa de diferenciação *in vitro*;
- A indução de hiperplasia muscular por rcRGMa *in vitro* é favorecida quando a via BMP está bloqueada;
- Os efeitos na diferenciação terminal *in vitro* de mioblastos em miotubos multinucleados são induzidos pela ligação entre rcRGMa e Neogenina;
- RGMa possivelmente apresenta um efeito na proliferação das células musculares esqueléticas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABMAYR SM, ZHUANG S, GEISBRECHT ER. (2008). Myoblast fusion in *Drosophila*. *Methods Mol Biol.* 475:75-97.

AMTHOR H, CHRIST B, WEIL M, PATEL K. (1998). The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol.*8(11):642-52.

ASFOUR HA, ALLOUH MZ, SAID RS. (2018). Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. *Exp Biol Med (Maywood).* 243(2):118-128.

AUBIN J, DAVY A, SORIANO P. (2004). In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev.* 18(12):1482-94.

BABAI, F., MUSEVI-AGHDAM, J., SCHURCH, W., ROYAL, A. AND GABBIANI, G. (1990). Coexpression of alpha-sarcomeric actin, alpha-smooth muscle actin and desmin during myogenesis in rat and mouse embryos I. Skeletal muscle. *Differentiation* 44, 132-142.

BABITT JL, HUANG FW, WRIGHTING DM, XIA Y, SIDIS Y, SAMAD TA, CAMPAGNA JA, CHUNG RT, SCHNEYER AL, WOOLF CJ, ANDREWS NC, LIN HY. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet,* 38:531-539.

BABITT JL, ZHANG Y, SAMAD TA, XIA Y, TANG J, CAMPAGNA JA, ET AL. (2005). Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 2005;280:29820–7.

BADANA A, CHINTALA M, VARIKUTI G, PUDI N, KUMARI S, KAPPALA VR, MALLA RR. (2016). Lipid Raft Integrity Is Required for Survival of Triple Negative Breast Cancer Cells. *J Breast Cancer.* PMC5204043.

BAE GU, YANG YJ, JIANG G, HONG M, LEE HJ, TESSIER-LAVIGNE M, KANG JS, KRAUSS RS. (2009). Neogenin regulates skeletal myofiber size and focal adhesion kinase and extracellular signal-regulated kinase activities in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell.* 20(23):4920-31

BAI G, PFAFF SL (2011). Protease regulation: the Yin and Yang of neural development and disease. *Neuron.* PMC3221598.

BAJARD L, RELAIX F, LAGHA M, ROCANCOURT D, DAUBAS P, BUCKINGHAM ME. (2006). A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes Dev.* 20:2450–64

BALCI B, DINÇER P. (2009). Efficient transfection of mouse-derived C2C12 myoblasts using a matrigel basement membrane matrix. *Biotechnol J.* 4(7):1042-5.

BIRKET MJ, ORR AL, GERENCSEER AA, MADDEN DT, VITELLI C, SWISTOWSKI A, BRAND MD, ZENG X. (2011). A reduction in ATP demand and mitochondrial activity with neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 124(Pt3):348-58.

BLAU HM, CHIU CP, WEBSTER C. (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*. 32(4):1171-80.

BOERGERMANN JH, KOPF J, YU PB, KNAUS P. (2010). Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. PMID:20691279.

CHAL J, POURQUIÉ O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development*. 144(12):2104-2122.

CHEN, E.H., B.A. PRYCE, J.A. TZENG, G.A. GONZALEZ, AND E.N. OLSON. (2003). Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, Loner, and its effector ARF6. *Cell*. 114:751–762.

CHOI J, COSTA ML, MERMELSTEIN CS, CHAGAS C, HOLTZER S, HOLTZER H. (1990). MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87(20):7988-92.

CORRADINI E, BABITT JL, LIN HY. (2009). The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. PMC3715994.

DAHLQVIST C, BLOKZIIL A, CHAPMAN G, FALK A, DANNAEUS K, IBÁÑEZ CF, LENDAHL U. (2003). Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development*. 130(24):6089-99.

