

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Dissertação de Mestrado

**Análise da Função Biológica da Molécula Orientadora por Repulsão  
a1 (RGMa1) Durante o Estabelecimento de Precusores Musculares  
em Somitos de Embriões de Galinha *in vitro***

**Rayan Silva de Paula**

Belo Horizonte, fevereiro de 2018

Rayan Silva de Paula

**Análise da Função Biológica da Molécula Orientadora por Repulsão  
a1 (RGMa1) Durante o Estabelecimento de Precursores Musculares  
em Somitos de Embriões de Galinha *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 Ciências.

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Orientadora:** Profa. Dra. Erika Cristina Jorge

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

***“O conhecimento gera liberdade de escolha.”***

Professora Erika Jorge ao lecionar aula para turma de Ciências Biológicas (set/2016)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente à minha Orientadora Profa. Erika Jorge pela confiança investida em mim para realização deste trabalho. Já são seis anos de colaboração em vigência (que passaram muito rápido!). Lembro-me de quando integrei seu grupo de pesquisa, eu era totalmente inexperiente, não sabia nem usar uma pipeta, quem dirá saber como “fazer ciência”. Entretanto, a Profa. Erika nunca hesitou em compartilhar seu conhecimento, instigando e motivando cada um a sempre melhorar, se superar e tornarem-se suas melhores versões. Dizem que nos tornamos reflexo daquilo que admiramos, e posso dizer, assertivamente, que levo muito do que aprendi com ela em minha bagagem pessoal e profissional ao longo desses anos. Quando o alicerce é bem fundado, fica fácil enfrentar as intempéries do meio que surgem ao nosso redor, e onde quer que eu esteja e/ou com o que ou quem eu estiver trabalhando, vou levar comigo toda essa base e amadurecimento que adquiri durante esses anos de convivência. Serei eternamente grato a ela pelo espaço e confiança cedidos a mim, para que eu pudesse estabelecer e desenvolver o cientista que sou hoje.

À Profa. Gerluza Silva agradeço por mostrar que nosso trabalho deve ser sempre executado com maestria e responsabilidade, sem necessariamente excluir a alegria ao realizá-lo. Com ela aprendi que muitas frustrações, que podem surgir durante o percurso, são responsáveis pelo amadurecimento e crescimento pessoal e profissional. Aprendi também que temos que ser humildes em dizer que não sabemos algo, porém estarmos abertos a sempre tentar melhorar e que, todo mundo, sem exceção, tem algo a nos ensinar. Obrigado por mostrar tamanha humanidade dentro de um ambiente acadêmico, muitas das vezes, hostil.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, o LABODE, gostaria de deixar meu muito obrigado por fazer deste um local sem igual. Obrigado pelo convívio quase diário, pelo suporte, pelo enfrentamento conjunto frente às dificuldades, pelo ambiente colaborativo e amigável, na tentativa de fazer ciência de qualidade. Agradeço especialmente a um grupo de pessoas que contribuiu muito para meu amadurecimento durante o mestrado, o grupo RGM, composto pela Júlia (acho que minha irmã separada ao nascimento), Aline Copola (e sua velocidade incrível de fala: ATTCTGCATATG...), Alinne Costa (sempre discutimos, mas no fim nos damos bem), Amanda (Xuxa), Carol (cabelinho de fogo) e Ricardo (“ahn?!”). Agradeço ao Chico

(pela disponibilidade em ajudar a todos), ao Igor (amigo sem igual), à Íria (e sua sabedoria), ao Albergaria (que continua comendo muito sem engordar), ao Fernando (Galo!), à Raquel (e suas maravilhosas coxinhas), à Laura (sempre com um chocolate a oferecer) e à Hanna (veterinária disfarçada de dentista). Agradeço também aos ex-LABODES que estiveram comigo nessa jornada: Samira, Cristiane Toledo, Bruno, Luiza e Aline Martins.

Gostaria de agradecer à equipe do Centro de Biengenharia de Espécies Invasoras (CBEIH), onde amadureci como cientista e tive a oportunidade de ter experiência de desenvolvimento e aplicação do conhecimento científico em questões que impactam diretamente a sociedade. A partir da visão do Prof. Antônio Valadão, aprendi que o cientista deve ser valorizado em todos os aspectos e que a aposta em criar uma equipe multidisciplinar favorece a manutenção e realização do trabalho científico de maneira holística. Aprendi com ele que colaborações bem estabelecidas são indispensáveis e que as mais diversas ideias devem ser ouvidas, respeitadas, ponderadas e aproveitadas a fim de dar seguimento à realização de um bom trabalho. Dentre as colaborações realizadas pelo CBEIH, gostaria de agradecer à Profa. Andrea Amaral e a Pós-doutoranda Mariana Reis por abrirem as portas de seu laboratório e podermos desenvolver parte do trabalho em parceria. Da Equipe do CBEIH, gostaria de agradecer especialmente ao Renato (meu primeiro IC!) pela parceria e confiança mútua na empreitada de utilizar a biologia molecular dentro de um dos braços do projeto; gostaria de agradecer à Kelly, sempre muito solícita, eficiente, irreverente, gentil, tentando atender às diversas demandas; gostaria de agradecer à Jacqueline por sempre ser tranquila, racional, sensata e disposta a tornar o cotidiano agradável de maneira responsável; e também agradecer ao Fabiano, a quem admiro muito, e que me disse, certa vez, que eu deveria sempre acreditar em mim mesmo.

Agradeço e destaco amigos que compartilharam desde o percurso até este momento de conclusão do mestrado e que convivem comigo diariamente, on-line ou presencialmente, e que conseguem tornar inesquecíveis pequenos e grandes momentos. Muito obrigado à Júlia, mais que uma colaboradora e parceira de trabalho, é uma amiga, irmã, companheira, cúmplice (às vezes até noiva!!) que com seu humor, alegria e irreverência faz o dia de qualquer um feliz. Agradeço à Prica que com seu batom vermelho é capaz de enfrentar qualquer problema e está sempre pronta a interceder pelos amigos; sempre têm palavras de conforto quando se precisa e não mede esforços

para se dedicar a quem ela realmente gosta. Agradeço ao Igor, primeiramente, em poder ter vivido a experiência do mestrado em conjunto, partilhando as mesmas alegrias, frustrações, cumprindo cada etapa juntos, além de ser um amigo e cofidente sem comparação. Agradeço à Íria, que muito experiente por si mesma, sempre está disposta a largar as coisas que ela tem que fazer para ajudar a quem precisa, de maneira mais eficiente que o próprio Google! Agradeço ao Gustavo por todos os momentos em que compartilhamos junto, em que dividimos medos, inseguranças, conquistas e por sempre me guiar pelos caminhos tortuosos da vida.

Agradeço aos meus amigos da Biologia: Amanda, Ana Cláudia, Alan, Bianca, Camila, Luciana, Luís Filipe, Vinícius, Aline Medrado, Erika Kelmer, Cláudia e Juliana, que mesmo não nos encontrando diariamente, sempre que estamos juntos se torna algo divertido e único. Agradeço especialmente ao André e ao Carlos, amizades que surgiram na Biologia e que perduram nos últimos anos, pessoas com quem posso contar em todos os momentos e que foram indispensáveis para meu amadurecimento pessoal e científico. Agradeço a meus amigos do RPG: Carlos, Gustavo, Clarissa, Lucas, Jorge e Nanna por fazer do meu pouco tempo livre algo tão sensacional e agradável. Agradeço também meus amigos insubstituíveis do Pokémon PLBR: Luiz Henrique, Courel, Bia-chan, Pedro, Leonardo e Cássio.

A Brunella Folli, minha namorada e companheira (por quase o mesmo tempo de duração do mestrado) agradeço por todo suporte, motivação, cumplicidade e, sobretudo, paciência durante esse período. Obrigado por tornar minha vida mais leve, agradável e por compartilhar comigo tantos momentos importantes e magníficos nesse período em que estamos juntos. Você é uma pessoa extraordinária, que me ensinou muito sobre mim mesmo, ao permitir que eu sempre me expresse verdadeiramente, me impulsionando, diariamente, a ser um ser humano cada vez melhor!

À minha família que, por mais que eu escreva, nunca conseguirei colocar no papel o tamanho da admiração que tenho por cada um. Nunca conseguirei expressar gratidão o suficiente por dividir laços com tantas pessoas incríveis! Muito obrigado pela compreensão e apoio, sobretudo, nos momentos em que eu estive ausente, mas que me mostraram que o amor que sentem por mim não é menor por conta disso. Quero agradecer especialmente à minha mãe, que durante toda minha criação sempre priorizou minha educação pessoal e escolar. Sempre me deu suporte emocional, afetivo e financeiro para que eu continuasse nessa jornada, acreditando em mim, até mesmo

quando eu mesmo duvidava. Quero que saiba que para mim você é a personificação de força, perseverança e o exemplo de mulher a ser seguido!

Gostaria de agradecer também aos amigos da Biologia Celular: Jéssica (surpreendentemente uma pessoa maravilhosa), André, Thaís, Anny e William. À Profa. Annamaria Vago, por ceder uma alíquota de um de seus anticorpos para realização deste trabalho, à Profa. Fernanda Almeida, pelo auxílio com a obtenção dos ovos de galinha fertilizados, e aos demais professores que compartilharam todo seu conhecimento dentro e fora da sala de aula. Agradeço também aos funcionários da secretaria da pós-graduação, em especial Rhuanna e Paula, por sempre estarem dispostas a ajudar com as questões burocráticas. Estendo esses agradecimentos aos funcionários do Instituto de Ciências Biológicas pelo trabalho e dedicação diários a cada um que ali passa. Agradeço também à CAPES pela concessão e manutenção de minha bolsa até a conclusão do Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram a tornar este sonho uma realidade.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de sinalização induzidas pelas Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGMs).....	23
Figura 2. Principais vias de sinalização envolvendo as RGMs (Moléculas Orientadoras por Repulsão) e seu receptor Neogenina.....	27
Figura 3. Vias de sinalização envolvendo Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGMs), Neogenina e Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs).....	31
Figura 4. Compartimentalização dos somitos.....	37
Figura 5. Hierarquia dos fatores de transcrição que regulam a progressão da linhagem miogênica.....	41
Figura 6. <i>RGMa1</i> , uma isoforma de <i>RGMa</i> , apresenta expressão restrita em somitos durante o desenvolvimento embrionário.....	42
Figura 7. Alinhamento das sequências de <i>RGMa</i> e <i>RGMa1</i> de galinha.....	43
Figura 8. Esquema do vetor retroviral RCAS.....	47
Figura 9. Esquema do funcionamento do Kit <i>Gibson Assembly</i> ( <i>New England BioLabs</i> ).....	49
Figura 10. Esquema da coleta de somitos dos embriões de galinha.....	52
Figura 11. Esquema da compartimentalização dos somitos durante o desenvolvimento embrionário.....	56
Figura 12. Esquema da superexpressão em somitos com diferentes graus de compartimentalização.....	57
Figura 13. Possíveis Quadros de Leitura Abertos (ORFs) para <i>RGMa1</i> .....	61
Figura 14. Sequência de <i>RGMa1</i> e comparação de sua estrutura proteica com <i>RGMa</i> .....	62



Figura 15. Amplificação dos fragmentos de <i>RGMa1</i> e <i>RGMa</i> e digestão de RCAS no sítio de restrição <i>ClaI</i> .....	63
Figura 16. Resultado do BLASTn para a sequência de RCAS- <i>RGMa1</i> .....	64
Figura 17. Validação dos oligonucleotídeos a serem utilizados para RT-PCRq.....	65
Figura 18. Padronização da cultura de células de somito.....	66
Figura 19. RNA total extraído da cultura de células de somito de embrião de galinha.....	67
Figura 20. Avaliação do perfil transcricional das células de somitos de embrião de galinha aos 2, 5 e 10 dias em cultura.....	69
Figura 21. RNA total extraído das células de somito após superexpressão de <i>RGMa1</i> .....	70
Figura 22. Efeitos da superexpressão de <i>RGMa1</i> sobre a expressão gênica de células de somitos epiteliais.....	72
Figura 23. Efeitos da superexpressão de <i>RGMa1</i> sobre a expressão gênica de células de somitos maduros.....	74
Figura 24. Efeitos da superexpressão de <i>RGMa1</i> sobre as possíveis vias de sinalização dessa molécula em células de somito.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos obtidos para a subclonagem de RGMa1 em RCAS pelo método de Gibsson Assembly.....	46
Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para RT-PCR quantitativa (RT-PCRq).....	54
Tabela 3. Grupos experimentais obtidos a partir dos embriões de galinha em estágio HH10-11. ....	56
Tabela 4. Sumarização dos resultados decorrentes dos efeitos da superexpressão de RGMa1 sobre as células de somitos de embriões de galinha <i>in vitro</i> . ....	76

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

° C: graus Celsius

AMPc: adenosina 3,5-monofosfato cíclico

bFGF: Fator Básico de Crescimento de Fibroblasto

bHLH: *Basic Helix-loop-helix*

BMP: Proteína Morfogenética ssea

CEUA: Comissão de tica no Uso de Animais

C-RGM: domínio C-terminal das Moléculas Orientadoras por Repulsão

dATP: Deoxiadenosina trifosfato

dCTP: Deoxicitidina trifosfato

dGTP: Deoxiguanosina trifosfato

DMEM: *Dulbecco Modification of Minimum Essential Media*

DMSO: sulfóxido de dimetilo

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dTTP: Deoxitimidina trifosfato

E: explante

FAK: quinase de adesão focal

GFP: *Green Fluorescent Protein*

h: hora

IGF: Fator de Crescimento Semelhante  Insulina

JA: junções de aderência

LB: Lurina-Bertani

Lrig-2: proteína rica em repetições de leucina transmembrana 2

min: minuto

mM: milimolar

MRF: Fator Regulador de Miogênese

ng: nanograma

N-RGM: domínio N-terminal das Moléculas Orientadoras por Repulsão

Ntc: notocorda

ORF: *Open Reading Frame*

pb: Pares de base

PBS: Tampão Fosfato Salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RCAS: *Replication-Competent Avian Retroviruses*

RGM: Molécula Orientadora por Repulsão

RGMa: Molécula Orientadora por Repulsão Membro A

RGMa1: Molécula Orientadora por Repulsão Membro A1

RGMb: Molécula Orientadora por Repulsão Membro B

RGMc: Molécula Orientadora por Repulsão Membro C

RGMd: Molécula Orientadora por Repulsão Membro D

rpm: rotações por minuto

RT-PCRq: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa com transcriptase reversa

s: segundo

SFB: soro fetal bovino

TA: temperatura ambiente

TGF- $\beta$ : fatores de crescimento transformadores  $\beta$

TN: tubo neural

TNF: Fator de Necrose Tumoral

$\alpha$ MEM: *Minimum Essential Medium Eagle*

$\mu$ g: micrograma

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ M: micromolar

## RESUMO

A Molécula Orientadora por Repulsão a (RGMa) é uma proteína que foi primariamente relacionada à axonogênese, atuando via os receptores Neogenina e/ou como co-receptores da sinalização BMP. O padrão de expressão de *RGMa* durante o desenvolvimento do embrião de galinha sugeriu novas funções para esta molécula, incluindo a somitogênese e miogênese. Nosso grupo identificou uma isoforma de *RGMa* expressa exclusivamente em somitos, estruturas embrionárias transientes que originam as células musculares esqueléticas do tronco e as células-tronco musculares. Este estudo teve como objetivo caracterizar a sequência desta isoforma, denominada *RGMa1*; e investigar sua função biológica em células de somitos de embriões de galinha. A sequência de nucleotídeos revelou que *RGMa1* é produto de um *splicing* alternativo que ocorre sobre a sequência de *RGMa*, removendo completamente o domínio que codifica a porção N-terminal da proteína. Estes resultados sugerem que *RGMa1* exerce sua função nos somitos de forma ancorada à membrana plasmática. A análise funcional foi realizada por meio da superexpressão de *RGMa1* em células de somitos de embriões de galinha no estágio de 33-35h (HH10), compondo nos seguintes grupos: (i) somitos epiteliais caudais; (ii) somitos epiteliais associados ao tubo neural e notocorda; (iii) somitos maduros craniais; e (iv) somitos maduros associados às estruturas axiais. A superexpressão de *RGMa1* foi capaz de induzir a expressão dos fatores pré-miogênicos (*Pax3/Pax7*) e miogênicos (*MyoD/Miogenina/Desmina*) nas células dos grupos (i), (ii) e (iii). O grupo (iii) induziu ainda a expressão do fator miogênico *Myf5* e de  $\alpha$ -actinina. A superexpressão de *RGMa1* nas células do grupo (iv) induziram um resultado oposto: todos os marcadores testados foram identificados como reprimidos. Estes resultados sugerem uma importante função para *RGMa1* durante o estabelecimento das células satélites e da linhagem miogênica durante o desenvolvimento dos somitos ainda epiteliais; mas que sua expressão é regulada por fatores expressos pelas estruturas axiais após a maturação dos somitos. Foi observado ainda que os efeitos exercidos por *RGMa1* sobre a expressão dos marcadores pré-miogênicos e miogênicos não parecem ser exercidos pela ligação de *RGMa1* aos receptores Neogenina ou da via BMP, já que seus respectivos sinalizadores secundários não apresentaram alterações coerentes com os efeitos observados. Nossos resultados contribuem para adicionar *RGMa1* como um novo fator envolvido com a determinação miogênica nos somitos, um programa molecular que tem com aplicações médicas e potencial biotecnológico para o melhoramento de animais de corte.

**Palavras-chaves:** *RGMa1*, RCAS, somito, embrião de galinha, músculo esquelético

## ABSTRACT

The Repulsive Guidance Molecule a (RGMa) is a protein originally described playing role as a repulsive cue during axonogenesis, via the Neogenin and/or as co-receptors of the BMP signaling pathways. RGMa expression pattern during the chicken embryo development suggested additional roles for this protein, including during somitogenesis and myogenesis. Our group has previously identified a RGMa isoform exclusively expressed in the somites, which are transitory structures that give rise to the skeletal muscle cells of the trunk and also to the skeletal muscle stem cells. The objective of this study was to characterize the sequence of this isoform, RGMa1, and to investigate its biological function in chicken embryo somite cells in vitro. Nucleotide sequence analysis revealed that RGMa1 is produced by a post-transcriptional mechanism that occurs in the RGMa sequence, completely removing the domain that codify the N-terminal portion of the protein. These results suggested that RGMa1 plays its role as membrane-anchored protein. Functional analysis was performed in somite cells from 33-35h chicken embryos (HH10) which form the following groups: (i) caudal epithelial somites; (ii) caudal epithelial somites associated with the neural tube and notochord; (iii) cranial mature somites; and (iv) cranial mature somites associated with the axial structures. In addition RGMa1 overexpression could upregulate the expression of pre-myogenic (*Pax3/Pax7*) and myogenic (*MyoD/Miogenina/Desmina*) markers of cells from the groups (i), (ii) and (iii). RGMa1 could additionally induce *Myf5* and  $\alpha$ -actinin expression in the cells from group (iii). RGMa1 overexpression in the cells from group (iv), however, induced the opposite effect: all tested markers were found to be downregulated. These results suggest an important biological function for RGMa1 during the establishment of the myogenic cell lineages in the epithelial somites; and that RGMa1 expression is regulated by factors expressed by the axial structures after somite maturation. It is also important to note that RGMa1 effects on the expression of pre-myogenic and myogenic factors are not performed via Neogenin or BMP receptors, as it was not possible to note changes in their respective secondary messengers expression that could correlated with the observed effects. Our results contribute to include RGMa1 as a new factor involved with myogenesis, a molecular program that shows medical and biotechnological applications.

**Key words:** RGMa1, RCAS, somites, chicken embryo, skeletal muscle

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Revisão de Literatura.....	20
2.1. A família de Moléculas Orientadores por Repulsão (RGM).....	20
2.2. Vias de sinalização de RGMA.....	25
2.3. Relação entre RGMs, Neogenina e BMPs.....	28
2.4. RGM e o desenvolvimento da musculatura estriada esquelética.....	31
2.5. Somitogênese: compartimentalização dos somitos durante o desenvolvimento.....	34
2.6. Do miótomo à musculatura estriada esquelética.....	37
2.7. A isoforma somítica de RGMA: RGMA1.....	41
3. Objetivos.....	45
3.1. Objetivo Geral.....	45
3.2. Objetivos Específicos.....	45
4. Metodologia.....	46
4.1. Clonagem de <i>RGMA1</i> em vetor retroviral RCAS.....	46
4.2. Cultura de células de somitos.....	51
4.3. Superexpressão de <i>RGMA1</i> nas células de somitos em cultura.....	55
4.4. RT-PCR quantitativa (RT-PCRq) para marcadores de células de somito transfectadas com o construto RCAS-RGMA1.....	58
4.5. Western Blot para células de somitos transfectadas com o construto RCAS-RGMA1.....	58
5. Resultados.....	60
5.1. Predição da ORF da sequência nucleotídica de <i>RGMA1</i> .....	60
5.2. Clonagem da ORF 2 de <i>RGMA1</i> em RCAS.....	62

5.3. Validação dos pares de oligonucleotídeos obtidos para a determinação dos níveis de expressão gênica de marcadores de células satélites, miogênicos, de esclerótomo e mesodérmicos.....	64
5.4. Validação da cultura de células de somitos de embriões de galinha.....	65
5.5. Avaliação dos efeitos da superexpressão de <i>RGMa1</i> em células derivadas de somitos epiteliais, cultivadas na presença ou ausência células de tubo neural e notocorda, por RT-PCRq.....	70
5.6. Avaliação dos efeitos da superexpressão de <i>RGMa1</i> em células derivadas de somitos maduros, cultivadas na presença ou ausência células de tubo neural e notocorda, por RT-PCRq.....	72
5.7. Avaliação das prováveis vias de sinalização intracelulares induzidas por <i>RGMa1</i> em células derivadas de somitos.....	74
5.8. Resumo geral dos resultados decorrentes da superexpressão de <i>RGMa1</i> ....	76
6. Discussão.....	77
6.1. <i>RGMa1</i> codifica uma proteína que desempenha suas funções de forma ancorada à membrana plasmática.....	78
6.2. Nos somitos epiteliais caudais, <i>RGMa1</i> induziu a expressão do marcadores pré-miogênicos <i>Pax3</i> e <i>Pax7</i> e de uma via paralela de indução miogênica, independente de <i>Myf5</i> .....	79
6.3. Nos somitos maduros, <i>RGMa1-Pax3</i> também foi capaz de induzir um sutil aumento da expressão de <i>Myf5</i> .....	82
6.4. Os efeitos indutores de miogênese promovidos por <i>RGMa1</i> são inibidos nos somitos maduros cultivados na presença do TN+Ntc.....	83
6.5. <i>RGMa1</i> não promove o desenvolvimento do esclerótomo ou na manutenção do estado mesodérmico indiferenciado das células dos somitos.....	84
6.6. <i>RGMa1</i> não exerce seus efeitos sobre os fatores pré-miogênicos e miogênicos por vias conhecidas induzidas por <i>RGMa</i> (Neogenina e BMP).....	84
7. Conclusão.....	87
8. Referências bibliográficas.....	88
9. Anexo 1.....	107



## 1. INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento embrionário, proteínas de matriz extracelular, denominadas moléculas orientadoras, funcionam como pistas atrativas e/ou repulsivas capazes de guiar os axônios para correta inervação do organismo em formação (Colak *et al.*, 2013). Dentre essas proteínas, as Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGM) foram descritas no teto óptico de embriões de galinha exercendo papel repulsivo em axônios da região (Monnier *et al.*, 2002). Atualmente essa família de proteínas é composta por quatro membros (RGMA, RGMb, RGMc e RGMd) e se ancoram à membrana plasmática por uma cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI; Samad *et al.*, 2004). Além da capacidade de orientação axonal, as RGMs, junto a seu receptor Neogenina, estão envolvidas em uma gama de outros processos envolvendo o sistema nervoso em desenvolvimento, tais como adesão, diferenciação, regeneração e sobrevivência de neurônios (Matsunaga *et al.*, 2004; Schwab *et al.*, 2005; Wilson & Key, 2006).