DE FALCO M, DE LUCA A. (2006). Involvement of cdks and cyclins in muscle differentiation. *Eur J Histochem*. 50(1):19-23.

DE VRIES M, COOPER HM. (2008). Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. *J Neurochem*. 18485097.

DEMICHEVA E, CUI YF, BARDWELL P, BARGHORN S, KRON M, MEYER AH, SCHMIDT M, GERLACH B, LEDDY M, BARLOW E, O'CONNOR E, CHOI CH, HUANG L, VELDMAN GM, RUS H, SHABANZADEH AP, TASSEW NG, MONNIER PP, MÜLLER T, CALABRESI PA, SCHOEMAKER H, MUELLER BK. (2015). Targeting repulsive guidance molecule A to promote regeneration and neuroprotection in multiple sclerosis. *Cell Rep*. 25801027.

DIEHL JA, SHERR CJ. (1997). A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase. *Mol Cell Biol*. 17(12):7362-74.

DODDS E, DUNCKLEY MG, NAUJOKS K, MICHAELIS U, DICKSON G. (1998). Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Ther*. 5(4):542-51.

ENDO M, YAMASHITA T. (2009). Inactivation of Ras by p120GAP via focal adhesion kinase dephosphorylation mediates RGMa-induced growth cone collapse. *J Neurosci*. 19458235.

- FENG J, WANG T, LI Q, WU X, QIN X. (2012). RNA interference against repulsive Guidance molecule A improves axon sprout and neural function recovery of rats after MCAO/reperfusion. *Exp Neurol*. 229:21459.
- FIEMS, L. O. (2012). Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 2(3), 472–506.
- FITZGERALD DP, SEAMAN C, COOPER HM. (2006). Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo. *Dev Dyn*. 235(6):1720-5.
- FRANCETIC T, LI Q. (2011). Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription*. 2:109–14
- FRIEDRICH M, WIRSDÖRFER F, FLOHÉ SB, SCHNEIDER S, WUELLING M, VORTKAMP A. (2011). BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *BMC Cell Biol*. 6;12:26.
- FUJITA Y, YAMASHITA T. (2017) The roles of RGMa-neogenin signaling in inflammation and angiogenesis. *Inflamm Regen*.8;37:6.
- GILDOR B, MASSARWA R, SHILO BZ, SCHEJTER ED. (2010). Making muscles: Arp, two, three. *Fly (Austin)*. 4(2):145-8.
- GURUNG R, PARNAIK VK. (2012). Cyclin D3 promotes myogenic differentiation and Pax7 transcription. *J Cell Biochem*. 113(1):209-19.
- HALBROOKS PJ, DING R, WOZNEY JM, BAIN G. (2007). Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *J Mol Signal*. 2:4. 17615080
- HARADA K, FUJITA Y, YAMASHITA T. (2016). Repulsive guidance molecule A suppresses angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 267:21439.
- HARTUNG A, BITTON-WORMS K, RECHTMAN MM, WENZEL V, BOERGERMANN JH, HASSEL S, HENIS YI, KNAUS P. (2006). Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol*. PMC1636853.
- HATA K, FUJITANI M, YASUDA Y, DOYA H, SAITO T, YAMAGISHI S, MUELLER BK, YAMASHITA T. (2006). RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J Cell Biol*, 173:47–58.
- HATA K, KAIBUCHI K, INAGAKI S, YAMASHITA T. (2009). Unc5B associates with LARG to mediate the action of repulsive guidance molecule. *J Cell Biol*. PMC2686409.
- HIRSINGER E, DUPREZ D, JOUVE C, MALAPERT P, COOKE J, POURQUIÉ O. (1997) Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development*. 124(22):4605-14.
- HORBELT D, BOERGERMANN JH, CHAIKUAD A, ALFANO I, WILLIAMS E, LUKONIN I, TIMMEL T, BULLOCK AN, KNAUS P. (2015). Small molecules dorsomorphin and LDN-193189 inhibit myostatin/GDF8 signaling and promote functional myoblast differentiation. *J Biol Chem*. PMC4319009.

ISHIBASHI J, PERRY RL, ASAKURA A, RUDNICKI MA. (2005). MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal regions. *J Cell Biol.* 171(3):471-82.

JIQING C, YAQIN L, YINGYIN L, FEI C, HUILI Z, YULING Z, JUAN Y, SHANWEI F, CHENG Z. (2015). BMP4 inhibits myogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in mdx mice. *Cytotherapy.* 17(9):1213-9.

JORGE EC, AHMED MU, BOTHE I, COUTINHO LL, DIETRICH S. (2012). RGMa and RGMb expression pattern during chicken development suggest unexpected roles for these repulsive guidance molecules in notochord formation, somitogenesis, and myogenesis. *Dev Dyn,* 241:1886-1900.

JORGE EC, MELO CM, ROSÁRIO MF, ROSSI JR, LEDUR MC, MOURA AS, COUTINHO LL. (2010). Chicken skeletal muscle-associated macroarray for gene discovery. *Genet Mol Res.* 9(1):188-207.

KANG JS, FEINLEIB JL, KNOX S, KETTERINGHAM MA, KRAUSS RS. (2003). Pro-myogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 100: 3989- 3994.

KANG JS, MULIERI PJ, HU Y, TALIANA L, KRAUSS RS. (2002). BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *EMBO J,* 21:114-124.

KANG JS, YI MJ, ZHANG W, FEINLEIB JL, COLE F, KRAUSS RS. (2004). Netrins and neogenin promote myotube formation. *The J of Cell Biol,* 167:493-504.

KATAGIRI T, YAMAGUCHI A, KOMAKI M, ABE E, TAKAHASHI N, IKEDA T, ROSEN V, KIM JH, JIN P, DUAN R, CHEN EH. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol.* Dec;127(6 Pt 1):1755-66. Erratum in: *J Cell Biol* 1995.

KIM JH, JIN P, DUAN R, CHEN EH. (2015). Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr Opin Genet Dev.* 32:162–170.

KISLINGER T, GRAMOLINI AO, PAN Y, RAHMAN K, MACLENNAN DH, EMILI A. (2005). Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation. *Mol Cell Proteomics.* 4(7):887-901.

KOENIG BB, COOK JS, WOLSING DH, TING J, TIESMAN JP, CORREA PE, ET AL. (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 14(9):5961–74.

LAH GJ, KEY B. (2012). Novel roles of the chemorepellent axon guidance molecule RGMa in cell migration and adhesion. *Mol Cell Biol.* 32(5):968-80.

LIU S, BOLGER JK, KIRKLAND LO, PREMNATH PN, MCINNES C. (2010). Structural and functional analysis of cyclin D1 reveals p27 and substrate inhibitor binding requirements. *ACS Chem Biol.* 5(12):1169-82.

LYONS, G. E., BUCKINGHAM, M. E. AND MANNHERZ, H. G. (1991). alpha-Actin proteins and gene transcripts are colocalized in embryonic mouse muscle. *Development* 111, 451-454.

MAGLI A, SCHNETTLER E, RINALDI F, BREMER P, PERLINGEIRO RC. (2013). Functional dissection of Pax3 in paraxial mesoderm development and myogenesis. *Stem Cells*. 31:59–70

MARTINS AF, NETO JX, AZAMBUJA A, SERENO ML, FIGUEIRA A, CAMPOS-JUNIOR PH, ROSÁRIO MF, TOLEDO CBB, SILVA GAB, KITTEN GT, COUTINHO LL, DIETRICH S, JORGE E. (2015). Repulsive guidance molecules a, b and c are skeletal muscle proteins, and repulsive guidance molecule promotes cellular hypertrophy and is necessary for myotube fusion. *Cells Tissue Organs*; 200:326-338.

MASSAGUÉ J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*. PMC3512574.

MATSUNAGA E, NAKAMURA H, CHÉDOTAL A. (2006). Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. *J Neurosci*. 26(22):60828.

MATSUNAGA E, TAUSZIG-DELAMASURE S, MONNIER PP, MUELLER BK, STRITTMATTER SM, MEHLEN P, CHÉDOTAL A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nature Cell Biology*, 6:749-756.