Apesar de estarem associadas primariamente ao sistema nervoso, estudos mais recentes mostraram que as RGMs participam de processos biológicos diversos. RGMA possui importância médica, ao regular a inflamação e neurodegeneração em caso de encefalomielite autoimune, uma vez que sua expressão foi detectada em células do sistema imunológico (Muramatsu *et al.*, 2011). Além disso, RGMA está envolvida com doença de Parkinson (Müller *et al.*, 2016) e esclerose múltipla (Nohra *et al.*, 2010). A interação RGMA-Neogenina foi responsável por suprimir a formação de tubo endotelial, indicando que RGMA é capaz de inibir o processo de angiogênese (Fujita & Yamashita, 2017). Recentemente, o bloqueio da interação RGMb-Neogenina foi associada à inibição da hiperreatividade das vias aéreas induzidas por alérgenos (Yu *et al.*, 2016); RGMc participa da regulação da homeostase de ferro do organismo (Pietrangelo, 2007); e RGMd, até o presente momento, só foi identificada em peixes teleósteos (Camus & Lambert, 2007).

Durante o desenvolvimento do embrião de galinha, transcritos de RGMA e RGMb foram localizados, por hibridização *in situ*, em regiões fora do sistema nervoso, tais como nos somitos (Jorge *et al.*, 2012), as estruturas transientes que aparecem lateralmente ao tubo neural e que darão origem à musculatura esquelética do tronco,

vértebras, costelas e derme (Musumeci *et al.*, 2015). O padrão de expressão de *RGMa* revelou sua presença na região em que as células musculares progenitoras originam o miótomo e na região central do dermiótomo, local de origem das células-tronco musculares, células satélites (Blake & Ziman, 2014), evidenciado pela colocalização com transcritos do marcador para células satélites, *Pax7* (Jorge *et al.*, 2012). Esses dados sugerem que existe o envolvimento de *RGMa* com o estabelecimento e desenvolvimento da musculatura estriada esquelética.

O envolvimento de *RGMa* com a musculatura estriada esquelética de camundongos também vem sendo investigada. *RGMa*, *RGMb* e *RGMc* foram detectadas, por imunofluorescência, no sarcolema das fibras musculares, enquanto que somente *RGMa* mostrou-se expressa no sarcoplasma, apresentando um padrão estriado e colocalizado com as proteínas sarcoméricas Desmina e Titina (Martins *et al.* 2015). Por meio de ensaios de superexpressão e *knockdown* de *RGMa*, percebeu-se que esta molécula funciona como um fator hipertrófico da musculatura estriada esquelética. A superexpressão de *RGMa* promoveu maior índice de fusão de mioblastos e um aumento significativo na largura das fibras musculares, ao passo que a inibição de *RGMa* gerou fibras com perfil atrófico (Martins *et al.* 2015).

Outros fatores estão relacionados à regulação do tamanho da fibra muscular estriada esquelética, além de *RGMa*. Estudos envolvendo o receptor das RGMs, Neogenina, e *RGMc* também demonstraram que essas moléculas estão associadas à regulação positiva do tamanho da célula muscular estriada esquelética (Bae *et al.*, 2015). Mais recentemente, trabalhos evidenciaram que as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) estão associadas à deposição de massa muscular ao controlar funcionalmente as células satélites durante a miogênese (Sartori & Sandri, 2015). Interessantemente, as RGMs são descritas como correceptoras de BMPs (Samad *et al.*, 2005) e, uma vez que os efeitos hipertróficos sobre a musculatura estriada esquelética tenha sido observada, de maneira independente, para RGMs, Neogenina e BMPs, deve-se pressupor um envolvimento entre todas elas com esse fenótipo observado para a musculatura.

Como visto, *RGMa* encontra-se presente em todo o desenvolvimento muscular do organismo, desde sua formação e estabelecimento nos somitos até a composição do sarcômero em uma fibra muscular madura. Surpreendentemente, a caracterização de *RGMa* em somitos de embriões de galinha revelou que, durante esta fase do

desenvolvimento, RGMa apresenta-se como uma isoforma menor e exclusiva, denominada RGMa1. Nenhuma função foi atribuída à expressão de RGMa1 nos somitos durante o desenvolvimento, até a realização do presente trabalho.

Além de identificação de uma nova molécula, a adição de RGMa1 à complexa rede de moléculas que participam do desenvolvimento e estabelecimento da musculatura esquelética, pode se tornar um novo alvo para tratamentos de distrofias e atrofia, contribui para produção animal e, até mesmo, para fins estéticos (Bushby *et al.*, 2010; Emery *et al.*, 2015). Quando a célula muscular adulta passa por eventos de hipertrofia, hiperplasia ou reparo há uma remontagem do processo que ocorre na fase de desenvolvimento embrionário, com a expressão dos mesmos fatores de transcrição e deposição proteica, e, por isso, faz-se importante conhecer e identificar o maior número de moléculas que podem ser usadas, por exemplo, para bioengenharia tecidual na criação de *scaffolds* musculares criados *in vitro* (Klumpp *et al.* 2010; Kwee & Mooney, 2017).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A família de Moléculas Orientadores por Repulsão (RGMs)

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, neurônios devem se dirigir e atingir diferentes regiões alvo do organismo em formação (Huber *et al.*, 2003). O crescimento axonal é conduzido por proteínas presentes na matriz extracelular: as Moléculas Orientadoras (Kolodkin & Pasterkamp, 2013). Estas proteínas funcionam como pistas (atrativas e/ou repulsivas) para migração de neurônios em desenvolvimento e podem associar-se à membrana plasmática, apresentando uma atuação com efeitos locais, ou podem ser secretadas, atuando como agentes de longo alcance (Van Battum *et al.*, 2015). Os cones de crescimento dos axônios em formação possuem receptores de membrana especializados, capazes de reconhecer e interagir com essas moléculas presentes na matriz extracelular (Chilton, 2006), que são capazes de orientar e reorganizar o citoesqueleto dos cones de crescimento, direcionando-os corretamente para suas regiões alvo (Pasterkamp & Kolodkin, 2013). Embora exista uma gama de mensageiros secundários intracelulares, destacam-se o íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e a adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC), envolvidos diretamente com o direcionamento do cone de crescimento dos axônios (Nicol *et al.*, 2011; Sutherland & Goodhill, 2013).

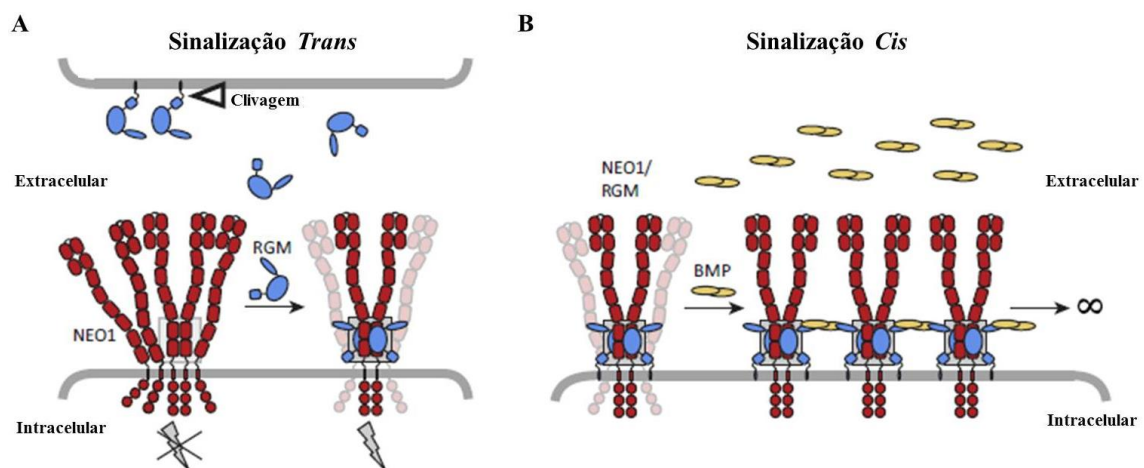
Um total de cinco famílias de proteínas orientadoras canônicas, bem como seus respectivos receptores, foram identificadas desempenhando papéis importantes durante os processos de expansão da inervação do sistema nervoso central e periférico: Efrinas, Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGMs), Netrinas, Semaforinas e Slits, (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996; Mueller, 1999; Van Battum *et al.*, 2015; Tamariz e Varela-Echavarría, 2015). As moléculas orientadoras são divididas em dois grupos: as atrativas, (as Efrinas e Netrinas), que são capazes de atrair o crescimento axonal para determinada região por meio da polarização da atividade protrusiva do cone axonal (Klein, 2012; Lai Wing Sun *et al.*, 2011), e as repulsivas (RGMs, Semaforinas e Slits), orientadores que repelem o crescimento axonal, inibindo a atividade protrusiva do cone de crescimento em suas proximidades (Severyn *et al.*, 2009; Ysilanti *et al.*, 2010; Pasterkamp, 2012). No entanto, dependendo do contexto em que se encontre (as moléculas orientadoras e o tipo de receptor envolvido na sinalização), o mesmo grupo de moléculas orientadoras pode sofrer uma conversão de seus efeitos; como, por exemplo, as Netrinas, que passam a ter uma ação repulsiva quando ligada ao receptor UNC-5 (Merz *et al.*, 2001).

Moléculas Orientadoras por Repulsão formam uma família de orientadores axonais que foram primeiramente identificadas no teto óptico em embriões de galinha (Monnier *et al.*, 2002). Atualmente, são descritos quatro membros da família RGM em vertebrados: RGMa (ou simplesmente RGM); RGMb (ou DRAGON); RGMc (também chamado de Hemojuvelina, HJV ou *HFE2*); e RGMd (identificada apenas em peixes teleósteos). As proteínas desta família também são encontradas em invertebrados, como o *Caenorhabditis elegans*, os quais possuem um único gene para RGM (Camus & Lambert, 2007). RGMa, RGMb e RGMc possuem 50-60% de identidade entre si, enquanto RGMd possui 30-40% em relação aos outros três membros da família. Todas as RGMs compartilham padrões estruturais: um peptídeo-sinal na porção N-terminal; um domínio parcial do Fator de von Willebrand tipo D (vWF-tipo D), que inclui um sítio de clivagem proteolítica altamente conservado, alvo das Furinas e proteínas SKI-1 (Tassew *et al.*, 2012); um domínio hidrofóbico e uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (âncora-GPI) em seu domínio C-terminal (Monnier *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2006). Além disso, o motivo RGD (Arg-Gly-Asp), relacionado à adesão célula-célula, é conservado em RGMa e RGMc (Samad *et al.*, 2004). As RGMs sinalizam via o receptor Neogenina (que é também receptor de Netrin), composta por quatro domínios semelhantes a imunoglobulinas, seguidos por seis domínios de fibronectina tipo III, um domínio transmembrana e uma porção intracelular (Rajagopalan *et al.*, 2004; Fitzgerald *et al.*, 2006; Vielmetter *et al.*, 2009).

Durante muitos anos, as RGMs representaram um verdadeiro quebra-cabeças molecular devido à inexistência de homologia estrutural entre elas e qualquer proteína existente (Siebold *et al.*, 2017). Entretanto, estudos recentes revelaram sua estrutura tridimensional e identificaram dois domínios ordenados e estabilizados por pontes dissulfeto que são conectados por um ligante flexível (Bell *et al.*, 2013; Healey *et al.*, 2015). O domínio N-terminal (N-RGM) é composto de um feixe com três hélices que abriga o motivo RGD, tradicionalmente reconhecida por ser importante em processos de adesão mediados por Integrinas (Humphries *et al.*, 2006); porém, até o momento, não há vinculação entre este motivo, ou sinalização mediada por ele, entre RGMs e Integrinas (Siebold *et al.*, 2017). O domínio C-terminal (C-RGM) é o principal sítio de interação de alta-afinidade com o receptor Neogenina. No complexo estrutural C-RGM-Neogenina, duas moléculas RGMs atuam como um grampo molecular reunindo os domínios justamembranas de fibronectina do tipo III de dois receptores Neogenina (Bell

*et al.*, 2013). A complexa arquitetura RGM-Neogenina é proposta para induzir a dimerização intracelular de Neogenina e posicionar suas porções C-terminais em estreita proximidade entre si, que pode indicar a existência de um mecanismo de transdução de sinal através da membrana plasmática mediada por este receptor (Yang *et al.*, 2008; **Figura 1A**).

As interações mediadas pela sinalização das RGMs podem ser do tipo *trans* (intercelular) ou *cis* (na própria célula). A sinalização *trans* (**Figura 1A**) pode ser dependente de contato (adesivo) ou mediada por gradientes estabelecidos pela clivagem extracelular de isoformas das RGMs (Lee *et al.*, 2010). O sítio de ligação entre RGM e o domínio de fibronectina de Neogenina, localizado próximo à membrana plasmática, juntamente à complexa arquitetura RGM-Neogenina indicam que a liberação do ectodomínio de RGM deve ser mediada por células vizinhas (Siebold *et al.*, 2017). A sinalização *trans* é relevante para funções celulares como o crescimento e orientação axonal (Wilson & Key, 2006), estágios iniciais da neurulação (Kee *et al.*, 2008), adesão e ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Muramatsu *et al.*, 2011), e migração de leucócitos (Mirakaj *et al.*, 2011). Em contrapartida, na sinalização *cis* (**Figura 1B**), a clivagem do ectodomínio de RGM não se faz necessária, uma vez que tanto Neogenina quanto RGM são expressas na superfície da mesma célula, como ocorre em condrócitos (Zhou *et al.*, 2010) e hepatócitos (Zhang *et al.*, 2009). Adicionalmente, estudos recentes indicam que ambas, RGMs e Neogenina, são proteoliticamente processadas. Este processamento libera RGM da superfície celular em determinadas situações, diversificando os efeitos de sua via de sinalização e também controlando a duração do tempo de sinalização após acoplamento do ligante (De Vries & Cooper, 2008; Tian & Liu, 2013).



**Figura 1. Tipos de sinalização induzidas pelas Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGM).** (A). Modelo proposto para a sinalização *trans* de RGM. O ectodomínio de RGM pode ser clivado por ação de fosfolipases ou enzimas proteolíticas (triângulo). RGM liga-se aos ectodomínios dos receptores Neogenina, localizados em outras células, estabilizando-os e organizando-os em dímeros e, subsequentemente, ativando a cascata de sinalização. (B). Modelo proposto para a sinalização *cis* de RGM. RGMs funcionam como uma ponte estrutural entre seu receptor Neogenina e o ligante BMP, formando clusters ao longo da membrana plasmática. Figura adaptada de Siebold *et al.*, 2017.

Em relação aos membros que compõem a família RGM, RGMa foi clonada a partir de um RNA mensageiro isolado do teto óptico do embrião de galinha (Monnier *et al.*, 2002). Durante o desenvolvimento embrionário de camundongo, RGMa foi inicialmente identificada no estágio E8.5 e persiste durante todo o desenvolvimento (Schmidtmer & Engelkamp, 2003). Foi encontrada em várias regiões craniais, incluindo mesencéfalo, hipocampo, parte do tronco cerebral e da medula espinhal (Brinks *et al.*, 2004; Niederkofler *et al.*, 2004; Oldekamp *et al.*, 2004). Estas mesmas observações têm sido relatadas também em galinha e *zebrafish* (Matsunaga *et al.*, 2004; Samad *et al.*, 2004; Jorge *et al.*, 2012). RGMa inibe axônios temporais da retina de penetrarem na região posterior do teto óptico, orientando-os corretamente para sua região alvo (Monnier *et al.*, 2002). Neogenina é expressa em axônios temporais da retina e a interação RGMa-Neogenina mostrou ser a responsável pela quimiorrepulsão mediada por RGMa nesses neurônios (Rajagopalan *et al.*, 2004, Tassew *et al.*, 2014).

A expressão de RGMb foi observada nos gânglios das raízes dorsais do sistema nervoso simpático e que seu possível promotor estava vinculado ao fator de transcrição *homeobox*, DRG11 (Ding *et al.*, 2003). RGMb também foi detectada na medula espinhal (exceto na zona ventricular) e no tubo neural em desenvolvimento antes da expressão de DRG11, além de ser encontrada em outras áreas do sistema nervoso em que DRG11 não é sintetizada (Samad *et al.*, 2004). No entanto, ao invés de promover a repulsão axonal, foi mostrado que RGMb promove a adesão de neurônios do gânglio da raiz dorsal em camundongos (Samad *et al.*, 2004). Além disso, resultados oriundos de ensaios de hibridização *in situ* têm mostrado a expressão de RGMb na retina, nervo óptico e regiões do cérebro em desenvolvimento, incluindo prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Oldekamp *et al.*, 2004; Schnichels *et al.*, 2007; Jorge *et al.*, 2012).

Sabe-se que, em galinha, axônios de neurônios das raízes dorsais não expressam Neogenina endógena (pelo menos na galinha) e esses axônios não são responsivos para

RGMa, indicando que RGMb poderia sinalizar de maneiras alternativas. No entanto, existe algum nível de resposta quando Neogenina é expressa de algum modo (Rajagopalan *et al.*, 2004). Têm-se observado uma interação entre RGMb e Neogenina, que pode estar envolvida na migração neuronal do giro denteado do hipocampo (Conrad *et al.*, 2010). A associação entre RGMb e Neogenina demonstrou a capacidade de controlar a proporção de células da glia e neurônios no epitélio olfatório em desenvolvimento, visto que RGMb-Neogenina promove interações célula-célula entre neurônios recém-diferenciados e células progenitoras (Kam *et al.*, 2016). Mais recentemente, RGMb foi associada com a regeneração axonal e remodelação de sinapses em ratos que sofreram infarto cerebral isquêmico (Wang *et al.*, 2017); além de ser capaz de coestimular a ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup>, polarizando a resposta inflamatória para uma resposta do tipo Th1 e suprimindo uma resposta Th2 em camundongos asmáticos (Nie *et al.*, 2017).

RGMc é o membro da família cuja expressão foi detectada durante a diferenciação muscular esquelética no desenvolvimento embrionário e parece não estar diretamente envolvida com a repulsão axonal (Papanikolaou *et al.*, 2004). Durante o desenvolvimento de camundongos, no estágio E11.5, transcritos de RGMc foram notados primeiramente nos somitos, precursores da musculatura esquelética (Kuninger *et al.*, 2004). A expressão de RGMc faz-se também presente no coração, fígado, ossos e cartilagens (Niederkofler *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2007). Além disso, RGMc está envolvida com o metabolismo de ferro do organismo, participando da regulação do hormônio hepático hepcidina (Pietrangolo, 2007; Torti *et al.*, 2016).

Semelhante à RGMa, RGMc é capaz de ligar-se à porção extracelular de Neogenina (Kuns-Hashimoto *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008) e sofre clivagem autocatalítica (Bell *et al.*, 2013). As formas solúveis de RGMc foram encontradas no soro de humanos (Lin *et al.*, 2005; Brasse-Lagnel *et al.*, 2010), ratos (Zhang *et al.*, 2007) e camundongos (Kuninger *et al.*, 2008). Estas formas podem ser geradas também por clivagem proteolítica por ação de Furinas e outras convertases (Silvestri *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008) ou por Matriptase-2 (Silvestri *et al.*, 2008). A âncora-GPI de RGMc pode ser clivada por ação da Fosfolipase A, evidenciando, portanto, a versatilidade de RGMc em diversos processos biológicos (Lin *et al.*, 2008).

RGMd foi o último membro da família identificado (Camus & Lambert, 2007) e novos trabalhos mostraram sua expressão no sistema nervoso e musculatura esquelética



durante o desenvolvimento de *zebrafish* (dados do grupo de pesquisa ainda não publicados).

## 2.2. Vias de sinalização de RGMa

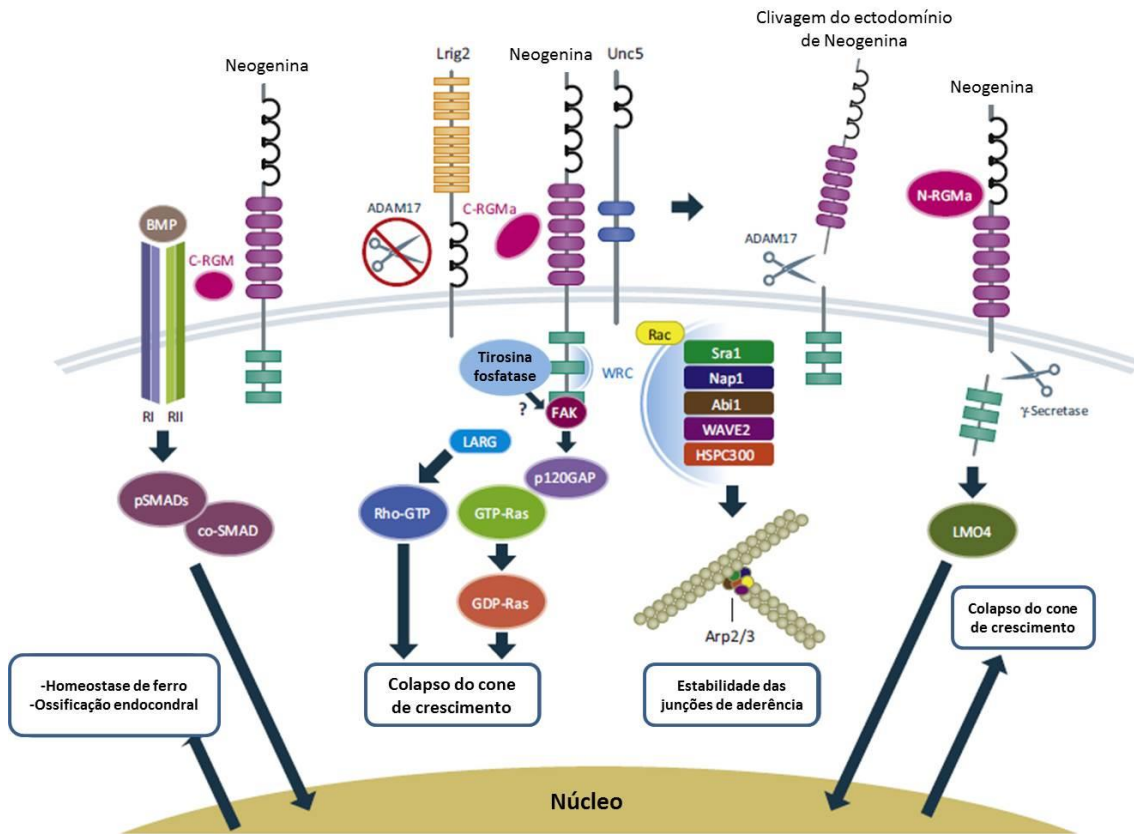
Os efeitos inibitórios das RGMs sobre o crescimento de neuritos foram estudados extensivamente e são dependentes da sinalização de Rho-GTPases em sinalização à jusante de RGMa (Conrad *et al.*, 2007; Kubo *et al.*, 2008; Tassew *et al.*, 2009). A ligação de RGMa à Neogenina, juntamente ao correceptor Unc5-B, promove a ativação de RhoA (uma pequena proteína que se liga ao GTP e que é importante na dinâmica do citoesqueleto de Actina) por meio de LARG (**Figura 2**), um fator de troca de nucleotídeo guanina (Conrad *et al.*, 2007; Hata *et al.*, 2009). Em paralelo, as interações RGMa-Neogenina ativam uma quinase de adesão focal (FAK) e p120GAP, que consequentemente reduz a atividade de Ras, outra GTPase da mesma família de RhoA (Endo & Yamashita, 2009; **Figura 2**). Este aumento da ativação de RhoA e a diminuição da atividade de Ras mediados por RGMa-Neogenina levam ao colapso do cone de crescimento axonal (Siebold *et al.*, 2017).