MAVALLI MD, DIGIROLAMO DJ, FAN Y, RIDDLE RC, CAMPBELL KS, VAN GROEN T, FRANK SJ, SPERLING MA, ESSER KA, BAMMAN MM, CLEMENS TL (2010). Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.*, 120(11):4007-4020.

MEGENEY LA, KABLAR B, GARRETT K, ANDERSON JE & RUDNICKI MA. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* 10, 1173–1183.

METZGER M, CONRAD S, ALVAREZ-BOLADO G, SKUTELLA T, JUST L. (2005). Gene expression of the repulsive guidance molecules during development of the mouse intestine. *Dev Dyn*. 234(1):169–75.

MILLAY, D.P., et al., (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature*. 499(7458): p. 301-5.

MOLLINEDO F, GAJATE C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul*. 25465296.

MONNIER PP, SIERRA A, MACCHI P, DEITINGHOFF L, ANDERSEN JS, MANN M, FLAD M, HORNBERGER MR, STAHL B, BONHOEFFER F, MUELLER BK. (2002). RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature*, 419:392-395.

MOSMANN T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65 (1-2):55-63.

MÜLLER T, TROMMER I, MUHLACK S, MUELLER BK (2016). Levodopa increases oxidative stress and repulsive guidance molecule A levels: a pilot study in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 26880022.

MURAMATSU R, KUBO T, MORI M, NAKAMURA Y, FUJITA Y, AKUTSU T, OKUNO T. (2010). Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. *Dev Cell*. PMC2924163.

MUSARO A, MCCULLAGH K, PAUL A, HOUGHTON L, DOBROWOLNY G, MOLINARO M, BARTON ER, SWEENEY HL, ROSENTHANL N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.*, 27(2):195-200.

MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P, COLEMAN R, SZYCHLINSKA MA, SALVATORELLI L, PARENTI R, MAGRO G, IMBESI R. (2015). Somitogenesis: From somite to skeletal muscle. *Acta Histochem*. May-Jun;117(4-5):313-28.

NEUHUBER B, HUANG DI, DANIELS MP, TORGAN CE. (2002). High efficiency transfection of primary skeletal muscle cells with lipid-based reagents. *Muscle Nerve*. 26(1):136-40.

NIEDERKOFLE R V, SALIE R, SIGRIST M, ARBER S. (2004). Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. *J Neurosci*. 24:808-18.

OLDEKAMP J, KRAMER N, ALVAREZ-BOLADO G, SKUTELLA T. (2004). Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. *Gene Expr Patterns* 2004;4:283–8.

ONO Y, CALHABEU F, MORGAN JE, KATAGIRI T, AMTHOR H, ZAMMIT OS. (2011). BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. *Cell Death Differ*. PMC3044455.

PARK KW, CROUSE D, LEE M, KARNIK SK, SORENSEN LK, MURPHY KJ, KUO CJ, LI DY. (2004). The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. PMC528958.

PFAFFL MW, HORGAN GW, DEMPFLER L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 30(9):e36.

PORTILHO DM, SOARES CP, MORROT A, THIAGO LS, BUTLER-BROWNE G, SAVINO W, COSTA ML, MERMELSTEIN C. (2012). Cholesterol depletion by methyl- $\beta$ -cyclodextrin enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in myoblast cultures. *Eur J Pharmacol*. PubMed PMID: 22921450.

RAJAGOPALAN S, DEITINGHOFF L, DAVIS D, CONRAD S, SKUTELLA T, CHEDOTAL A, MUELLER BK, STRITTMATTER SM. (2004). Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol*. PMID: 15258590.

RESHEF R, MAROTO M, LASSAR AB. (1998). Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *Genes Dev*. 12(3):290-303.

ROCHLIN K, YU S, ROY S, BAYLIES MK. (2010). Myoblast fusion: when it takes more to make one. *Dev Biol*. 341(1):66-83.