O processamento de RGMa é complexo e envolve clivagens autocatalíticas e proteolíticas, por ação de enzimas Furinas e SKI-1, originando um total de sete formas diferentes dessa proteína, das quais quatro são ancoradas à membrana plasmática (C-RGMa) e três solúveis (N-RGMa; Tassew *et al.*, 2012). Suspeita-se que a existência desses diversos peptídeos ativaria vias de sinalização distintas e que exerceriam efeitos diferentes na repulsão de axônios embrionários. Todas as formas, ancoradas à membrana e/ou solúveis, ligam-se ao domínio 3-4 de fibronectina III de Neogenina, de modo que N-RGMa influenciou o crescimento e a orientação de axônios *in vitro*; enquanto C-RGMa afetou apenas o crescimento axonal (Banerjee *et al.*, 2016; Siebold *et al.*, 2017). C-RGMa estimula a cascata de sinalização que envolve a ativação de LARG e RhoA, ao passo que a sinalização de N-RGMa favorece a ação de  $\gamma$ -secretase que cliva o domínio intracelular de Neogenina, que, por sua vez, ativa o cofator de transcrição LMO4, acarretando no colapso do cone de crescimento axonal (Banerjee *et al.*, 2016; **Figura 2**). É interessante notar que a incubação prévia com C-RGMa aboliu completamente a ligação N-RGMa-Neogenina, ao passo que a pré-incubação com N-RGMa também foi capaz de reduzir a interação entre C-RGMa e Neogenina (Tassew *et al.*, 2012). Portanto, é possível inferir que as concentrações locais

de C-RGMA e N-RGMA determinam quais desses pequenos peptídeos interagirão com Neogenina na regulação dessa gama de eventos biológicos nos diferentes tecidos e órgãos.

Estudos envolvendo o crescimento de neuritos e migração neuronal demonstraram que a proteína 17 que contém o domínio de metaloproteinase e desintegrina A (ADAM-17) é capaz de se ligar e clivar a porção extracelular de Neogenina, reduzindo sua expressão na superfície celular (remetendo um papel proteolítico na sinalização de Neogenina) e que, conseqüentemente, dessensibiliza axônios para RGMA (Okamura *et al.*, 2011). van Erp e colaboradores (2015) evidenciam que a proteína rica em repetições de leucina transmembrana 2 (Lrig-2) regula ADAM-17 negativamente, uma vez que a Lrig-2 exerce um papel protetor quando se liga à Neogenina, evitando a clivagem prematura desse receptor por ação de ADAM-17. RGMA reduz as interações Lrig-2-Neogenina, facilitando o acesso de ADAM-17 à Neogenina, resultando na clivagem do ectodomínio da mesma (**Figura 2**).

Durante o desenvolvimento embrionário, a morfogênese epitelial é fundamental para a organogênese do embrião, uma vez que os movimentos epiteliais altamente coordenados geram estruturas complexas, como o tubo neural (Niederkofler *et al.*, 2004; Kee *et al.*, 2013). A depleção de Neogenina e/ou RGMA no início do desenvolvimento leva a uma perda da adesão e da polaridade baso-apical do neuroepitélio, resultando em falha do fechamento do tubo neural (Niederkofler *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2016). E-Caderinas promovem a adesão célula-célula encontradas nas junções de aderência (JA), que são fundamentais na manutenção da organização do epitélio. A estabilidade das junções requer uma interação recíproca entre as Caderinas e os anéis de Actina circunferente que corre paralelamente às JA (Kee *et al.*, 2008). Neogenina apresenta-se como um componente fundamental da maquinaria de nucleação de Actina, promovendo a formação de anéis de Actina estáveis nas JA pelo acoplamento espacial de Arp-2/3, mediando a nucleação de actina através do recrutamento do complexo regulatório de onda (WRC; Lee *et al.*, 2016; **Figura 2**). O *knockdown* de RGMA induziu à desestabilização de JAs e mostrou que a localização de WCR foi similar ao observado quando Neogenina foi depletada (Lee *et al.*, 2016). Esses dados sugerem que Neogenina e RGMA atuam em conjunto na estabilização das JAs.



**Figura 2. Principais vias de sinalização envolvendo as RGMs (Moléculas Orientadoras por Repulsão) e seu receptor Neogenina.** RGMs atuam como correceptores das BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas) e tem sido proposto que atuam como uma ponte estrutural entre BMP e Neogenina. Interações entre as RGMs e BMPs têm implicações no metabolismo e homeostase de ferro e também no desenvolvimento da ossificação endocondral. A ligação de RGMa à Neogenina inibe a interação entre Neogenina e Lrig-2 (proteína rica em repetições de leucina transmembrana 2), permitindo que a enzima ADAM-17 (proteína 17 que contém o domínio de metaloproteinase e desintegrina A) clive o ectodomínio de Neogenina levando à interrupção do sinal. De modo geral, RGM-Neogenina ativa RhoA através de Unc-5 e LARG, e inibe Ras via FAK (quinase de adesão focal) e p120RasGAP, induzindo ao colapso do cone axonal. No entanto, a via de sinalização depende do processamento proteolítico das RGMs, de modo que C-RGM ativa a via RhoA e N-RGM relaciona-se à clivagem do domínio intracelular de Neogenina por ação de  $\gamma$ -secretase e LMO4. Em células epiteliais, Neogenina liga-se ao complexo regulatório WRC, e concomitantemente à ação de Rac1, leva à nucleação de actina através de Arp-2/3, estabilizando as junções de aderência. Figura adaptada de Siebold *et al.*, 2017.

Além de seu papel na orientação dos axônios e se apresentar como uma proteína sinalizadora, RGMa também está envolvida em processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência neuronais (Matsunaga *et al.*, 2006; Demicheva *et al.*, 2015). Em mamíferos, encontrou-se uma elevada expressão de RGMa após injúria no sistema nervoso central. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que essa molécula é um

inibidor chave para impedir também a formação de neuritos cerebelares após o nascimento (Hata *et al.*, 2006). Recentemente, RGMa também tem sido associada à esclerose múltipla (Nohra *et al.*, 2010; Demicheva *et al.*, 2015), encefalomielite autoimune (Tanabe & Yamashita, 2014), supressão de angiogênese (Harada *et al.*, 2016; Fujita & Yamashita, 2017; Zhang *et al.*, 2017) e envolvida na doença de Parkinson (Müller *et al.*, 2016).

### 2.3. Relação entre RGMs, Neogenina e BMPs

As RGMs foram identificadas como correceptores da sinalização induzida por BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas). RGMb foi o primeiro membro da família a ser identificado como correceptor para BMP, potencializando a sinalização de BMP-2 e BMP-4 *in vitro* (Samad *et al.*, 2005). Posteriormente, a mesma capacidade foi descoberta para RGMa (Babitt *et al.*, 2005) e RGMc (Babitt *et al.*, 2006). As transfecções de RGMa e RGMb em células responsivas a BMP aumentaram a sinalização endógena de BMP via Smad1/5/8 *in vitro* (Babitt *et al.*, 2005). De um modo geral, pode-se constatar que RGMa, RGMb e RGMc estão diretamente envolvidas com a sinalização de BMP-2 e BMP-4, mas não estão vinculadas à BMP-7, Activina, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, já que os níveis de expressão dos sinalizadores intracelulares induzidos por estas moléculas mantiveram-se inalterados após manipulação da expressão das RGMs *in vitro* (Xia *et al.*, 2007).

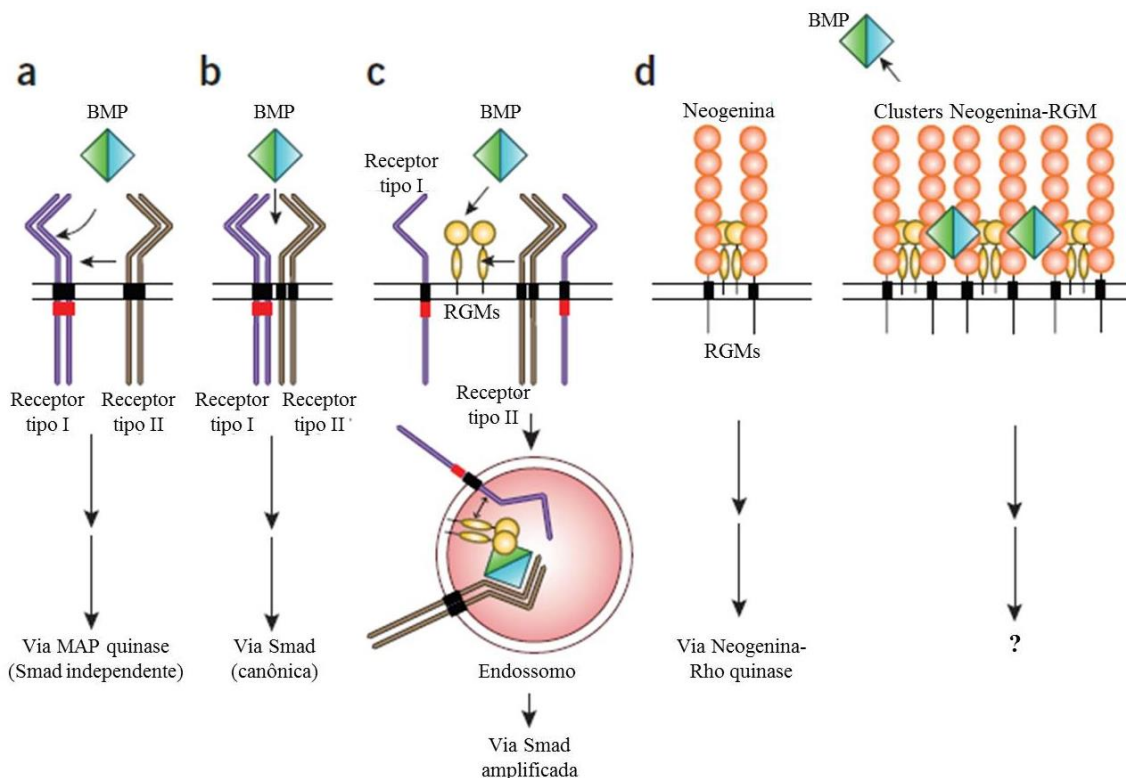
BMPs compreendem um grande subgrupo, com mais de vinte membros, pertencentes à família TGF- $\beta$  (Fatores de Crescimento Transformadores  $\beta$ ; Hogan, 1996; Weiss & Attisano, 2013). BMPs exercem uma multiplicidade de funções durante o desenvolvimento embrionário e em organismos adultos, controlam a manutenção, proliferação, diferenciação, quimiotaxia, apoptose e regeneração em vários tecidos e órgãos (Massagué & Chen, 2000; Carreira *et al.* 2014). Para que as BMPs atuem como morfógenos, a sua sinalização deve ser rigorosamente regulada para assegurar a ativação espaço-temporal adequada e respostas específicas à jusante (Massagué, 2012). O complexo ativo de sinalização de BMP consiste de um ligante BMP (um dímero ligado por uma ponte dissulfeto) que se liga aos receptores transmembranares BMP tipo I (total de quatro: ALK, ACVR-1, BMPR-1A and BMPR-1B) e tipo II (três: ACVR-2A, ACVR-2B a BMP-R2; Bragdon *et al.*, 2011; **Figura 3**). A ativação dos receptores BMP depende da maneira como estes se apresentam na membrana plasmática: caso se

apresentem como um complexo de receptores pré-formados, a via canônica Smad 1/5/8 é favorecida (**Figura 3b**); ao passo que se se apresentarem como receptores separados entre si, o ligante BMP acopla-se primeiramente ao receptor tipo I, que em seguida é fosforilado pelo receptor tipo II, promovendo a via não-canônica de BMP, dependente de MAP quinase (Derynck & Zhang, 2003; Feng & Derynck, 2005; Nickel *et al.*, 2009; **Figura 3a**).

As RGMs são ativadores cruciais da sinalização de BMP e o domínio N-RGM apresenta um sítio de alta afinidade ao ligante de BMP, revelado por cristalografia (Wu *et al.*, 2012). Uma comparação entre as estruturas BMP-RGM e BMP-receptor tipo I mostrou que RGM compartilha o mesmo sítio de ligação que o ectodomínio do receptor tipo I BMP-R1A para o ligante; essa semelhança não é observada entre a estrutura de RGM e o receptor BMP do tipo II (Healey *et al.*, 2015). Essa descoberta gerou questionamentos, uma vez que para ocorrer a sinalização Smad-dependente é necessário que o ligante seja capaz de ativar ambos os tipos de receptores BMP (Halbrooks *et al.*, 2007; Mueller, 2015). Um modelo envolvendo vias de endocitose foi então proposto para elucidar essa semelhança entre RGM e o receptor BMP-R1A, já que a interação RGM-BMP é pH dependente, enquanto que a interação BMP-receptores de BMP não é (Healey *et al.* 2015). Nesse modelo, a porção N-terminal de uma RGM ancorada à membrana se ligaria ao ligante BMP e conseguiria formar um complexo ativado ao recrutar o receptor BMP do tipo II livre. Esse complexo RGM-BMP-receptor tipo II pode ser direcionado para endossomos, que são enriquecidos com receptores BMP do tipo I, já que eles sofrem constante processo endocítico (Hartung *et al.*, 2006; Healey *et al.*, 2015). O pH ácido do endossomo favoreceria a dissociação do complexo anteriormente formado e neste momento RGM poderia ser substituída pelo receptor BMP tipo I, acarretando numa potencialização da via de sinalização Smad providenciada pelo ambiente endossômico em comparação com a membrana celular (Di Guglielmo *et al.*, 2003; Hartung *et al.*, 2006; Mueller, 2015; **Figura 3c**). Entretanto, novos estudos são necessários para comprovação desse modelo e também para elucidar o contexto biológico pelos quais as RGMs afetariam diretamente a via BMP.

Muitas evidências sugerem a interligação funcional entre as vias de sinalização Neogenina e BMP, muito provavelmente por ação das RGMs (Zhang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Dados oriundos da dispersão de raios X e de microscopia de super-resolução mostraram que o domínio extracelular completo de RGM (RGMb)

funciona como uma ponte estrutural capaz de interligar o ligante BMP (BMP-2) ao domínio III de fibronectina da Neogenina (Healey *et al.* 2015). Na presença do ligante de BMP, RGM e Neogenina formam grandes *clusters* moleculares na membrana plasmática, indicando que a modulação da via BMP possa ser dependente da via de Neogenina (Mueller, 2015; Siebold *et al.* 2017). Até o presente momento não se sabe a função desses *clusters* BMP-RGM-Neogenina presentes na membrana (**Figura 3d**); porém já foi demonstrado que a organização de receptores em *clusters* são de extrema importância para sinalização de várias citocinas da família TNF (Fator de Necrose Tumoral), por exemplo (Scott *et al.*, 2009). Desse modo, novos estudos são requeridos para saber se os *clusters* formados são um mecanismo de BMPs modulando a via Neogenina, ou vice-versa, a via Neogenina modulando a via BMP ou, ainda, se ambos podem ocorrer, resultantes de uma modulação mútua.



**Figura 3. Vias de sinalização envolvendo Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGMs), Neogenina e Proteínas Morfogênicas Ósseas (BMPs).** (a) Complexo de sinalização induzido por BMP. A ativação dos receptores ocorre quando o ligante BMP (losangos azuis e verdes) liga-se, primeiramente ao receptor tipo I de alta afinidade (roxo), que recruta o receptor tipo II de baixa afinidade (marrom), levando a

transfosforilação e ativação da via MAP quinase. **(b)** A via canônica, Smad dependente, de BMP ocorre quando o ligante BMP acopla-se a receptores pré-formados tipos I e II. **(c)** O ligante de BMP provavelmente será recrutado da membrana por ação dos correceptores RGM, que mimetizam o receptor tipo I (BMP-RII). Esse complexo pode se associar ao receptor BMP do tipo II e sofrerem endocitose. Esse complexo encaminhado para compartimentos endossômicos carrega junto consigo o receptor de BMP do tipo I, que sofre endocitose constantemente. O ambiente ácido do endossomo promove o desligamento do ligante BMP da RGM, que é substituída pelo receptor BMP do tipo I, amplificando a sinalização da via Smad a partir dos endossomos. **(d)** RGMs atuam ao se ligar ao receptor Neogenina (círculos vermelhos), ativando a via Rho quinase. A presença de ligante BMP promove a formação de grandes clusters BMP-RGM-Neogenina na superfície da membrana, possivelmente modulando a sinalização de neogenina ou ativando uma via de sinalização ainda não estudada. Figura adaptada de Muller, 2015.

#### **2.4. RGM e o desenvolvimento da musculatura estriada esquelética**

Novos estudos têm demonstrado que a família RGM participa de outros processos biológicos importantes além da repulsão axonal durante a embriogênese (Harada *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Fujita & Yamashita, 2017).

A associação das RGMs com a musculatura esquelética foi sugerida pela análise de um microarranjo contendo aproximadamente 4.500 transcritos de galinha (Jorge *et al.*, 2010). Nesse estudo, transcritos de *RGMa* foram encontrados exclusivamente expressos no tecido muscular esquelético (Jorge *et al.*, 2010). A análise do padrão de expressão de *RGMa* e *RGMb* durante o desenvolvimento de embriões de galinha sugeriu que estas moléculas orientadoras estão envolvidas com a miogênese. Além do sistema nervoso, transcritos para *RGMa* e *RGMb* foram detectados nos somitos, que são estruturas transientes que originarão os músculos esqueléticos epaxiais, derme, tendões, vértebras e costelas (Jorge *et al.*, 2012). Transcritos de *RGMa* foram inicialmente identificados nas porções epiteliais dos somitos recém-formados, seguido de expressão restrita à parede medial dos somitos e às células musculares progenitoras que se depositam para formar o miótomo (Jorge *et al.*, 2012). Em estágios mais avançados, a expressão de *RGMa* foi identificada na porção central do dermomiótomo, responsável, nesse momento, pela formação de precursores musculares esqueléticos e também das células satélites, as células-tronco da musculatura esquelética adulta (Gros *et al.*, 2005; Jorge *et al.*, 2012). *RGMa* mostrou-se expresso também no miótomo em formação, responsável pela formação de células musculares esqueléticas (Jorge *et al.*, 2012). Estes

trabalhos sugeriram, portanto, uma associação desta molécula orientadora com o estabelecimento e desenvolvimento da musculatura esquelética de vertebrados.

Nas fases iniciais do desenvolvimento, transcritos de RGMb foram inicialmente identificados nos somitos epitelizados recém-formados e depois a expressão começa a se restringir à parede medial do somito, local das células musculares progenitoras (Jorge *et al.*, 2012). Nas fases mais tardias do desenvolvimento, a expressão de RGMb continua no somito compartimentalizado, na região do miótomo. Além disso, RGMb foi expressa no centro dos arcos faríngeos, que vão originar a musculatura branquimética (Jorge *et al.*, 2012). Esses achados sugerem que, assim como RGMc, RGMa e RGMb também estão envolvidas com o desenvolvimento da musculatura esquelética dos vertebrados.

A função das RGMs na musculatura adulta também vem sendo investigada. Em um trabalho recente, RGMa, RGMb e RGMc foram identificadas, por imunofluorescência, no sarcolema e somente RGMa no sarcoplasma de fibras musculares adultas de camundongos (Martins *et al.*, 2015). No sarcoplasma, RGMa apresentou um padrão estriado, similar ao observado para proteínas sarcoméricas, como Desmina e Titina (Martins *et al.*, 2015). A função biológica de RGMa nas células musculares esqueléticas foi investigada *in vitro* e revelou que células em que houve a superexpressão de RGMa formaram miotubos multinucleados maiores em largura, quando comparadas ao controle (Martins *et al.*, 2015). As células positivas para RGMa apresentaram ainda um maior índice de fusão quando comparadas ao controle. O *knockdown* de RGMa promoveu o efeito contrário, induzindo a formação de células com perfil atrófico. Esses resultados contribuíram para incluir RGMa no complexo programa que determina a formação de células musculares esqueléticas, como um fator hipertrófico e hiperplásico (Martins *et al.*, 2015).

O receptor Neogenina e as moléculas orientadoras Netrina-2 e RGMc foram também associados à regulação positiva do tamanho da célula muscular. Camundongos com mutação homozigótica para o gene codificador da Neogenina apresentaram miotubos menores com menor quantidade de núcleos. Esse fenótipo observado foi atribuído aos baixos níveis de FAK quinase ativa e da ineficiente expressão do fator de transcrição Miogenina (Bae *et al.*, 2009). Células musculares apresentaram fenótipo hipertrófico, por meio da incorporação de novos núcleos, quando Netrina-2 recombinante foi administrada ou quando foi superexpressa (Kang *et al.*, 2004). Quando RGMc foi superexpressa em células C2C12 constatou-se também um aumento do



número de núcleos por miotubo. Contudo, os efeitos de RGMc nas células foram menos pronunciados quando comparados às Netrininas (Bae *et al.*, 2009). Além disso, alguns estudos revelaram que a superexpressão de RGMc não exerceu nenhum efeito na formação de miotubos (Huang *et al.*, 2005; Kuninger *et al.*, 2006).

Existem outros fatores associados à regulação positiva e/ou negativa do tamanho da fibra muscular. Estudos recentes demonstraram que a via de sinalização BMP desempenha um importante papel no controle funcional das células satélites durante o processo de miogênese em células musculares estriadas esqueléticas adultas (Sartori & Sandri, 2015). Observou-se um aumento da expressão do receptor BMP do tipo I, ALK-3, durante as fases de ativação e proliferação das células satélites, o que induziu a fosforilação de Smad 1/5/8. A superexpressão de ALK-3 no tecido muscular aumentou os níveis de fosforilação de Smad 1/5/8, resultando em um aumento da fibra muscular e, conseqüente acarretamento de um quadro muscular hipertrófico (Sartori & Sandri, 2015). A expressão de Noggin, um antagonista de BMP, reduziu a fosforilação de Smad 1/5/8, culminando em um quadro atrófico da musculatura estriada esquelética (Sartori *et al.*, 2013). Desse modo, pode-se inferir que exista uma relação entre o tamanho da célula muscular envolvendo a sinalização mediada por RGM-BMP, já que o papel, para ambas as moléculas, foi similar no fenótipo observado para as células musculares estriadas esqueléticas.

## **2.5. Somitogênese: compartimentalização dos somitos durante o desenvolvimento**

Durante o desenvolvimento embrionário, a miogênese inicia-se logo após a gastrulação e, possivelmente, continua por toda longevidade do organismo. A musculatura esquelética origina-se nos somitos, condensações epiteliais de mesoderma paraxial localizados ao lado do tubo neural (NT) e notocorda (Ntc), no eixo ântero-posterior, e que originará o esqueleto axial e a musculatura esquelética (Burke & Nowicki, 2003; Aulehla & Pourquié, 2010). Os somitos são extremamente importantes para a organização do plano segmentado dos vertebrados (Fan e Tessier-Lavigne, 1994; Imbesi *et al.*, 2014). Os somitos são formados por somitogênese, um processo que ocorre simultaneamente com a regressão da linha primitiva, sendo que o intervalo de aparecimento de cada novo par de somito é regulado pelo nódulo de Hensen (Dubrulle *et al.*, 2001).

O intervalo de aparecimento de novos somitos, ao longo do eixo ântero-posterior, é bastante inerente a cada espécie. No entanto, o surgimento bilateral de um novo par de somitos ocorre de maneira extremamente sincronizada (Palmeirim *et al.*, 2008; Bulusu *et al.*, 2017). Junto a essa sincronia, espera-se uma expressão gênica bastante refinada e vale ressaltar que o destino das células que compõem o somito é regulado por sinais locais.

A diferenciação do somito em esclerótomo, dermatômo, sindétomo e miótomo depende da interação entre os somitos e os tecidos em seu entorno: o ectoderma de revestimento, a notocorda e o tubo neural (Fan e Tessier-Lavigne, 1994; Marcelle *et al.*, 1997; Blake & Ziman, 2014; **Figura 4**).

Por meio de secreção de Shh (*Sonic hedgehog*) e Noggin, advindos do tubo neural e da notocorda, as células mediais-ventrais do somito perdem suas características epiteliais e retornam ao estágio mesenquimal. Essas células constituem o esclerótomo, que expressam *Pax1* e *Sox9*, necessários para diferenciação de cartilagens, vértebras e grande parte das costelas (Smith e Tuan, 1995; Olivera-Martinez *et al.*, 2000; **Figura 4**). O remanescente de células epiteliais do somito denomina-se dermomiótomo e este se divide em três partes: as células das duas porções laterais constituem o miótomo, região que originará os músculos esqueléticos, e a porção central chamada de dermatômo, que originará a derme do pescoço e do tronco (Ordahl *et al.*, 2001; Musumeci *et al.*, 2015; **Figura 4**).

As células do miótomo se separam, migram e se diferenciam em mioblastos. Mioblastos próximos à região do tubo neural são os precursores da musculatura epaxial (músculos intercostais, profundos das costas e extensores dos membros; **Figura 4**). Os mioblastos mais distantes do tubo neural se diferenciam mais rapidamente e se tornam os precursores da musculatura hipaxial (musculatura da parede do corpo, do abdômen, do tronco e os flexores dos membros; Shearman & Burke, 2009; **Figura 4**). Os sinais advindos dos tecidos em torno dos somitos são responsáveis por induzir, nas células comprometidas com a linhagem muscular, a expressão dos Fatores Regulatórios Miogênicos, que são determinantes para especificação e diferenciação dos progenitores miogênicos (Gustafsson *et al.*, 2002).

Os Fatores Regulatórios Miogênicos, ou família MyoD, são uma família que pertence à classe dos fatores de transcrição bHLH (*Basic Helix-loop-helix*), que é amplamente conservada nos vertebrados e está envolvida diretamente com o destino das

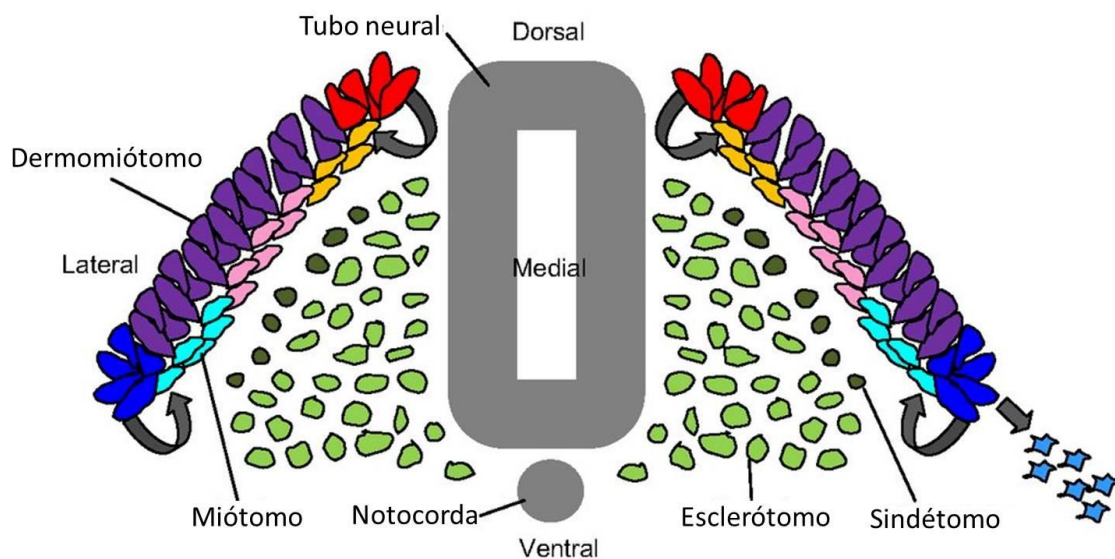
células da linhagem muscular esquelética (Weintraub *et al.*, 1991; Bentzinger *et al.*, 2012). Essa família é composta por quatro proteínas regulatórias: MyoD e Myf5 são expressas inicialmente, uma vez que são necessárias para determinação dos mioblastos, enquanto Miogenina e MRF-4 (Fator Regulador de Miogênese 4) são expressos mais tardiamente em estágios finais de diferenciação e regulam a expressão de proteínas músculo-específicas (Buckingham *et al.*, 1992; Kablar *et al.*, 1997; Gerhart *et al.*, 2006; Zammit, 2017). Todas essas quatro proteínas ligam-se a sítios similares no DNA e ativam a transcrição de genes músculo-específicos (Musumeci *et al.*, 2015). Vale ressaltar que a expressão dos Fatores Regulatórios Miogênicos também é influenciada por ação de hormônios e fatores de crescimento, como Arginina, Vasopressina e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; Musumeci *et al.*, 2013).

O dermomiótomo é formado por uma estrutura epitelial transiente, ocupando a porção dorsal de cada somito. As células das extremidades (ou lábios) do dermiótomo são capazes de delaminar e migrar, originando o miótomo (Hollway & Currie, 2005). A formação do miótomo é um processo de múltiplos passos. A miogênese primária é caracterizada pela derivação do miótomo e formação dos primeiros mioblastos a partir do dermiótomo, que passa a ser apenas dermatômo (originará a derme); a miogênese secundária ocorre quando os mioblastos fetais proliferam e passam a expressar *Myf5/MyoD*, com consequente expressão de *Myogenina* e MRF4. Esses mioblastos fusinam-se aos mioblastos primários pré-existentes, ou formam *de novo* as miofibras secundárias, utilizando as miofibras primárias como *scaffold* (Zammit, 2017). As miofibras secundárias formam a maioria dos músculos que constituem o organismo, processo que se completará após o nascimento, por hiperplasia, com adição de células satélites quiescentes a essas fibras, ou por hipertrofia das fibras secundárias (White *et al.*, 2010).

O miótomo é induzido por pelo menos dois sinais distintos. WNT-1 e WNT-3A, secretados pela região dorsal do tubo neural, juntamente ao baixo gradiente de concentração de Shh, secretado pela notocorda e região ventral do tubo neural, induzem a diferenciação miogênica na região epaxial do dermomiótomo (Blake & Ziman, 2014, Musumeci *et al.*, 2015). Já o domínio hipaxial do dermomiótomo é induzido à diferenciação miogênica por expressão de WNT-7A, advindo do ectoderma de revestimento, juntamente à expressão de BMP-4 e FGF-5, liberados pelo mesoderma lateral (Dietrich *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2004). WNT-1, WNT-3A e WNT-7A

induzem a expressão de Myf5 que, por sua vez, ativa MyoD, ambos marcadores determinantes para o desenvolvimento dos mioblastos. A extensão espacial do miótomo parece ser determinada por um balanço entre a sinalização de WNTs, vindos da porção dorsal do tubo neural, e expressão de FGF, liberado pelo mesoderma lateral (Musumeci *et al.*, 2015).

Foi detectada uma pequena população de células, ainda no epiblasto, que expressam MyoD e que migram para as regiões dorso-medial e ventro-lateral do dermomiótomo, secretando Noggin, um inibidor de BMP (Gerhart *et al.*, 2006). A determinação do miótomo e o surgimento dos precursores celulares miogênicos dependem da presença de proteínas WNT e da inibição da ação de BMP (Reshef *et al.*, 1998; Musumeci *et al.*, 2015). BMP auxilia na definição do mesoderma lateral, como também na supressão do desenvolvimento da musculatura, e há indícios de que, nesses locais, as RGMs podem inibir a ação de BMP (Jorge *et al.*, 2012). Nos somitos, elevados níveis de Shh favorecem o desenvolvimento do esclerótomo em detrimento do miótomo (Fan e Tessier-Lavigne, 1994; Blake & Ziman, 2014).



**Figura 4. Compartimentalização dos somitos.** Células na região ventro-medial formam o esclerótomo (verde-claro), em que *Pax1* e *Sox9* são expressos em resposta à sinalização de Shh. Como o dermomiótomo (roxo) se alonga dorso e ventro-lateralmente, a expressão de *Pax3* fica restrita aos lábios epaxiais (vermelho) e hipaxiais (azul), onde miócitos se despreendem e originam as musculaturas epaxial (laranja) e hipaxial (azul-claro), respectivamente. Na região dos membros os progenitores musculares se despreendem da porção hipaxial do dermomiótomo e migram para os membros em formação (seta). Na porção central do miótomo (rosa) a população de células expressa *Pax3* e *Pax7*, originando as células-tronco da musculatura esquelética, as células satélites, que são importantes para o músculo em desenvolvimento e também

para reparo e crescimento da musculatura adulta. O sindétomo (verde-escuro) se origina do esclerótomo e formará os tendões. No local de origem do sindétomo foi observada menor expressão de *Pax1* e *Sox9* e aumento da expressão de *Scleraxis*. Figura adaptada de Blake & Ziman, 2014.

## 2.6. Do miótomo à musculatura estriada esquelética

A transição dos precursores mioblásticos até o completo estabelecimento de uma fibra muscular multinucleada é acompanhada por diversos eventos de síntese e acúmulo de diferentes proteínas (Tessier & Storey, 2016). Inicialmente, os mioblastos proliferam, aumentando sua população e, depois, diferenciam-se em um processo cuidadoso e orquestrado, que inclui sua saída do ciclo celular e a expressão de genes músculo-específicos, alongando-se e fusionando-se para formar fibras multinucleadas (Pownall *et al.*, 2002; **Figura 5**). No entanto, esses processos também são regulados, em várias etapas, por moléculas de sinalização extracelular, incluindo fatores difusíveis, os componentes da matriz extracelular, os fatores envolvidos no contato célula-célula e as modificações no citoesqueleto (Chen e Olson, 2004; Horsley & Pavlath, 2004).

A proliferação dos mioblastos parece ser garantida pela expressão de FGFs que mantém ativa a expressão do repressor *Msx-1* (*Msh homeobox 1*), que impede a miogênese. Quando a expressão de *FGF* e *Msx-1* cessa, os mioblastos saem do ciclo celular, não mais se proliferam e começam a secretar fibronectina para a matriz extracelular (Krauss *et al.*, 2017). Por meio dos receptores Integrina  $\alpha5\beta1$  da fibronectina, os mioblastos se aderem, alinham-se e formam cadeias. Esse alinhamento entre mioblastos ocorre por meio de glicoproteínas de membrana, incluindo diferentes Caderinas e diversas moléculas de adesão celular (Abmayr *et al.*, 2008). As Caderinas são proteínas transmembrana cujo ectodomínio se liga às Caderinas de células vizinhas, de forma cálcio-dependente, para mediar a adesão célula-célula (Kuang *et al.*, 2008). Em sua porção interna, ela se liga à  $\beta$ -Catenina e indiretamente à  $\alpha$ -Catenina, as quais integram o complexo de adesão celular à Actina do citoesqueleto (Borghi & James Nelson, 2009). A expressão estabilizada de MyoD por parte dos mioblastos depende do contato célula-célula mediado por Caderinas (Krauss *et al.*, 2005).

Membros da superfamília Ig (imunoglobulinas) associados com a adesão celular também estão envolvidos com a fusão de mioblastos, dentre os quais se destacam CDO e Neogenina. CDO é uma proteína de membrana com cinco repetições de Ig e duas de

FnIII (Fibronectina III) em seu ectodomínio, além de uma longa região intracelular que atua como um correceptor multifuncional em várias vias de sinalização (Bae *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). CDO se liga de forma *cis* à N-Caderina nos mioblastos (Lu *et al.*, 2010) levando à fosforilação de substratos que estimulam a expressão, dependente de MyoD, de genes músculo-específicos (Guasconi *et al.*, 2009). Neogenina também se liga a CDO de forma *cis*, o qual atua como correceptor para a própria Neogenina (Bae *et al.*, 2009). Vale lembrar que Neogenina atua como receptor para duas famílias de proteínas orientadoras de axônio, as Netrinas e as RGMs (De Vries & Cooper, 2008). Neogenina é expressa nos somitos e nos músculos esqueléticos em desenvolvimento (Kang *et al.*, 2004) e sua interação com Netrina foi também associada à ligação célula-célula, sugerindo um papel para essas moléculas na associação e fusão de mioblastos (De Vries & Cooper, 2008).

A fusão de mioblastos está associada à capacidade destes formarem miotubos e complexos pré-fusionados de mioblastos, seguida de justaposição das respectivas membranas plasmáticas, fragmentação das mesmas e união dos citoesqueletos, formando um sincício multinucleado (Musumeci *et al.*, 2015; **Figura 5**). Uma vez que os mioblastos tornam-se propícios à fusão, a Miogenina torna-se ativa e liga-se a regiões específicas do DNA, ativando a transcrição gênica e culminando na síntese e deposição das proteínas contráteis (Bergstrom & Tapscott, 2001). Assim que os mioblastos começam a formar o miotubo, começam a secretar IL-4 (Interleucina 4) paracrinamente, o que recruta novos mioblastos para fusão e formação do miotubo (Horsley *et al.*, 2003).

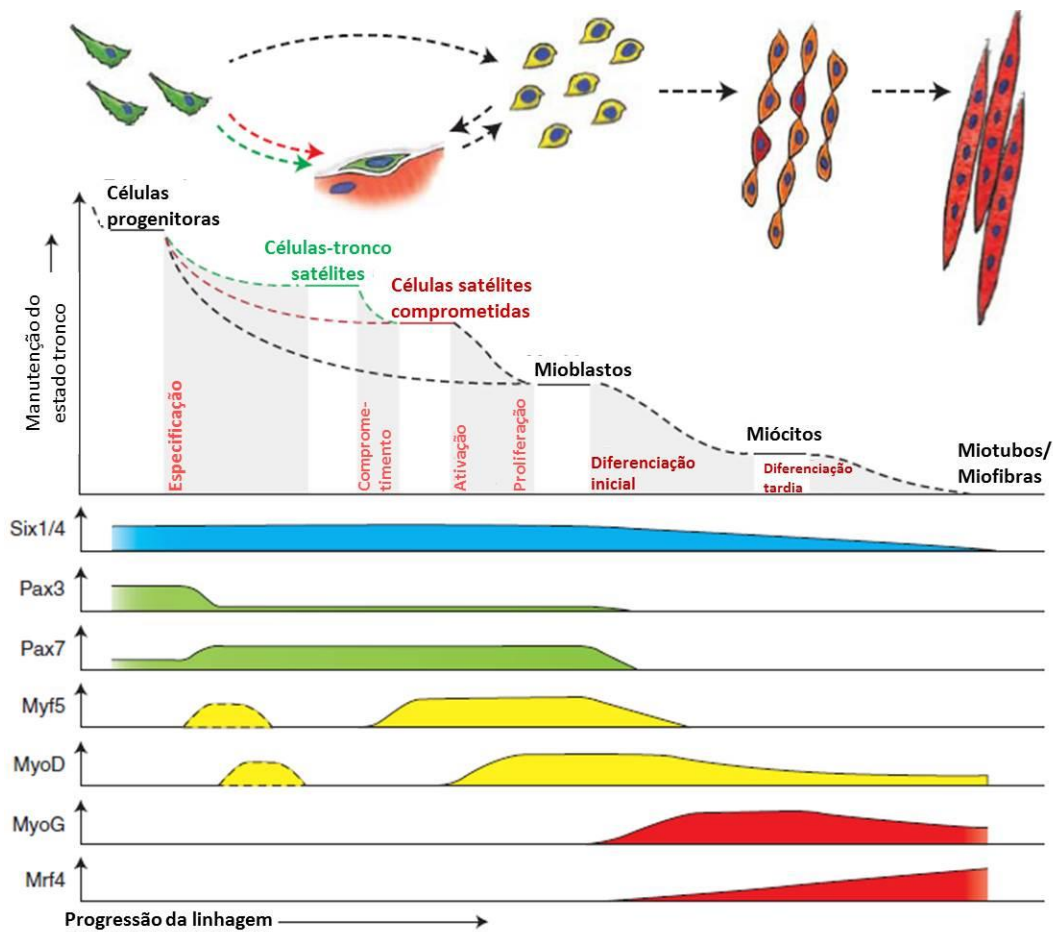
A diferenciação de mioblastos em miotubo é acompanhada por uma mudança fenotípica quanto à forma das células, bem como a síntese de proteínas contráteis, como a Miosina de cadeia pesada (MHC). A primeira proteína músculo-específica sintetizada no processo é a Desmina, seguida da Titina e da Actina músculo específica. Aparentemente, a última proteína muscular sintetizada é a Nebulina (Clark *et al.*, 2002). A síntese das proteínas contráteis é acompanhada pela formação da fibra muscular e estas aparecem junto às primeiras estruturas sarcoméricas (Bryson-Richardson & Currie, 2008). Depois de diferenciados, os miotubos não retornam ao ciclo celular ou proliferam, mesmo quando expostos a ação de fatores de crescimento (Musumeci *et al.*, 2015).

O tecido muscular possui as habilidades de reparo e regeneração ao sofrer lesões (Cossu *et al.*, 2005). Uma nova fibra muscular pode se originar a partir de células-tronco ou células progenitoras localizadas ao longo da fibra muscular adulta (Relaix *et al.*, 2005). Estas células-tronco musculares denominam-se células satélites e se localizam entre a lâmina basal e o sarcolema, ou próximas a capilares (Goel *et al.*, 2017). Normalmente, as células satélites são quiescentes, mas são capazes de responder a injúrias ou exercícios, proliferando-se em células da linhagem miogênica, fusionando-se e formando ou restituindo uma fibra muscular (Musumeci *et al.*, 2015). Células satélites são derivadas de células progenitoras musculares do somito, porém não se fusionam e perduram até a fase adulta, tornando-se ativas em eventos específicos de reparo da fibra muscular ou síntese de uma nova fibra (Mitchell *et al.*, 2010).

Em galinha e rato, a origem das células satélites foi identificada na parte central do dermomiótomo (Ben-Yair & Kalcheim, 2005; Gros *et al.*, 2005; Relaix *et al.*, 2005). Enquanto as células mais externas do dermomiótomo produzem mioblastos expressando marcadores miogênicos, MyoD e Myf5, as células do miótomo derivadas da região central expressam marcadores pré-miogênicos, Pax3 e Pax7, e inicialmente não expressam os Fatores Regulatórios Miogênicos (**Figura 5**). Acredita-se que a combinação de Pax3 e Pax7 nessas células seja a responsável por inibir a expressão de MyoD e a diferenciação em músculos, e Pax7 confere proteção contra apoptose a essas células (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2005). Pax7 é um reconhecido marcador para dermomiótomo, miótomo e células musculares adultas (Seale *et al.*, 2000) e, curiosamente, a expressão de *RGMa* nos somitos mostrou-se similar à expressão de Pax7 (Jorge *et al.*, 2012), o que corrobora com o possível envolvimento de *RGMa* com a diferenciação do dermomiótomo e sua participação na determinação das células-tronco musculares.

Diversas vias de sinalização, envolvendo Notch e Miostatina, por exemplo, contribuem para regulação do balanço entre a autoregeneração e a diferenciação das células progenitoras em células musculares de tamanho apropriado no tempo determinado (Dayanidhi & Lieber, 2014). Células progenitoras Pax3<sup>+</sup> originam tanto a linhagem mioblástica, quanto a linhagem de células Pax7<sup>+</sup>, que se tornarão satélites, e a ausência de células Pax3<sup>+</sup> resultou na ausência da miogênese embrionária de camundongos (Hutcheson *et al.*, 2009). Pax7, por sua vez, é o fator responsável pela

manutenção da sobrevivência das células satélites (Seale *et al.*, 2000; Oustanina *et al.*, 2004).