- RODRIGUEZ A, PAN P, PARKKILA S. (2007). Expression studies of neogenin and its ligand hemojuvelin in mouse tissues. *J Histochem Cytochem.* 55(1):85-96.
- ROSENZWEIG BL, IMAMURA T, OKADOME T, COX GN, YAMASHITA H, TEN DIJKE P, ET AL. (1995) Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(17):7632–6.
- SAMAD TA, REBBAPRAGADA A, BELL E, ZHANG Y, SIDIS Y, JEONG SJ, CAMPAGNA JA, PERUSINI S, FABRIZIO DA, SCHENEYER AL, LIN HY, BRIVANIOU AH, ATTISANO L, WOOLF CJ. (2005). DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J. Biol. Chem.*, 280:14122-14129.
- SARTORI R & SANDRI M. (2015). BMPs and the muscle-bone connection. *Bone*, 80:37-42.
- SARTORI R, GREGOREVIC P, SANDRI M. (2014). TGF $\beta$  and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends in Endo and Met*, 25(9): 454-471.
- SARTORI R, SCHIWIS E, BLAAUW B, BORTOLANZA S, ZHAO J, ENZO E, STANTZOU A, MOUISEL E, TONIOLO L, FERRY A, STRICKER S, GOLDBERG A, DUPONT S, PICCOLO S, AMTHOR H, SANDRI M. (2013). BMP signaling controls muscle mass. *Nature Genetics*, 45(11):1309-1321.
- SASSOON, D. A., GARNER, I. AND BUCKINGHAM, M. (1988). Transcripts of  $\alpha$ -cardiac and  $\alpha$ -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development* 104, 155-164.
- SATOH J, TABUNOKI H, ISHIDA T, SAITO Y, ARIMA K. (2013). Accumulation of a Repulsive axonal guidance molecule RGMa in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 22582881.
- SCARFÌ S. (2016) Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair. *World J Stem Cells.* 26;8(1):1-12.
- SCHIAFFINO S, DYAR KA, CICILIOT S, BLAAUW B, SANDRI M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280(17):4294-314.
- SHABANZADEH AP, TASSEW NG, SZYDŁOWSKA K. (2015). Uncoupling Neogenin association with lipid rafts promotes neuronal survival and functional recovery after stroke. *Cell Death & Disease.* PMC4669689.
- SHADRACH, J. L., & WAGERS, A. J. (2011). STEM CELLS FOR SKELETAL MUSCLE REPAIR. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1575), 2297–2306.
- SIEBOLD C, YAMASHITA T, MONNIER PP, MUELLER BK, PASTERKAMP RJ (2016). RGMs: Structural Insights, Molecular Regulation, and Downstream Signaling. *Trends Cell Biol.* 28007423.
- SILVESTRI L, PAGANI A, FAZI C, GERARDI G, LEVI S, AROSIO P, CAMASCHELLA C. (2007). Defective targeting of hemojuvelin to plasma membrane is a common pathogenetic mechanism in juvenile hemochromatosis. *Blood.* 15;109(10):4503-10.

SINGH K, DILWORTH FJ. (2013). Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. *FEBS J.* 280(17):3991-4003.

SKAPEK SX, RHEE J, SPICER DB, LASSAR AB. (1995). Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science.* 267(5200):1022-4.

STANTZOU A, SCHIRWIS E, SWIST S, ALONSO-MARTIN S, POLYDOROU I, ZARROUKI F, MOUISEL E, BELEY C, JULIEN A, LE GRAND F, GARCIA L, COLNOT C, BIRCHMEIER C, BRAUN T, SCHUELKE M, RELAIX F, AMTHOR H. (2017). BMP signaling regulates satellite cell-dependent postnatal muscle growth. *Development.* 144(15):2737-2747.

STOECKLI ET. (2018). Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development.* 145(10).

TAJBAKHS S. (2005). Skeletal muscle stem and progenitor cells: reconciling genetics and lineage. *Exp Cell Res.* PMID:15882864.

TANIGUCHI J, KUMANOGOH A, YOSHIDA M, MOCHIZUKI H, KUWABARA S, YAMASHITA T. (2011). RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 21423182.