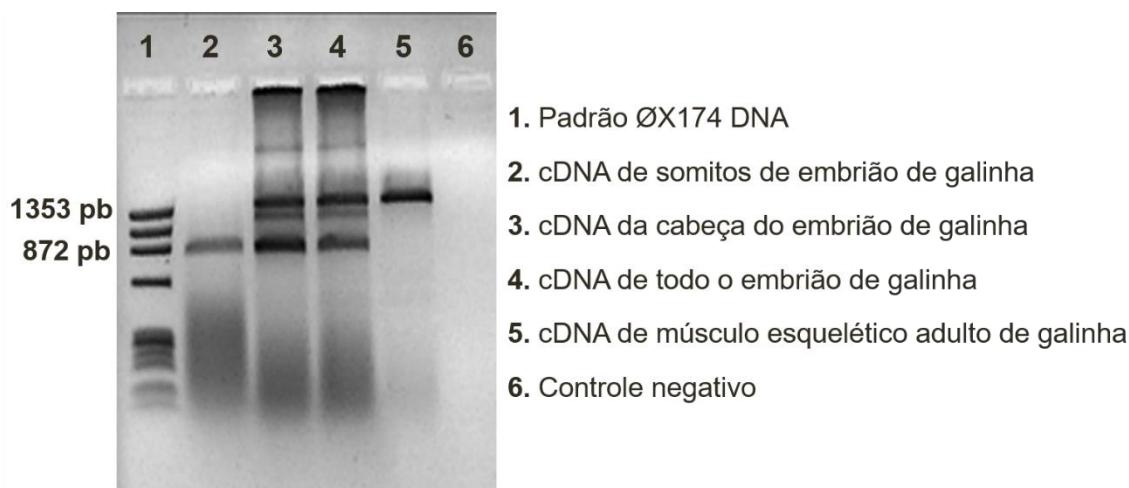
**Figura 5. Hierarquia dos fatores de transcrição que regulam a progressão da linhagem miogênica.** Progenitores musculares determinados com a diferenciação muscular embriogênica podem permanecer como células-satélites no músculo pós-natal, formando uma população tronco e de células comprometidas com a linhagem muscular. Contudo, essas células não necessitam se tornar satélites, podendo se diferenciar diretamente em mioblastos durante a embriogênese. As células satélites ativadas (mioblastos) podem retomar seu estado de quiescência. *Six 1/4*, *Pax3* e *Pax7*, são reguladores especializados para o comprometimento das células progenitoras com a linhagem muscular, enquanto que *MyoD* e *Myf5* são importantes para o programa miogênico. A expressão de genes de diferenciação terminal, *Miogenina* (*MyoG*) e MRF-4, são necessários para fusão de miócitos e formação de miofibras. Figura adaptada de Bentzinger *et al.*, 2012.

## 2.7. A isoforma somática de RGMA: RGMA1

Para melhor compreensão acerca das RGMs, um estudo anterior realizou uma RT-PCR para *RGMA* utilizando cDNA de somitos de galinha, embriões inteiros e músculo esquelético adulto de galinha. Para realização dessa RT-PCR, os



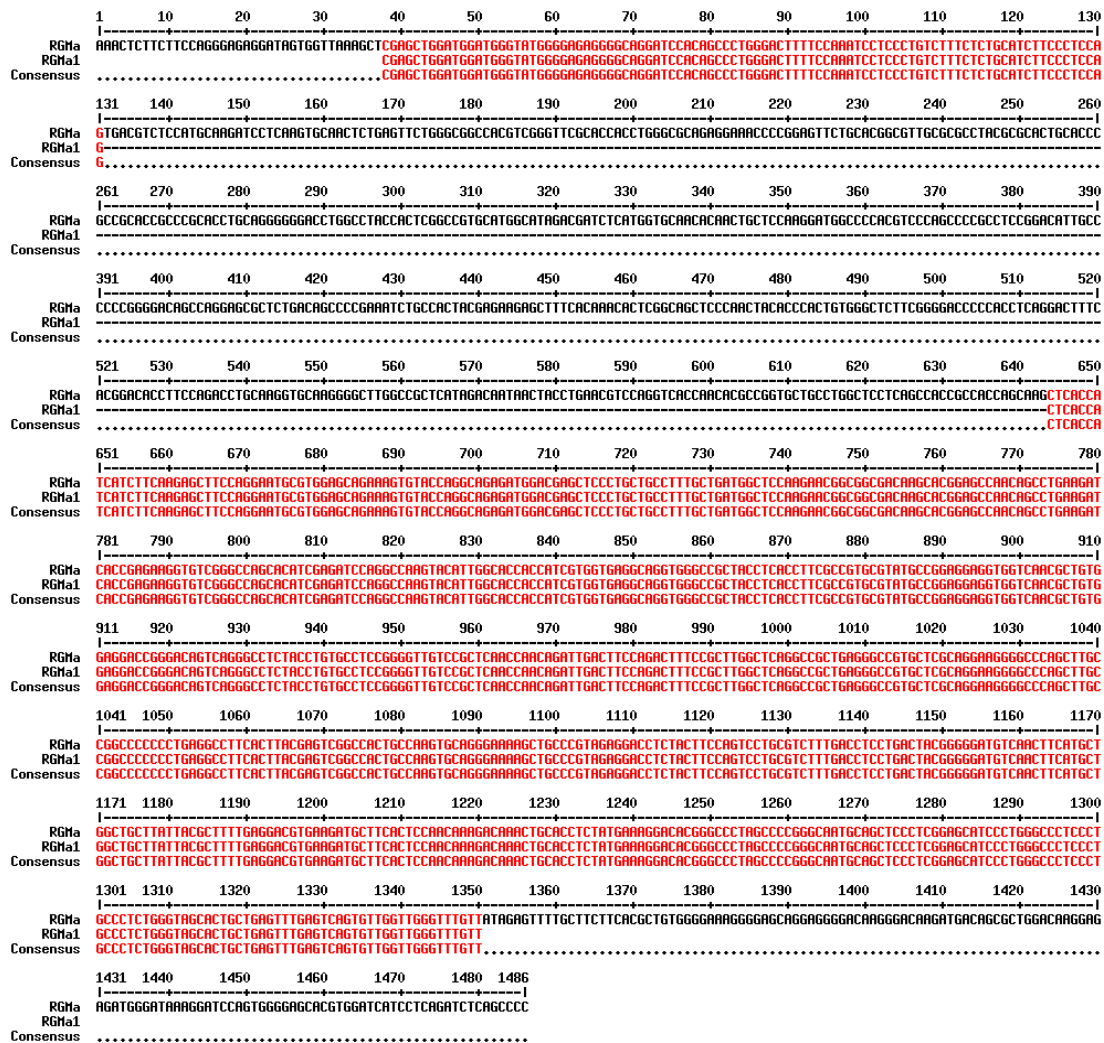
oligonucleotídeos utilizados contemplaram conhecidas regiões não-traduzidas para o RNAm de *RGMa* (**Figura 6**). Surpreendentemente, três transcritos para *RGMa* foram amplificados: (i) um deles contendo aproximadamente ~1400 pb (pares de base; **Figura 6, canaletas 3, 4 e 5**), que corresponde ao tamanho esperado para o RNAm dessa espécie, e que foi encontrado na cabeça, embrião inteiro e músculo adulto; (ii) um presente apenas na cabeça e embrião inteiro, ligeiramente menor ao primeiro (**Figura 6, canaletas 3 e 4**); e (iii) outro transcrito de aproximadamente ~900 pb (**Figura 6, canaletas 2, 3 e 4**), amplificado nas amostras de somito, cabeça e do embrião inteiro (dados ainda não publicados). Este trabalho sugeriu que a presença de uma possível isoforma de *RGMa*, por nós denominada *RGMa1*, expressa exclusivamente nos somitos (**Figura 6, canaleta 2**) e ausente na musculatura esquelética adulta (**Figura 6, canaleta 5**), em que há presença apenas da banda de ~1400 pb, correspondente à *RGMa*. *RGMa1* também foi encontrado no embrião inteiro no mesmo estágio do desenvolvimento das demais amostras (contendo, portanto, todos os somitos do embrião) e em amostras de cabeça de embrião, evidenciando a presença dessa molécula em somitos maduros, compartimentalizados, e nos somitos epiteliais, ainda não compartimentalizados.



**Figura 6. *RGMa1*, uma isoforma de *RGMa*, apresenta expressão restrita em somitos durante o desenvolvimento embrionário.** Oligonucleotídeos desenhados para anelar nas UTRs do RNAm de *RGMa* de galinha permitiram identificar uma isoforma de *RGMa*, denominada *RGMa1*, como um fragmento de ~900 pb, expressa em amostras de somitos, cabeça e embrião inteiro de galinha; enquanto que um fragmento de ~1400 pb foi identificado em cabeça, embrião e músculo adulto. Em (1)  $\Phi$ X174 DNA ladder (New England BioLabs); em (2) cDNA proveniente de somitos de embriões de galinha, que apresenta, exclusivamente, a banda característica de *RGMa1*, com ~900 pb. Em (3) cDNA oriundo da cabeça do embrião de galinha, em que há tecido nervoso em formação, justifica-se a presença da banda de ~1400 pb, correspondente à *RGMa*. Nota-

se também a expressão e um fragmento relativamente menor (~1300 pb) e de *RGMa1*, devido à existência de somitos occipitais na região posterior da cabeça. Em (4) cDNA obtido de todo o embrião de galinha, com a expressão concomitante das três formas. Em (5) cDNA originado da musculatura esquelética de galinha adulta, em que há apenas a expressão de *RGMa*, com ~1400 pb; e em (6) controle negativo, com ausência de cDNA.

O sequenciamento deste fragmento de ~900 pb, revelou ser um *splicing* alternativo no RNAm de *RGMa* o responsável por originar a isoforma somítica, denominada *RGMa1*. Com a utilização do programa MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; Corpet, 1988), foi possível observar o local em que ocorre tal *splicing*, por meio da comparação entre as sequências nucleotídicas de *RGMa* e *RGMa1* (**Figura 7**). Nota-se que existe uma grande região em *RGMa* que está ausente em *RGMa1*, correspondente ao sítio que sofreu o *splicing* (**Figura 7**).



**Figura 7. Alinhamento das sequências de *RGMa* e *RGMa1* de galinha.** A comparação entre as duas sequências nucleotídicas evidencia uma região, presente em *RGMa*, compreendida entre as bases 131 a 643, ausente em *RGMa1*, oriundo de *splicing* alternativo. Os sítios de *splicing*, característicos pelas bases AG, encontram-se no nucleotídeo 131. As bases em vermelho evidenciam a alta similaridade entre as sequências de *RGMa* e *RGMa1*, confirmadas pelo consenso, que também está grafado em vermelho. Esta imagem foi gerada pelo programa MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

O sequenciamento do amplicon proveniente dos somitos de embrião de galinha (Figura 6, canaleta 2), revelou que *RGMa1* possui um RNAm com total de 901 nucleotídeos. Com base na descrição de *RGMa* realizada por Monnier e colaboradores (2002), observou-se que o *splicing* no domínio N-terminal, que origina *RGMa1*, ocorre ao final da sequência de nucleotídeos referente à região do peptídeo sinal (Figura 7, nucleotídeo 131 de *RGMa*) e se estende até o final da sequência referente ao fator de von Willebrand (Figura 7, nucleotídeo 643 de *RGMa*). Consequentemente, a sequência correspondente ao motivo RGD (Figura 7, entre os nucleotídeos 281 e 289

de *RGMa*), compreendido entre o peptídeo sinal e o fator vWF tipo D, também está ausente em *RGMal*. As sequências nucleotídicas do domínio C-terminal, em que se localizam o domínio hidrofóbico e a âncora-GPI, permanecem inalterados em *RGMal* (dados ainda não publicados).

Como estudos envolvendo *RGMal* ainda são pioneiros, sabe-se muito pouco da atuação dessa molécula durante o desenvolvimento embrionário. Como os transcritos de *RGMal* apresentaram expressão exclusiva nos somitos, é de se esperar que *RGMal* esteja envolvida com a formação e estabelecimento das linhagens celulares componentes dos mesmos, sobretudo na origem de células musculares progenitoras e de células satélites. A prévia constatação de transcritos para *RGMa* nos somitos durante a embriogênese (Jorge *et al.*, 2012) corroboram com essa possível relação entre *RGMal* e a linhagem muscular em desenvolvimento. Desse modo, o presente trabalho se propõe a investigar e avaliar os efeitos de *RGMal* durante o desenvolvimento dos somitos em embriões de galinha nos estágios iniciais do desenvolvimento. Ademais, a compreensão dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento da musculatura esquelética é de extrema importância e possui grande potencial biotecnológico, não apenas para uma maior compreensão e possível localização de novas moléculas-alvo, que podem contribuir para tratamentos de doenças relacionadas às distrofias e atrofia musculares, mas também no aumento de deposição de massa muscular em animais de corte, ou, até mesmo, com aplicação para possíveis fins estéticos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a região codificadora e função biológica *in vitro* da isoforma denominada *RGMa1*, expressa em somitos de embriões de galinha.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar o quadro aberto de leitura (do inglês, *open reading frame*, ORF) da sequência nucleotídica da isoforma de *RGMa*, denominada *RGMa1*, amplificada nos somitos de embriões de galinha;
2. Investigar o perfil molecular em células de somitos de embriões de galinha *in vitro*;
3. Investigar os efeitos da superexpressão de *RGMa1* em células de somitos epiteliais caudais de embriões de galinha, cultivados *in vitro* na presença ou ausência do tubo neural e notocorda;
4. Investigar os efeitos da superexpressão de *RGMa1* em células de somitos maduros craniais de embriões de galinha, cultivados *in vitro* na presença ou ausência do tubo neural e notocorda;
5. Avaliar se, assim como *RGMa*, *RGMa1* também exerce seus efeitos utilizando o receptor Neogenina e/ou como correceptora da sinalização BMP.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Clonagem de *RGMa1* em vetor retroviral RCAS

O fragmento de *RGMa1* foi subclonado de pcDNA3-*RGMa1*-eGFP em vetor retroviral RCAS-GFP (**Figura 8**), utilizando-se o método de *Gibsson Assembly* (Gibson *et al.*, 2009; **Figura 9**). RCAS (*Replication-Competent Avian Retroviruses*) é um vetor retroviral que infecta unicamente células de galinha (<http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/replication.html>). Portanto, este retrovírus confere maior eficiência em número de células transfectadas em cultura, mesmo sendo utilizado apenas como vetor (e não como retrovírus). O vetor RCAS-GFP foi obtido em colaboração com o Prof. Dr. Andrew Lassar (*Harvard Medical School*, Boston, EUA).

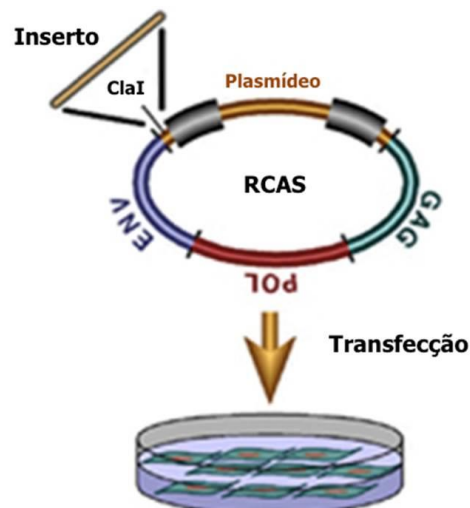
Para esta subclonagem, analisou-se a sequência nucleotídica de *RGMa1* no programa ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) para correta localização dos códons de início e parada da tradução de *RGMa1*. Para seleção da melhor Fase de Leitura Aberta (do inglês *Open Reading Frame*, ORF) utilizou-se o programa SMARTBlast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartsblast/?LINK\\_LOC=BlastHomeLink](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartsblast/?LINK_LOC=BlastHomeLink)), que retorna as cinco proteínas mais semelhantes encontradas no banco de dados quando comparadas a cada uma das ORFs da sequência em questão. Desse modo, oligonucleotídeos específicos foram posicionados e desenhados a partir dos códons (ORF com melhores *hits*) e no sítio de restrição *ClaI* do RCAS, conforme instruções do protocolo de clonagem (Gibson *et al.*, 2009; **Figura 9; Tabela 1**).

**Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos obtidos para a subclonagem de *RGMa1* em RCAS pelo método de *Gibsson Assembly*.** Sequência de nucleotídeos em caixa baixa: sequência de RCAS no sítio *ClaI*. Sequência de nucleotídeos em caixa alta: sequência do início e fim de transcrição de *RGMa1*.

Oligo	Sequência de nucleotídeos (5'-3')
F	ctcgcgtaccactgtggcatATGGACGAGCTCCCTGCTG
R	tggccacagtggctagaatTAACAAACCCAACCAACTGACTC

A reação de amplificação de *RGMa1* a partir do clone *pcDNA3-RGMa1-GFP* ocorreu na presença de 0,5  $\mu\text{M}$  de cada um dos oligonucleotídeos, 5  $\mu\text{L}$  de *5X Phusion High Fidelity*, 0,4 mM de cada dNTP - dATP, dCTP, dGTP e dTTP -, 0,75  $\mu\text{L}$  de DMSO 3% e 0,25  $\mu\text{L}$  de *Phusion DNA Polymerase High Fidelity* a 2 U/mL (*New England Biolabs*), 10 ng de DNA molde (*pcDNA3-RGMa1-eGFP*) e o volume final da reação de 25  $\mu\text{L}$  foi ajustado com água *nuclease-free*. A reação de PCR *touchdown* ocorreu seguindo o seguinte programa: um ciclo a 94 °C por 5 min; seguidos de 5 ciclos a 94 °C por 30s, 65 °C por 30s e 72 °C por 1 min; seguidos de 25 ciclos a 94°C por 30s, 60 °C por 30s e 72 °C por 1 min; e um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min. A amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. O produto de PCR foi purificado com o Kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN) seguindo instruções do fabricante.

O DNA de RCAS-GFP foi linearizado no sítio *ClaI* de restrição, para permitir a inserção da sequência *full-length* de *RGMa1* previamente amplificada. A reação de digestão ocorreu na presença de 2  $\mu\text{L}$  de 10X *Buffer M*, 1  $\mu\text{L}$  de *ClaI* a 10 U/mL (*Invitrogen*), 1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial (RCAS-GFP) e o volume final ajustado para 20  $\mu\text{L}$  de reação com água *nuclease-free*. A reação ocorreu em banho-maria a 37 °C por 1 hora.

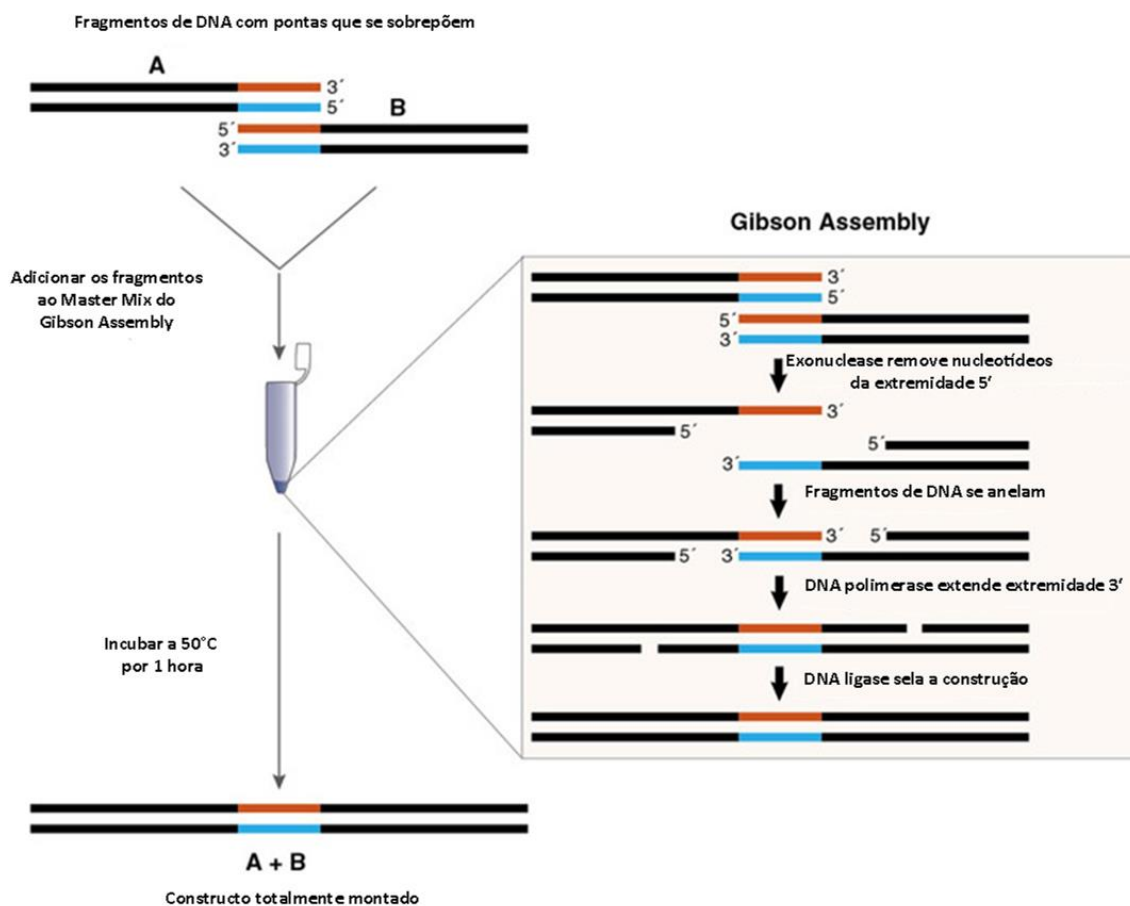


<https://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/replication.html>

**Figura 8. Esquema do vetor retroviral RCAS.** O plasmídeo RCAS (*Replication-Competent Avian Retroviruses*) é um retrovírus modificado e específico para expressão gênica em galinha, com sítio de inserção da sequência de interesse no sítio de restrição *ClaI*. Possui também sequências que codificam proteínas que permitem os processos de invasão, replicação e montagem virais, como a sequência codificadora do envelope viral (ENV), do capsídeo (GAG) e de sua RNA-polimerase (POL), respectivamente.

O fragmento amplificado de RGMa1 foi clonado em RCAS segundo instruções do protocolo do Kit *Gibson Assembly* (*New England Biolabs*). A reação ocorreu na presença de 10  $\mu\text{L}$  de 2X *Gibson Assmely Master Mix*, 200 ng do produto de PCR (amplificação de RGMa1), 100 ng do vetor linearizado (RCAS) e o volume final ajustado para 20  $\mu\text{L}$  com de água *nucelase-free*. A reação ficou em banho-maria a 50 °C por 15 min e foi, seguidamente, transformada em bactérias quimiocompetentes. Um total de 2  $\mu\text{L}$  (1:3) da reação de Gibsson Assembly foi transformada nas células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific). Após 30 min em gelo, o choque térmico foi realizado em banho-maria a 42 °C por 30 seg, seguido da incubação em gelo por mais 2 min. As bactérias transformadas foram ressuspensas em meio de cultura nutritivo SOC [2% de tripton (w/v), 0,5% de extrato de levedura (w/v), 10 mM de NaCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de KCl, 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, e 20 mM de glucose], com volume final ajustado com água para 100 mL de solução) e incubadas a 37 °C por 1 h sob agitação a 180 rpm. Passado este tempo, 100  $\mu\text{L}$  de bactérias foram plaqueadas em meio de cultura LB (Lurina-Bertani) ágar, acrescido de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica *overnight* a 37 °C, para obtenção de colônias isoladas das bactérias transformadas.





[https://www.neb.com/~media/NebUs/Gibson\\_Figure1.jpg](https://www.neb.com/~media/NebUs/Gibson_Figure1.jpg)

**Figura 9. Esquema do funcionamento do Kit *Gibson Assembly* (New England *BioLabs*).** A sequência nucleotídica do gene de interesse é flanqueada em ambas as extremidades com sequências idênticas ao local de inserção no plasmídeo. O produto amplificado e o plasmídeo digerido são unidos pela ação de uma exonuclease (com atividade de remover bases de extremidades 5' livres do plasmídeo linearizado e do amplicon), uma DNA polimerase (capaz de estender as pontas livres das sequências em solução) e uma DNA ligase (que sela os fragmentos e reestrutura a estrutura do plasmídeo). Ao final do processo observa-se a sequência de interesse integrada à sequência do plasmídeo.

O DNA plasmidial foi purificado a partir das colônias de bactérias seguindo instruções do fabricante do Kit *GeneJet Plasmid Miniprep* (Thermo Scientific), baseado no método de lise-alcálica. Para a extração do DNA plasmidial, primeiramente foi selecionado uma colônia da placa de cultivo (que se encontrava totalmente isolada das demais colônias) e esta inoculada em meio de cultura LB acrescido de ampicilina 100 µg/mL, deixada *overnight* sob agitação a 37 °C e 180 rpm. No dia seguinte, 4 mL de cultura foram peletizados após centrifugação a 12.000 x g por 1 min, a temperatura ambiente. O *pellet* de bactérias foi ressuscitado com auxílio do vórtex em 250 µL da solução de ressuspensão acrescido de RNase. Em seguida, foram adicionados 250 µL de

solução de lise e a solução homogeneizada por inversão de seis a oito vezes, até que a solução se tornasse viscosa e transparente. Em seguida, foram acrescentados 350 µL de solução de neutralização, misturando-se suavemente de seis a oito vezes por inversão, até completa homogeneização. Após centrifugação por 5 min a 12.000 x g (a fim de precipitar restos celulares e DNA cromossomal), o sobrenadante foi transferido para a coluna de centrifugação *GeneJet*. A solução foi centrifugada por 1 min a 12.000 x g; descartou-se o que passou pela coluna, e retornou-se a mesma coluna para o tubo de centrifugação. Adicionou-se à coluna 500 µL de solução de lavagem, contendo etanol, e centrifugou-se por 1 min a 12.000 x g, descartando-se o excesso e retornando a coluna para o tubo. Repetiu-se o processo de lavagem, adicionando-se novamente 500 µL de solução de lavagem, centrifugando pelo mesmo tempo e descartando o excesso. Com o intuito de remover toda a solução de lavagem, a coluna foi novamente centrifugada pelo tempo adicional de 1 min a 12.000 x g. Por fim, a coluna *GeneJet* foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Para eluição do DNA plasmidial, 50 µL de tampão de eluição foi adicionado ao centro da coluna *GeneJet*, que foi mantida a temperatura ambiente por 2 min e depois centrifugada por 2 min a 12.000 x g. A coluna *GeneJet* foi descartada e o tubo contendo o DNA plasmidial armazenado em *freezer* -20 °C. O material extraído foi quantificado em espectrofotômetro da marca *NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*.

O DNA plasmidial foi sequenciado para confirmação e comparação da sequência com as disponíveis em bancos de dados, como o *Gene Bank*. Cerca de 200 ng de DNA plasmidial foi sequenciado em ambos os lados do inserto, em reações contendo 0.5 µM de um dos oligonucleotídeos para RGMa1 (mesmos utilizados para amplificação citada acima); 2 µL de tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9.0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) e 2 µL do *Kit Big Dye*, contendo a enzima AmpliTaq DNA polimerase, para um volume de 10 µL, seguindo protocolo modificado dos fabricantes do *Kit Big Terminator* (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento ocorreu em 35 ciclos de 45 s a 96 °C, 30 s a 50 °C e 1 min a 60 °C. Após o sequenciamento, as reações foram purificadas com a adição de acetato de sódio 1,5 M com EDTA 0,25 M e precipitadas com 100 µL de etanol absoluto. Após centrifugação a 3000 x g por 45 min, o sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* lavado com etanol 70%. Após secagem por 1 h a TA, protegido da luz, o *pellet* foi ressuscitado em 3 µL de tampão de corrida (5 formamida:1 tampão de corrida). As amostras foram desnaturadas a 98 °C

por 2 min e a eletroforese realizada em aparelho de sequenciamento automático ABI3100 da Applied Biosystems. A comparação da sequência obtida foi realizada utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search*), disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

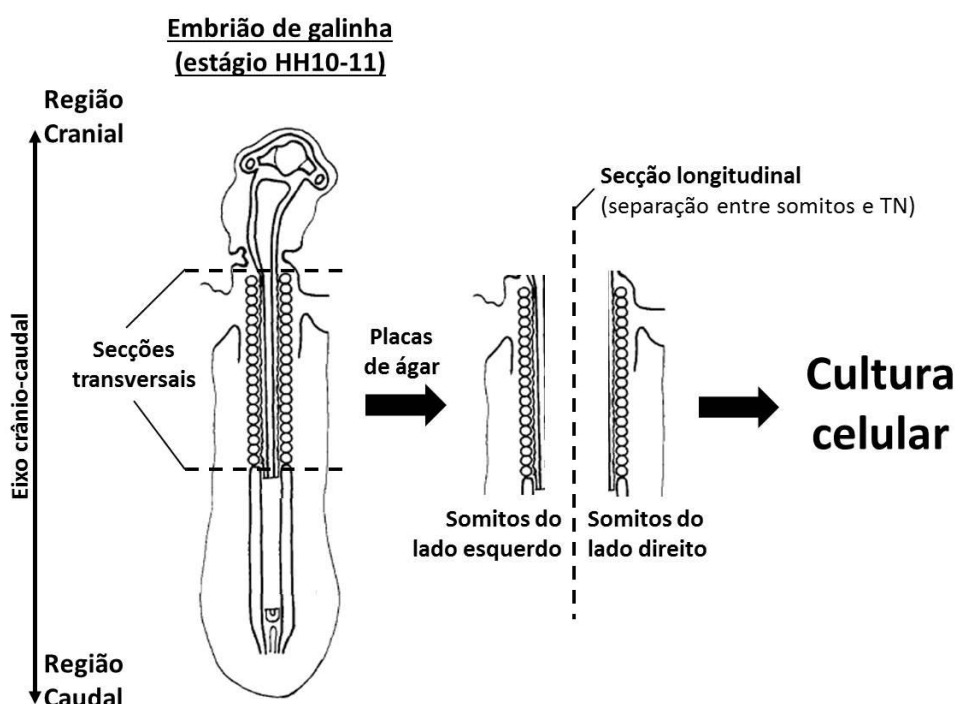
Uma maxipreparação foi realizada utilizando o Kit *Plasmid Maxi* (QIAGEN), para a obtenção da quantidade de DNA necessária para as transfecções das células (2,5 µg/µL). Para isso, 10 µL dos DNAs (RCAS-RGMa1 e RCAS-GFP) foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB contendo ampicilina (100 µg/mL), sob agitação a 37 °C por 8 h. No dia seguinte, 100 µL de cada pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) e mantidos sob agitação a 37 °C por 16 h. As culturas de bactérias transformadas foram centrifugadas a 6.000 x g, a 4 °C por 15 min. Os pellets formados foram ressuspensos em 10 mL do tampão P1 e misturados ao tampão P2. Após incubação por 5 min a temperatura ambiente (TA), 10 mL do tampão P3 foi adicionado e a solução incubada em gelo por 20 min e centrifugada por 30 min a 20.000 x g a 4 °C. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi centrifugado por 15 min a 20.000 x g a 4 °C e levado à coluna QIAGEN-tip 500 previamente equilibrada com 10 mL de QBT. A coluna foi então lavada com 30 mL de tampão QC por duas vezes e o DNA eluído com 15 mL de tampão QF. O DNA foi precipitado com 10,5 mL de isopropanol e centrifugado por 30 min a 15.000 x g a 4 °C. O pellet contendo o DNA foi lavado com 5 mL de etanol 70% a TA, centrifugado a 15.000 x g por 10 min, levado a placa aquecedora (Provocell) a 38 °C por 5 a 10 min para secagem e ressuspensado em 200 µL de água *nuclease-free*. O material extraído foi quantificado em espectrofotômetro da marca *NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*.

#### **4.2. Cultura de células de somitos**

Ovos fertilizados, adquiridos da empresa Rivelli (Mateus Leme-MG), foram acondicionados em incubadora a 38,5 °C em atmosfera úmida. Os somitos de embriões de galinha no estágio HH10-11 (33-35h; Hamburger e Hamilton, 1951) foram coletados em placas de ágar 3%, sobre gelo, com o auxílio de um estereomicroscópio Leica EZ4 HD (Zeng *et al.*, 2002; Daoud *et al.*, 2014).

Após a dissecação e isolamento dos tecidos, transferiu-se os explantes para placas de cultura de 24 poços contendo gel de colágeno (30% gel de colágeno - BD

Biosciences, 0.02N in ácido acético; 1x DMEM e 1% de PBS 1X). Os explantes foram mantidos em meio de cultura  $\alpha$ -MEM, suplementado com 10% SFB, 1% anti-anti (Gibco®), 1 ng/mL de bFGF, a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> (**Figura 10**). Para avaliação do comportamento da cultura, as células foram fotodocumentadas diariamente, durante 10 dias (meio trocado a cada dois dias), com auxílio do Fotomicroscópio invertido Motic AE31 acoplado a câmera Moticom 2300 e sistema de captura Moticom Imagem Plus 2.0.



**Figura 10. Esquema da coleta de somitos dos embriões de galinha.** Somitos de embriões de galinha nos estágios HH10-11 (33-35 horas) foram coletados, sobre gelo, em placas de ágar 3% em PBS 1X. Foram feitas duas incisões transversais (linhas pontilhadas horizontais) para separar os somitos do restante do embrião; e uma incisão longitudinal (linha pontilhada vertical), dividindo os somitos em lado esquerdo e direito, separaram os mesmos do tubo neural. Os grupos de somitos isolados do embrião foram levados à cultura celular onde permaneceram durante 10 dias, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. **TN:** tubo neural. Figura adaptada de Bushberger *et al.*, 1998.

A fim de traçar um perfil transcricional desses somitos em cultura, a extração de RNA total se deu por meio da coleta, em TRI Reagent® (Sigma), de um total de três poços de células de somito nas seguintes idades: 0, 2, 5 e 10 dias em cultura, sendo o dia 0 somitos que não foram mantidos em cultura e que serviram de comparação com as demais idades. Resumidamente, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio e, após

mistura por inversão, o material foi centrifugado por 15 min a 12.000 x g para separação do RNA total. Aproximadamente 400 µL da fase contendo o RNA total foram transferidos para um novo tubo e 500 µL de isopropanol foram adicionados ao mesmo. Após mistura por inversão, o material foi incubado por 10 min em TA. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 12.000 x g e o isopropanol foi descartado. 1 mL de etanol 75% foi adicionado à amostra e, em seguida, ela foi vortexada. O material foi centrifugado por 5 min a 12.000 x g e ao final do processo o etanol foi descartado. O tubo com o pellet formado foi seco em termomixer por 5 min a 38 °C. O pellet foi hidratado utilizando 20 µL de água *nuclease-free* e incubado por 5 min a 55 °C. A visualização da integridade do RNA total extraído ocorreu por visualização em gel de agarose 1% e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro da marca *NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. Cerca de 1 µg de RNA total foi convertido em DNA complementar (cDNA), seguindo as instruções do fabricante com o kit *RevertAid™ H. Minus First Stand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific).

Oligonucleotídeos foram obtidos para permitir a avaliação desse perfil molecular das células dos somitos por RT-PCRq. Foram medidos os níveis de expressão de *RGMa1*; de marcadores músculo-específicos (*MyoD*, *Myf5*, *Miogenina*, *Desmina*); marcadores de citoesqueleto da célula muscular estriada esquelética (*α-actinina*); para marcadores de células satélites (*Pax3* e *Pax7*); de esclerótomo (*Pax1* e *Sox9*); e mesenquimais (*cMeso-1*). GAPDH foi utilizado como gene referência. Oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio do programa *Primer 3 Plus*, para obter amplicons entre 200-300 pb e com temperatura de melting de 60 °C (**Tabela 2**).

**Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para RT-PCR quantitativa (RT-PCRq).** *MyoD*, *Myf5*, *Miogenina*, *Desmina*: marcadores músculo-específicos; *Pax3*, *Pax7*: marcadores para células satélites; *Pax1*, *Sox9*: marcadores para esclerótomo-específicos; *cMeso-1*: marcador para somitos epiteliais;  *$\alpha$ -actinina*: marcador para citoesqueleto da célula muscular estriada esquelética; *GAPDH*: marcador constitutivo. OligoF: oligonucleotídeo direto (*forward primer*); OligoR: oligonucleotídeo reverso (*reverse primer*); pb: pares de base.

Genes	Sequências de oligonucleotídeos	Amplicon (pb)
<i>RGMa1</i>	OligoF: 5'- TCCCTCCAGCTCACCATCATC -3' OligoR: 5'- CGGAGGCACAGGTAGAGG -3'	314
<i>MyoD</i>	OligoF: 5'- GCAGCAATCCAATCTACCAA -3' OligoR: 5'- CCTATTCTCCAAAGCCCAA -3'	295
<i>Myf5</i>	OligoF: 5'- TGCCAGTTCTCCCCATCC -3' OligoR: 5'- CACTTTCTTCAGCCTCCTCCT -3'	285
<i>Miogenina</i>	OligoF: 5'- AACCTCCACTCGCTCTCCTC -3' OligoR: 5'- CCATCACACTTCTCCCCTTT -3'	280
<i>Desmina</i>	OligoF: 5'- CTGAAGGAGGAGGCTGAGAA -3' OligoR: 5'- AGGTCCGGGCTTGGAGATG -3'	212
<i><math>\alpha</math>-actinina</i>	OligoF: 5'- CACTTGCGGCAGTATGAGAA -3' OligoR: 5'- CACGGGTCAGAATCTGGTTT -3'	208
<i>Pax3</i>	OligoF: 5'- CTGAAGGAGGAGGCTGAGAA -3' OligoR: 5'- AGGTCCGGGCTTGGAGATG -3'	206
<i>Pax7</i>	OligoF: 5'- ACTGCGACAAGAAGGAGGAA -3' OligoR: 5'- TTGCTGAACCACACCTGAAC -3'	286
<i>Pax1</i>	OligoF: 5'- AACTCGCTTGGAACACACA -3' OligoR: 5'- AGACGCAATAAAGGGGGAAG -3'	232
<i>Sox9</i>	OligoF: 5'- AAGAGAACACCTTCCCCAAA -3' OligoR: 5'- CTCATTTCAGCAGCCTCCAC -3'	299
<i>cMeso-1</i>	OligoF: 5'- GCCAGCGAGAGGGAGAAG-3' OligoR: 5'- CGAGAGGTGGGCGATGTAG-3'	201
<i>GAPDH</i>	OligoF: 5'- GCTAAGGCTGTGGGGAAAG -3' OligoR: 5'- CATCAAAGGTGGAGGAATGG -3'	250

A reação de PCR para a validação dos oligonucleotídeos obtidos ocorreu na presença de 0.2  $\mu$ M de cada um dos oligonucleotídeos, 12,5  $\mu$ L de Master Mix (0,4 mM de cada dNTP - dATP, dCTP, dGTP e dTTP -, 4 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,05 U/ $\mu$ L de

TaqDNA Polymerase; Fermentas), 1 µL de cDNA de somitos de embriões (que não foram submetidos à cultura celular) e volume final ajustado para 25 µL de água *nuclease-free*. A reação ocorreu 94 °C por 5 min, 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e um ciclo de 72 °C por 5 min e a confirmação da amplificação foi verificada por gel de eletroforese em agarose 1%.

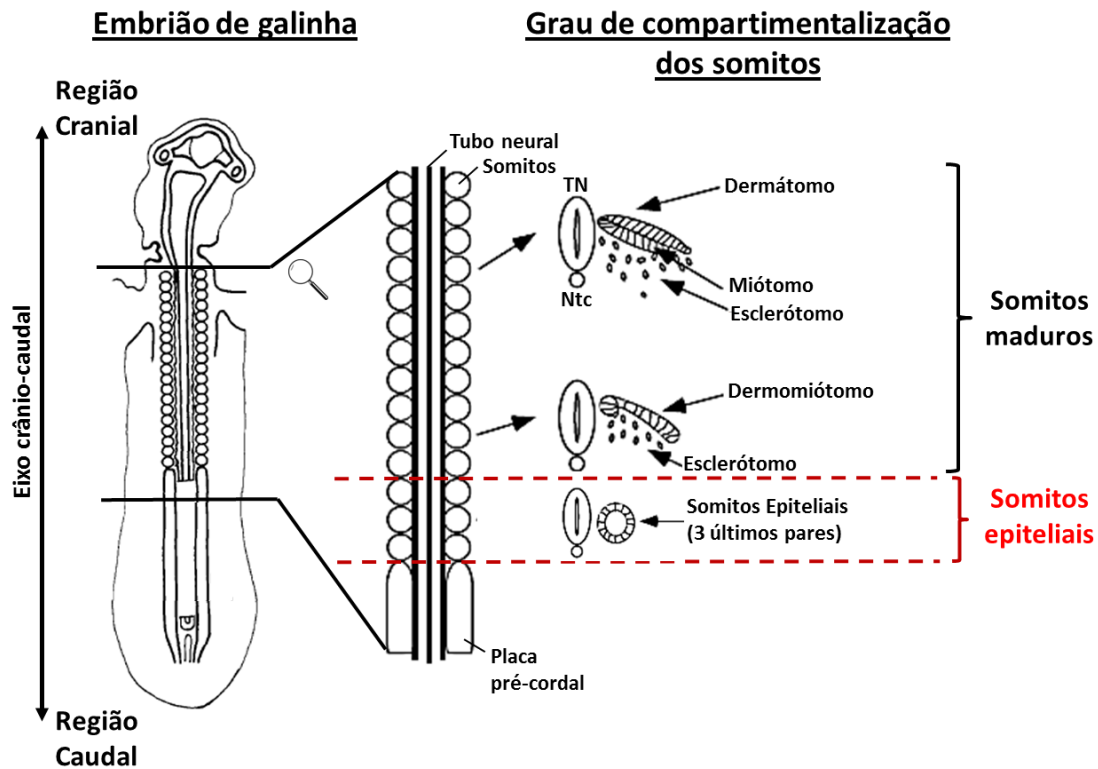
Uma vez que os oligonucleotídeos desenhados foram validados, seguiu-se para as reações de RT-PCRq, contendo 5 µL de iTaq™ *Universal SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad), 0.4 µM de cada um dos oligonucleotídeos, 1 µL cDNA diluído 1:10 em água e ajuste de volume final para 10 µL com água *nuclease-free*. A reação ocorreu a 50 °C por 2 min (ativação UDG), 95 °C por 2 min (ativação da Taq), e 45 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C por 15 s e 72 °C por 20 s no aparelho Rotor Gene™ 3000. A confirmação da amplificação específica ocorreu pela análise da curva de melting e algumas amostras foram ainda verificadas por eletroforese em agarose 1%.

A análise de expressão relativa foi realizada utilizando-se o *software* REST 2009 com  $p < 0,05$  (QIAGEN), desenvolvido por Pfaffl e colaboradores (2001, 2002).

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo 270/2017 (**Anexo 1**).

### **4.3. Superexpressão de *RGMa1* nas células de somitos em cultura**

Existe uma dessincronia no desenvolvimento embrionário, na qual as estruturas da região cranial se desenvolvem primeiramente quando comparadas às estruturas caudais. Sabe-se que os somitos craniais, anteriormente posicionados, já estão compartimentalizados enquanto que os caudais são, ainda, epiteliais (Münsterberg & Lassar, 1995; Musumeci *et al.*, 2015; **Figura 11**).



**Figura 11. Esquema da compartimentalização dos somitos durante o desenvolvimento embrionário.** Devido à dessincronia existente durante o desenvolvimento embrionário, em que estruturas cranialmente localizadas se desenvolvem primeiramente quando comparadas às estruturas caudais, observa-se uma diferença no grau de maturação entre diferentes somitos dessas regiões. Somitos craniais apresentam células diferenciadas em dermatômo, esclerótomo e miótomo; enquanto que os caudais apresentam-se, ainda, como epiteliais (três últimos pares), sem grau de compartimentalização. **TN:** Tubo neural; **Ntc:** notocorda. Figura adaptada de Münsterberg & Lassar, 1995.

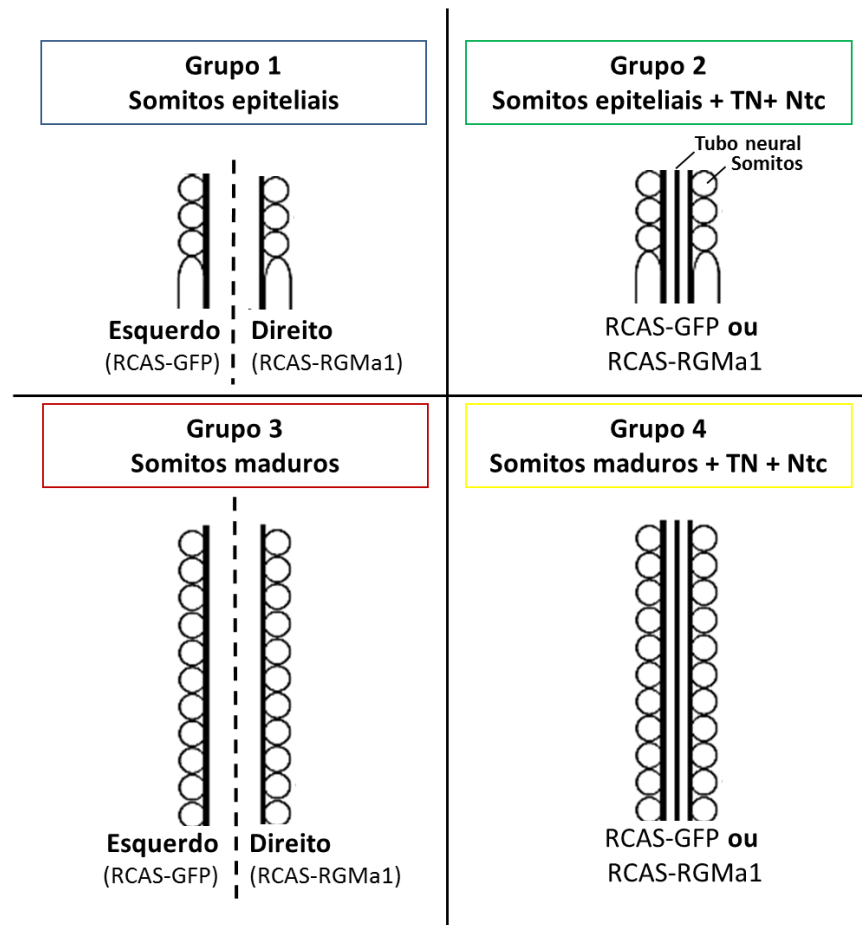
Por esse motivo, os somitos foram isolados formando quatro grupos experimentais, conforme grau de maturidade (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Grupos experimentais obtidos a partir dos embriões de galinha em estágio HH10-11.