TASSEW NG, CHARISH J, CHESTOPALOVA L, MONNIER PP. (2009). Sustained in vivo inhibition of protein domains using single-chain Fv recombinant antibodies and its application to dissect RGMa activity on axonal outgrowth. *J Neurosci.* 29(4):1126-31.

TASSEW NG, CHARISH J, SEIDAH NG, MONNIER PP. (2012). SKI-1 and Furin generate multiple RGMa fragments that regulate axonal growth. *Dev Cell.* 22340500.

TEN DIJKE P, YAMASHITA H, SAMPATH TK, REDDI AH, ESTEVEZ M, RIDDLE DL, ET AL. (1994). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem.* 269(25):16985-8.

TU T, ZHANG C, YAN H, LUO Y, KONG R, WEN P, YE Z, CHEN J, FENG J, LIU F, WU JY, YAN X. (2015). CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. *Cell Res.* PMID: 25656845.

VALDEZ MR, RICHARDSON JA, KLEIN WH, OLSON EN. (2000) Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. *Dev Biol.* 219:287-98.

VAN BATTUM EY, BRIGNANI S, PASTERKAMP RJ. (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 14(5):532-46.

WEI Q, PATERSON BM. (2001). Regulation of MyoD function in the dividing myoblast. *FEBS Lett.* 490(3):171-8.

WILSON NH, KEY B. (2006). Neogenin interacts with RGMa and netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain. *Dev Biol.* 16836993.

WILSON NH, KEY B. (2007). Neogenin: one receptor, many functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 17137827.

WINBANKS CE, CHEN JL, QIAN H, LIU Y, BERNARDO BC, BEYER C, WATT KI, THOMSON RE, CONNOR T, TURNER BJ, MCMULLEN JR, LARSSON L, MCGEE SL, HARRISON CA, GREGOREVIC P (2013). The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *J. Cell. Biol.*, 203:345-357.

WOZNEY JM, FUJISAWA-SEHARA A, SUDA T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol.* 127(6 Pt 1):1755-66.

WU Q, SUN CC, LIN HY, BABITT JL. (2012). Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). *PLoS One.* PMC3459908.

XIA Y, BABITT JL, BOULEY R, ZHANG Y, DA SILVA N, CHEN S, ZHUANG Z, SAMAD TA, BRENNER GJ, ANDERSON JL, HONG CC, SCHNEYER AL, BROWN D, LIN HY. (2010). Dragon enhances BMP signaling and increases transepithelial resistance in kidney epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* PMC2844302.

XIA Y, CORTEZ-RETAMOZO V, NIEDERKOFER V, SALIE R, CHEN S, SAMAD TA, HONG CC, ARBER S, VYAS JM, WEISSELEDER R, PITTET MJ, LIN HY. (2011). Dragon (repulsive Guidance molecule b) inhibits IL-6 expression in macrophages. *J Immunol.* 186(3):1369-76.

XIA Y, YU PB, SIDIS Y, BEPPU H, BLOCH KD, SCHNEYER AL, LIN HY. (2007). Repulsive guidance molecule RGMa alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. *J Biol Chem.* 17472960.

YAMASHITA H, TEN DIJKE P, HUYLEBROECK D, SAMPATH TK, ANDRIES M, SMITH JC. (1995) Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol.* 130(1):217-26.

ZHANG JM, WEI Q, ZHAO X, PATERSON BM. (1999). Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO J.* 18(4):926-33.

ZHANG K, SHA J & HARTER ML. (2010). Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. *J Cell Biol* 188, 39-48.

ZHAO ZW, LIAN WJ, CHEN GQ, ZHOU HY, WANG GM, CAO X, YANG HJ, HOU YP. (2012). Decreased expression of repulsive guidance molecule member A by DNA methylation in colorectal cancer is related to tumor progression. *Oncol Rep.* 22367090.

ZHOU Z, XIE J, LEE D, LIU Y, JUNG J, ZHOU L, XIONG S, MEI L, XIONG WC. (2010). Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. *Dev Cell.* PMC2924163.