Grupo	Tecido
1	Somitos epiteliais
2	Somitos epiteliais juntamente ao tubo neural e notocorda
3	Somitos maduros
4	Somitos maduros juntamente ao tubo neural e notocorda



Foram utilizados doze poços por grupo experimental sendo 6 poços para transfecção com RCAS-RGMa1 e 6 com RCAS-GFP como controle. Para os grupos 1 e 3 foram utilizados os somitos isolados do lado direito do tronco para transfecção com RCAS-RGMa1 e os do lado esquerdo, do mesmo embrião, para transfecção com RCAS-GFP (controle). Para os grupos 2 e 4 (em que foram preservados o tubo neural e a notocorda) foram utilizados um embrião por poço. Os experimentos foram realizados em triplicata (**Figura 12**).



**Figura 12. Esquema da superexpressão em somitos com diferentes graus de compartimentalização.** Nos grupos experimentais 1 e 3, os somitos independentes (epiteliais ou maduros) de tubo neural e notocorda foram seccionados e divididos em lados esquerdo e direito, que receberam o construto com RCAS-RGMa1 e o controle RCAS-GFP, respectivamente. Nos grupos experimentis 2 e 4, somitos (epiteliais ou maduros) juntamente com o tubo neural e notocorda, receberam o construto controle RCAS-GFP ou recebem o construto RCAS-RGMa1, para expressão da proteína de interesse RGMa1. **TN:** Tubo neural; **Ntc:** notocorda.

As células obtidas em cada um dos grupos descritos acima foram mantidas em placas de 24 poços por 7 dias, momento em que ocorreu a tranfecção com RCAS-

RGMa1. A superexpressão de *RGMa1* nas células dos somitos foi promovida pelo reagente FuGENE® *Transfection Reagent* (Promega). Um total de 3 µL de *Fugene Reagent* foram misturados a 50 µL meio Opti-MEM (Gibco), por poço transfectado, levados ao vórtex e incubados a TA por 5 min. Em seguida, 2,5 µg de RCAS-RGMa1 ou RCAS-GFP foram adicionados ao meio, levados novamente ao vórtex e incubados por 30 min a TA. O meio de cultura onde as células estavam sendo cultivados foi trocado por um meio fresco ( $\alpha$ -MEM, 10% SFB, 1% anti-anti, 1 ng/mL de bFGF) e a solução de transfecção foi adicionada à cultura nos diferentes grupos experimentais. As células permaneceram incubadas em meio de transfecção por 48h, e o meio foi novamente trocado por meio fresco. Após 48h, as culturas foram coletadas em 1 mL de TRI *Reagent*®, para análise da expressão gênica por PCR quantitativa, e em 600 µL de solução inibidora de proteases, para a análises por Western Blot.

#### **4.4. RT-PCR quantitativa (RT-PCRq) para marcadores de células de somito transfectadas com o construto RCAS-RGMa1**

Três poços de cada um dos grupos de células transfectadas com RCAS-RGMa1 ou RCAS-GFP foram coletados em TRI *Reagent*® (Sigma) e foram submetidas à extração de RNA total similar à extração realizada na cultura de células de somito (descrita anteriormente). Cerca de 1 µg de RNA total foi convertido em DNA complementar (cDNA), seguindo as instruções do fabricante com o kit *RevertAidTM H. Minus First Stand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific).

Os mesmos oligonucleotídeos, validados anteriormente (**Tabela 2**), foram utilizados para avaliação, por RT-PCR1, dos efeitos da superexpressão de RGMa1 sobre as células dos somitos transfectados. As reações de RT-PCRq e a análise de expressão relativa foi realizada utilizando-se o *software* REST 2009, também similar ao descrito na seção de cultura de células de somito.

#### **4.5. Western Blot para células de somitos transfectadas com o construto RCAS-RGMa1**

Três poços de cada um dos grupos de células transfectadas com RCAS-RGMa1 ou RCAS-GFP foram coletadas e homogeneizadas em PBS na presença de NaCl 0,9%, contendo inibidores de protease: N-[N-(L-3-trans-carboxiirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina; [1-[N-[(L-3-trans-carboxioxirane-2 carbonil)-L-leucil]amino]-4

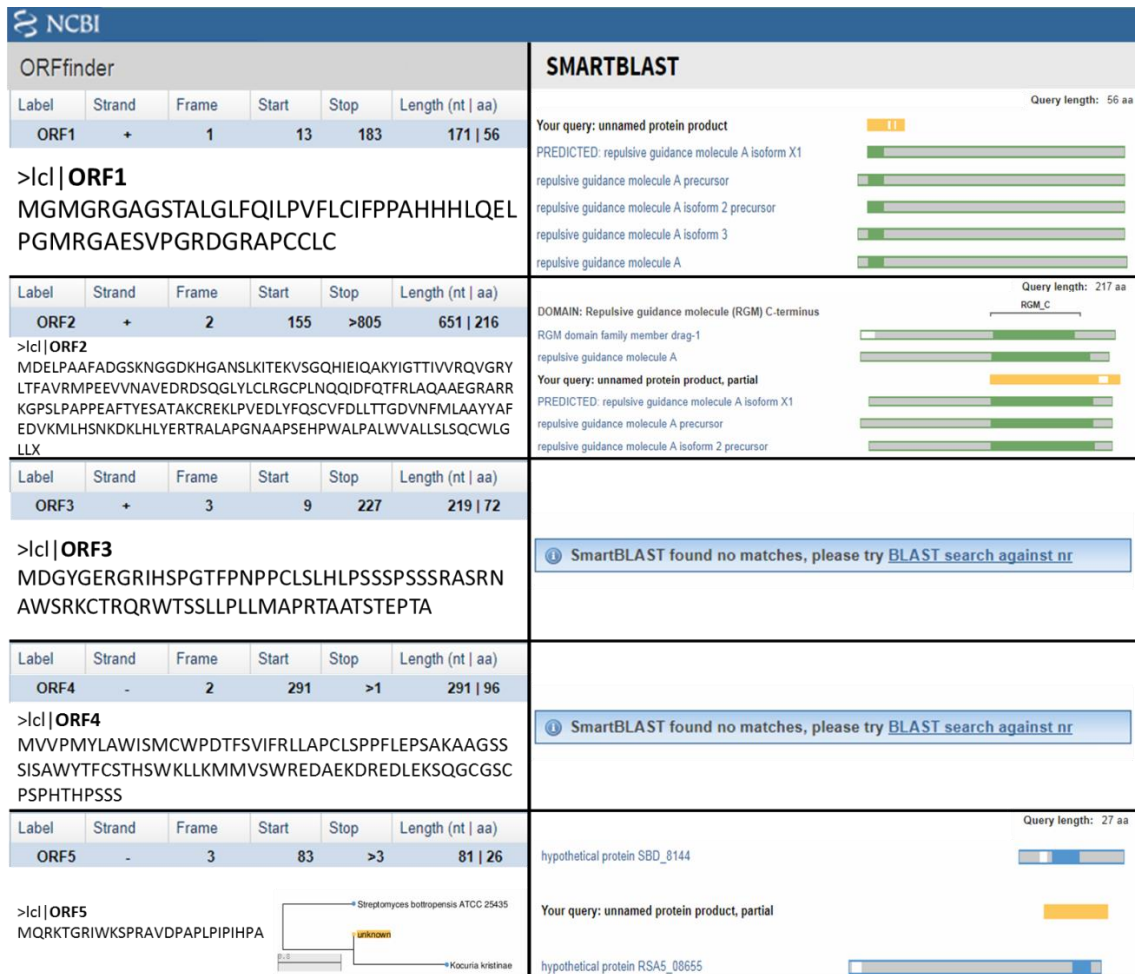
guanidinobutano] (Sigma-Aldrich). Após sonicação, os lisados foram centrifugados a 14.000 x g por 30 min, o sobrenadante diluído 1:2 em solução de SDS 10% (Sigma-Aldrich) glicerol,  $\beta$ - mercapetanol e azul de bromofenol 10% em tampão Tris 0,5 M (pH 6,8) e fervido a 100 °C por 5 min. 300  $\mu$ g de proteínas foram separadas eletroforéticamente em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida 15-20% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) a 100 mA por 75 min. O bloqueio foi realizado com TBS (*Tris Buffered Saline*), contendo Tween 20 0,01% e Caseína (TBS-TC) por 30 min. A incubação com os anticorpos primários anti-RhoA (1:500, Santa Cruz Biothechnology), anti-Smad1/5/8 (1:500, Santa Cruz Biothechnology) e anti-GAPDH (1:1000, Santa Cruz) foi realizada *overnight* a 4 °C. Após lavar com PBS, as membranas foram incubadas por 1h com os anticorpos secundários biotinizados, seguidos pela incubação com solução de estreptavidina (Thermo Fisher Scientific) por 15 min a TA. A revelação foi realizada com 3,30-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich), cloronaftol (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio 30% (Sigma-Aldrich) por 1 min a TA. As imagens foram obtidas em *scanner* Epson Perfection 4990 (Epson).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Predição da ORF da sequência nucleotídica de *RGMa1*

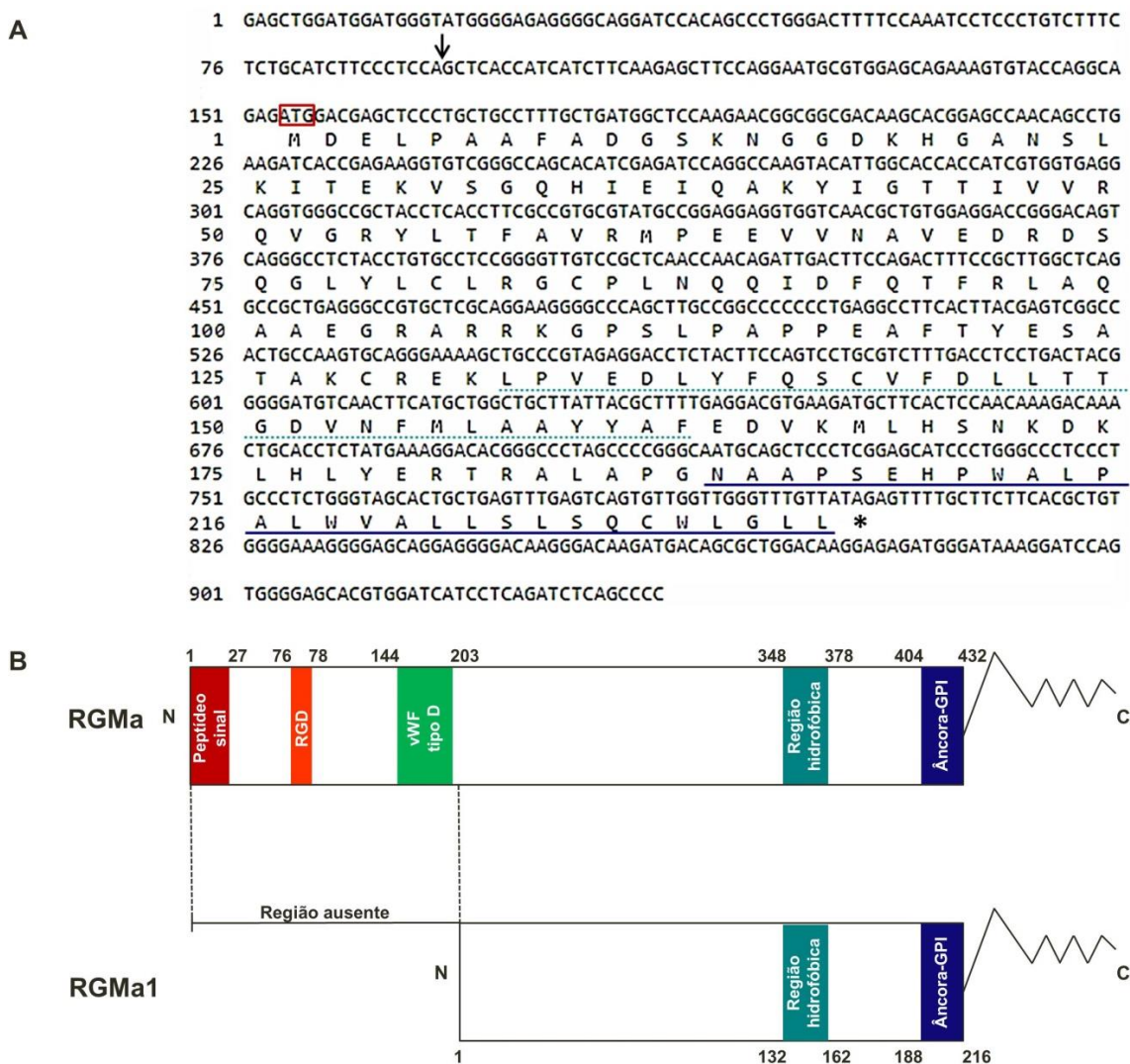
O programa ORF finder foi usado para definir a posição dos oligonucleotídeos utilizados para clonagem de *RGMa1* ao vetor retroviral RCAS. O programa identificou um total de cinco possíveis Fases de Leitura Abertas (ORFs) para a sequência nucleotídica da isoforma de *RGMa*, denominada *RGMa1*, três senso positivas (3' - 5') e duas antisenso (5' - 3'; **Figura 13**).

Dentre as possíveis ORFs, somente as sequências de aminoácidos das ORFs positivas 1 e 2 apresentaram *hit* com a família RGM, especificamente com RGMa, confirmadas pelo programa SMARTBlast (**Figura 13, ORFs 1 e 2**). A ORF1 apresentou similaridade exclusivamente com a porção N-terminal incompleta de RGMa; enquanto que a ORF2 apresentou similaridade com a porção C-terminal dessa proteína (**Figura 13, ORFs 1 e 2**). As ORFs 3 e 4 não apresentaram *hit* com nenhuma proteína disponível no banco de dados (**Figura 13, ORFs 3 e 4**). A ORF5 apresentou *hit* com duas proteínas hipotéticas e não-caracterizadas, relacionadas a gêneros de bactérias (**Figura 13, ORF5**).



**Figura 13. Possíveis Quadros de Leitura Abertos (ORFs) para *RGMa1*.** Realizada a tradução da sequência nucleotídica de *RGMa1*, o programa ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) indicou cinco possíveis ORFs de leitura para *RGMa1*, sendo três no sentido senso (ORFs 1, 2 e 3) e duas antisenso (ORFs 4 e 5). Os peptídeos das ORFs 1 (56 aminoácidos) e 2 (216 aminpácidos) apresentaram similaridade com com RGMa, confirmado pelo programa SMARTblast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/?LINK\\_LOC=BlastHomeLink](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/?LINK_LOC=BlastHomeLink)). As cadeias de aminoácidos das ORFs 3 e 4 não apresentaram *hits* com nenhuma proteína disponível no banco de dados; e a ORF5 (26 aminácidos) apresentou similaridade com proteínas não caracterizadas, relacionadas aos gêneros de bactérias *Streptomyces* e *kocuria*.

Neste trabalho, optamos pelo estudo da ORF2, uma ORF que codifica para uma cadeia de aminoácidos contendo exclusivamente a porção C-terminal de *RGMa*. Desse modo, a ORF2 sugere a tradução dos 901 nucleotídeos de *RGMa1* em uma proteína composta por 216 resíduos de aminoácidos (**Figura 14A**), contendo apenas a região hidrofóbica e a âncora-GPI no domínio C-terminal conhecidos da família, e removendo o domínio N-terminal (contendo o peptídeo sinal, o motivo RGD e fator de von Willebrand tipo D) por *splicing* alternativo (**Figura 14B**).

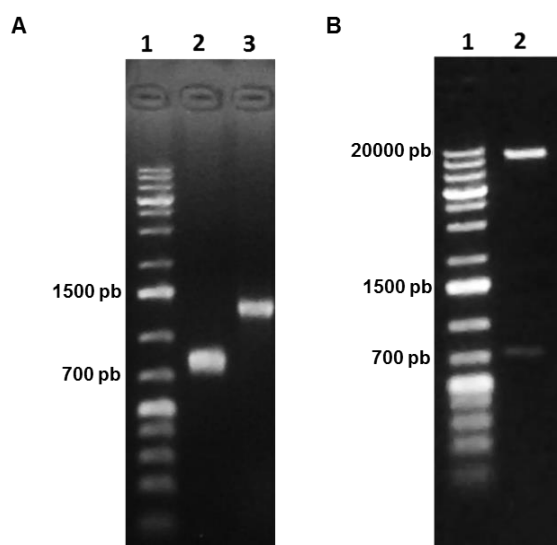


**Figura 14. Sequência de *RGMa1* e comparação de sua estrutura proteica com *RGMa*.** **A.** Sequência de ácidos nucleicos e aminoácidos de *RGMa1*. Seta: local onde ocorreu o splicing alternativo do RNAm de *RGMa* para geração da isoforma *RGMa1*. Retângulo vermelho: possível códon de início da tradução. Linhas pontilhadas verdes: região de domínio hidrofóbico. Linha contínua azul: âncora-GPI. O RNAm de *RGMa1* foi traduzido pelo programa Translator (<http://www.fr33.net/translator.php>). **B.** Em sua porção N-terminal, *RGMa1* não apresenta o peptídeo sinal, o motivo RGD e o domínio vWF-tipo D (fator de von Willebrand tipo D) quando comparado à *RGMa*. O domínio C-terminal de *RGMa1* conserva a estrutura similar à *RGMa*, mantendo a porção hidrofóbica e a âncora-GPI.

## 5.2. Clonagem da ORF 2 de *RGMa1* em RCAS

Os oligonucleotídeos desenhados permitiram a amplificação da ORF2 de *RGMa1* a partir do clone pcDNA3-*RGMa1*-GFP já disponível no laboratório (**Figura 15A**). A isoforma *RGMa1* foi amplificada como um fragmento de aproximadamente

~900 pb (**Figura 15, canaleta 2**). *RGMa*, apresentando cerca de ~1400 pb, foi utilizada neste experimento apenas como controle (**Figura 15A, canaleta 3**). Para permitir a inserção de *RGMal* no vetor retroviral RCAS, este teve que ser digerido para disponibilizar seu sítio de restrição (**Figura 15B**). Depois de digerido com a enzima de restrição *ClaI*, observam-se duas bandas distintas no gel de agarose, uma maior, com cerca de ~22.000 pb, que indicou que o vetor foi linearizado; e outra de ~700 pb, correspondente à sequência de GFP liberada após a digestão enzimática (**Figura 15B, canaleta 2**).



**Figura 15. Amplificação dos fragmentos de *RGMal* e *RGMa* e digestão de RCAS no sítio de restrição *ClaI*.** Em (A): (1) *GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder* (Thermo Scientific); em (2) fragmento da isoforma *RGMal* (~900 pb) e (3) de *RGMa* (~1500 pb). Em (B): (1) *GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder* (Thermo Scientific); e em (2) RCAS purificado linearizado, banda ~20.000 pb; a banda de 700 pb corresponde à sequência de GFP que foi retirada devido à digestão enzimática realizada com a enzima *ClaI*. **pb:** pares de base.

A clonagem de *RGMal* em RCAS foi confirmada por sequenciamento. A sequência de 872 pb obtida foi analisada pelo programa BLASTn contra o banco não redundante do GenBank, confirmando a similaridade do fragmento clonado com a sequência de *RGMa* de galinha, uma vez que a sequência de *RGMal* ainda não foi depositada neste banco de dados (**Figura 16, seta preta**).

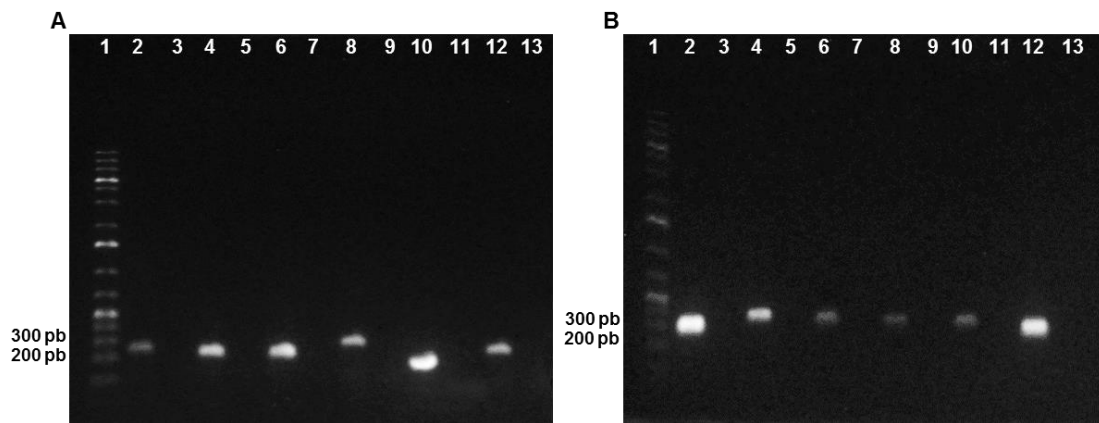
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Gallus gallus repulsive guidance molecule family member a (RGMA), mRNA</a>	747	747	91%	0.0	93%	<a href="#">NM_204537.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Numida meleagris repulsive guidance molecule family member a (RGMA), trar</a>	708	708	91%	0.0	92%	<a href="#">XM_021406940.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Numida meleagris repulsive guidance molecule family member a (RGMA), trar</a>	708	708	91%	0.0	92%	<a href="#">XM_021406939.1</a>

**Figura 16. Resultado do BLASTn para a sequência de RCAS-RGMa1.** Com uma identidade igual a 93%, a sequência do construto RCAS-RGMa1 mostrou-se similar à RGMa de galinha disponível no *GenBank* (seta preta).

### 5.3. Validação dos pares de oligonucleotídeos obtidos para a determinação dos níveis de expressão gênica de marcadores de células satélites, miogênicos, de esclerótomo e mesodérmicos

A especificidade e o tamanho do amplicon obtidos com os pares de oligonucleotídeos desenhados neste trabalho foram validados, por RT-PCR, em amostras de cDNA de células de somitos de embriões de galinha. Todos os oligonucleotídeos permitiram a amplificação de uma banda única, com amplicons conforme tamanho esperado (conforme previsto na **Tabela 2**), evidenciando sua especificidade e validação para serem utilizados no proposto trabalho (**Figura 17**).





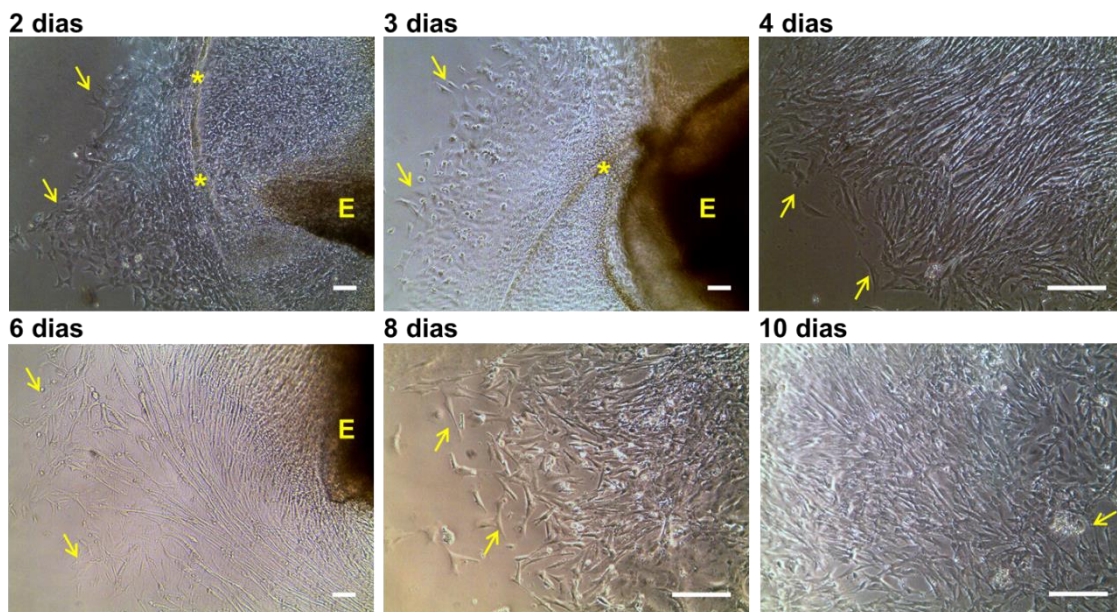
**Figura 17. Validação dos oligonucleotídeos a serem utilizados para RT-PCRq.** Todos os oligonucleotídeos amplificaram banda única, com amplicons entre 200 e 300 pb. Em **A**: (1) *GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder* (Thermo Scientific); (2) e (3) *RGMa1* e branco, respectivamente; (4) e (5) *MyoD* e branco, respectivamente; (6) e (7) *Myf5* e branco, respectivamente; (8) e (9) *Miogenina* e branco, respectivamente; (10) e (11) *Desmina* e branco, respectivamente; (12) e (13) *α-Actinina* e branco, respectivamente. Em **B** temos: (1) *GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder* (Thermo Scientific); (2) e (3) *Pax3* e branco, respectivamente; (4) e (5) *Pax7* e branco, respectivamente; (6) e (7) *Pax1* e branco, respectivamente; (8) e (9) *Sox9* e branco, respectivamente; (10) e (11) *cMeso-1* e branco, respectivamente; (12) e (13) *GAPDH* e branco, respectivamente. O branco é a reação de PCR na ausência de cDNA, evidenciando que as reações estavam livres de contaminação. **pb**: pares de base.

#### 5.4. Validação da cultura de células de somitos de embriões de galinha

Os perfis morfológico e molecular das células obtidas de explantes de somitos de embriões de galinha foram determinados a fim de caracterizar (i) o padrão de proliferação, adesão, crescimento e diferenciação dessas células; e (ii) os níveis de expressão gênica basais para os marcadores de células satélites, miogênicos, de esclerótomo e mesodérmicos nestas células durante o cultivo *in vitro*.

##### (1) Perfil morfológico

Foi possível observar que, ao longo de até 10 dias de cultivo nas condições estabelecidas neste trabalho, as células conseguiram proliferar a partir dos explantes de tecidos que foram colocados no centro dos poços sob gel de colágeno; e crescer de forma contínua em direção ao centro, sempre aderidas ao plástico e mantendo contato umas com as outras (**Figura 18**).

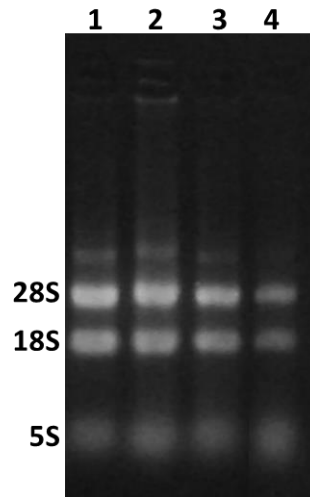


**Figura 18. Padronização da cultura de células de somito.** Caracterização do perfil da cultura de células dos somitos ao longo de 10 dias de incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As imagens apresentadas evidenciam as mais representativas ao longo dos dias. **E:** explantes; **asteriscos:** matriz de colágeno; **setas:** células. Barras equivalentes a 200 µm, sendo que as fotos das células de 2,3 e 6 foram documentadas com a objetiva de 4X; e as de 4, 8 e 10 dias com objetiva de 10X.

## (2) Perfil de expressão gênica

O perfil de expressão gênica dos marcadores alvo deste trabalho foram avaliados nas células de somitos ao 0 dia (somitos não submetidos ao cultivo celular) e após 2, 5 e 10 dias de cultivo celular (Figura 19).

A avaliação dos RNAs totais obtidos da cultura de células de somitos de galinha nos períodos de 0, 2, 5 e 10 dias revelou a integridade do material isolado (**Figura 19**).

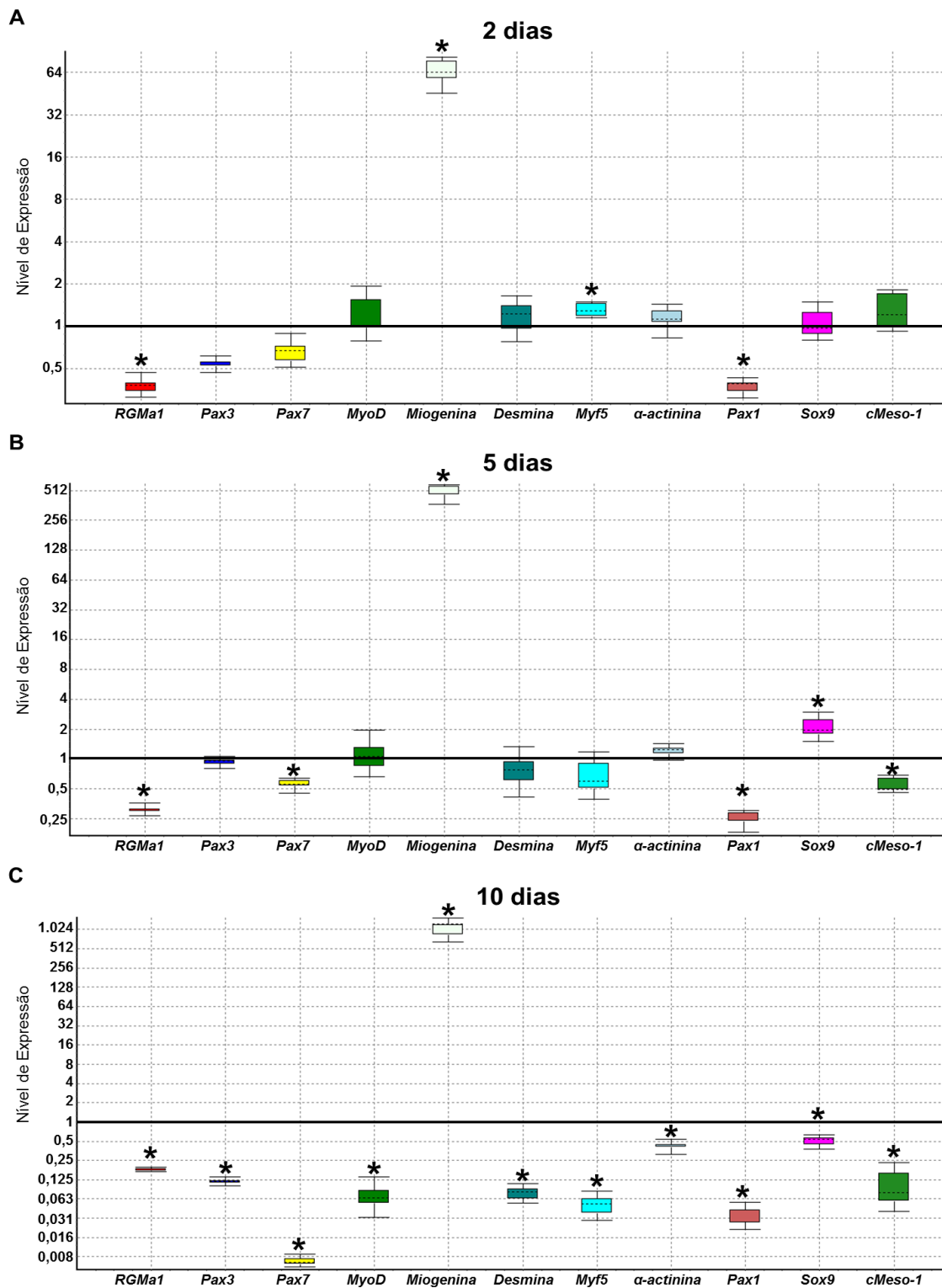


**Figura 19.** RNA total extraído da cultura de células de somito de embrião de galinha. RNA total mostra-se íntegro após extração, com as bandas 5S, 18S e 28S do RNA ribossomal evidentes. RNA total extraído de células de somito nos tempos de (1) 0 dia; (2) 2 dias; (3) 5 dias; e (4) 10 dias em cultura, sendo 0 dia, somitos que não foram cultivados.

A análise da expressão gênica por RT-PCRq evidenciou que após 2 dias de cultura, as células de somito em cultura apresentaram uma diminuição de 3,5 nos níveis de expressão de *RGMa1*, comparado aos níveis de expressão detectados no dia 0 (somitos recém coletados) de cultura (**Figura 20A**). Além disso, houve um aumento significativo da expressão de *Miogenina* (de 66,1 vezes) e *Myf5* (de 1,3 vezes; **Figura 20A**) após este período de cultura. Constatou-se também a diminuição de expressão do marcador de esclerótomo *Pax1* (de 3,7 vezes) comparados à expressão de 0 dia (**Figura 20A**). Entretanto, não houve diferença dos níveis de expressão para os marcadores de células satélites, *Pax3* e *Pax7*, para os fatores miogênicos, *MyoD* e *Desmina*, de citoesqueleto,  *$\alpha$ -Actinina*, de esclerótomo, *Sox9*, nem mesodérmico, *cMeso-1*.

Após 5 dias de cultura, as células de somitos apresentaram uma redução significativa dos níveis de *RGMa1* (de 3 vezes), quando comparados com a expressão ao 0 dia de cultura (**Figura 20B**). Observou-se ainda uma redução de 2,6 vezes de *Pax7*; um aumento de 504,1 vezes nos níveis de *Miogenina*; uma redução dos níveis de *Pax1* (de 5,1 vezes) e um aumento nos níveis de *Sox9* (2 vezes), sempre comparados aos níveis detectados no dia 0 (**Figura 20B**). Para os demais marcadores de células satélites, fatores miogênicos, citoesqueleto e mesenquimal não ocorreram alterações nos níveis de expressão.

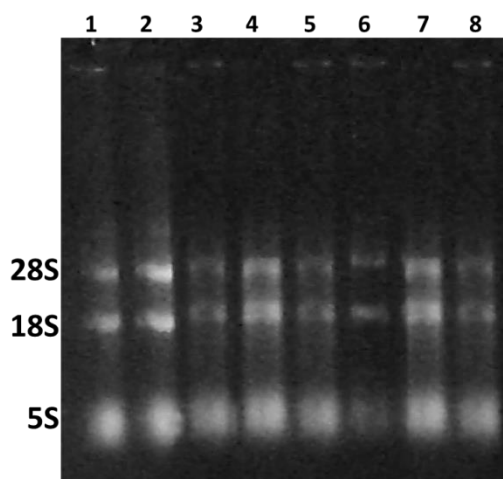
Os níveis de expressão de *RGMa1*, após 10 dias das células em cultura, apresentaram-se com uma diminuição de 7,9 vezes quando comparada à expressão em 0 dia (**Figura 20C**). Além disso, observou-se uma diminuição na expressão de *Pax3* e *Pax7* (de 9 e 99,3 vezes, respectivamente); de *MyoD* (de 6,4 vezes), *Desmina* (de 6) e *Myf5* (de 6,2 vezes; **Figura 20C**). Contudo, para o fator miogênico *Miogenina* observou-se um aumento de 1085,0 vezes quando comparado á expressão de 0 dia em cultura (**Figura 20C**). Constatou-se ainda uma redução significativa dos níveis de  $\alpha$ -*Actinina* (de 3,4 vezes); de *Pax1* (de 7,7 vezes); *Sox9* (de 2 vezes); e *cMeso-1* (de 8,1 vezes; **Figura 20C**).



**Figura 20. Avaliação do perfil transcricional das células de somitos de embrião de galinha aos 2, 5 e 10 dias em cultura.** Observou-se uma diminuição dos níveis de expressão de *RGMa1* aos 2, 5 e 10 dias (A-C). Aos 2 dias (A), observou-se aumento dos níveis de expressão dos fatores miogênicos, *Miogenina* e *Myf5*, e uma diminuição do marcador de esclerótomo, *Pax1*. Aos 5 dias (B), constatou-se a diminuição nos níveis do marcador de célula satélite, *Pax7*. Nesse mesmo tempo de cultivo observou-se aumento dos níveis de *Miogenina*. Constatou-se também alteração para os marcadores de esclerótomo, *Pax1* e *Sox9*, que apresentaram diminuição e aumento de seus níveis de expressão, respectivamente. Aos 10 dias (C), notou-se a diminuição para os marcadores de células satélites, *Pax3* e *Pax7*, de fatores miogênicos, *MyoD*, *Desmina* e *Myf5*, de citoesqueleto,  $\alpha$ -actinina, de esclerótomo, *Pax1* e *Sox9*, e mesodérmico, *cMeso-1*. Entretanto, observou-se aumento nos níveis de *Miogenina* aos 10 dias em cultura. As análises estatísticas foram avaliadas com uso do programa REST 2009 e  $p < 0.05$ .

### 5.5. Avaliação dos efeitos da superexpressão de *RGMa1* em células derivadas de somitos epiteliais, cultivadas na presença ou ausência de tubo neural e notocorda, por RT-PCRq

A avaliação dos RNAs totais obtidos das culturas de células de somitos transfectadas com RCAS-*RGMa1* e RCAS-GFP revelou a integridade do material isolado (**Figura 21**).



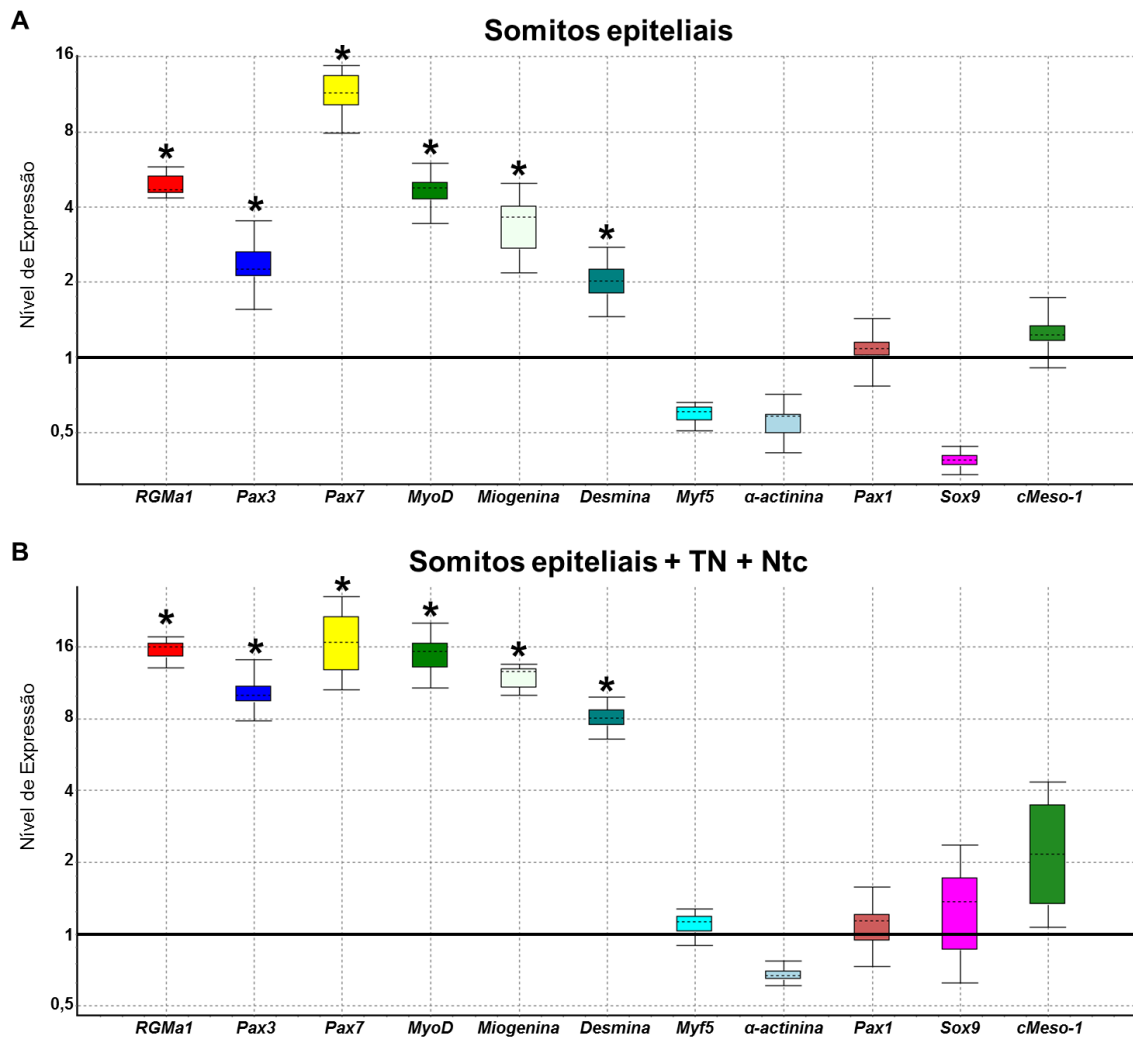
**Figura 21. RNA total extraído das células de somito após superexpressão de *RGMa1*.** RNA total mostra-se íntegro após extração, com as bandas 5S, 18S e 28S do RNA ribossomal evidentes. Em (1) e (2), RNA total de somitos epiteliais transfectados com RCAS-GFP e RCAS-*RGMa1*, respectivamente; em (3) e (4) RNA total de somitos epiteliais com tubo neural e notocorda presentes, que foram transfectados com RCAS-GFP e RCAS-*RGMa1*, respectivamente. Em (5) e (6), RNA total de somitos maduros transfectados com RCAS-GFP e RCAS-*RGMa1*, respectivamente; em (7) e (8), RNA total de somitos maduros com tubo neural e notocorda presentes, transfectados com RCAS-GFP e RCAS-*RGMa1*, respectivamente.

A superexpressão de transcritos de *RGMa1* foi confirmada nos dois grupos avaliados: foi possível observar um aumento de 4,8 vezes na expressão de *RGMa1* nas amostras de somitos epiteliais (**Figura 22A**) e de 15,5 vezes nas amostras de somitos epiteliais associados ao tubo neural e notocorda (**Figura 22B**).

A superexpressão de *RGMa1* induziu um aumento significativo na expressão dos marcadores de células satélites (*Pax3* e *Pax7*) e dos fatores miogênicos (*MyoD*, *Miogenina* e *Desmina*) em células de somitos epiteliais caudais (**Figura 22A**). Nestas amostras, a superexpressão de *RGMa1* induziu um aumento significativo de 2,3 vezes na expressão de *Pax3* (**Figura 22A**); e um aumento de 11,4 vezes na expressão de *Pax7* (**Figura 22A**), em relação aos níveis de expressão detectados nas amostras transfectadas com o construto controle. Com relação aos marcadores miogênicos, a superexpressão de

*RGMa1* induziu um aumento significativo de 4,7 vezes na expressão de *MyoD*, 3,4 na expressão de *Miogenina* e de 2,0 vezes na expressão de *Desmina*, todos comparados aos respectivos controles. A superexpressão de *RGMa1*, no entanto, não induziu efeitos na expressão de *Myf5* e  $\alpha$ -*Actinina*, tampouco de marcadores de diferenciação do esclerótomo, *Pax1* e *Sox9*, e mesodérmico, *c-Mesol*.

A presença de células derivadas das estruturas axiais (tubo neural e notocorda) na cultura de células dos somitos epiteliais não alterou os efeitos de *RGMa1* na indução de marcadores de células satélites e miogênicos. Foi observado um aumento significativo na expressão de *Pax3* (10,0 vezes) e *Pax7* (16,6 vezes), comparados aos respectivos controles; e também de *MyoD* (14,9 vezes), *Miogenina* (12,0 vezes) e *Desmina* (8,0 vezes), também comparados aos respectivos controles (**Figura 22B**). Níveis maiores de expressão de *RGMa1* foram obtidos nessas amostras (de ~16 vezes) quando comparados com os somitos epiteliais individualizados (de ~5 vezes), resultando em níveis também maiores de aumento na expressão dos marcadores de células satélites e miogênicos (**Figura 22B**).



**Figura 22. Efeitos da superexpressão de *RGMa1* sobre a expressão gênica de células de somitos epiteliais.** Realizada a superexpressão, os níveis de expressão de *RGMa1* mostraram-se aumentados em ambos os grupos (A-B). Observa-se que há aumento dos níveis de expressão, tanto para somitos epiteliais (A) quanto somitos epiteliais juntamente a TN e Ntc (B), para os mesmos marcadores gênicos. Em (A) e (B), constatou-se aumento dos níveis de expressão para marcadores de células satélites, *Pax3* e *Pax7*, e de fatores miogênicos, *MyoD*, *Miogenina* e *Desmina*. Vale ressaltar ainda que ocorreu um aumento dos níveis de expressão desses marcadores que acompanhou o maior nível de expressão de *RGMa1* observados em B. As análises estatísticas foram avaliadas com uso do programa REST 2009 e  $p < 0.05$ . TN: tubo neural; Ntc: notocorda.

### 5.6. Avaliação dos efeitos da superexpressão de *RGMa1* em células derivadas de somitos maduros, cultivadas na presença ou ausência células de tubo neural e notocorda, por RT-PCRq

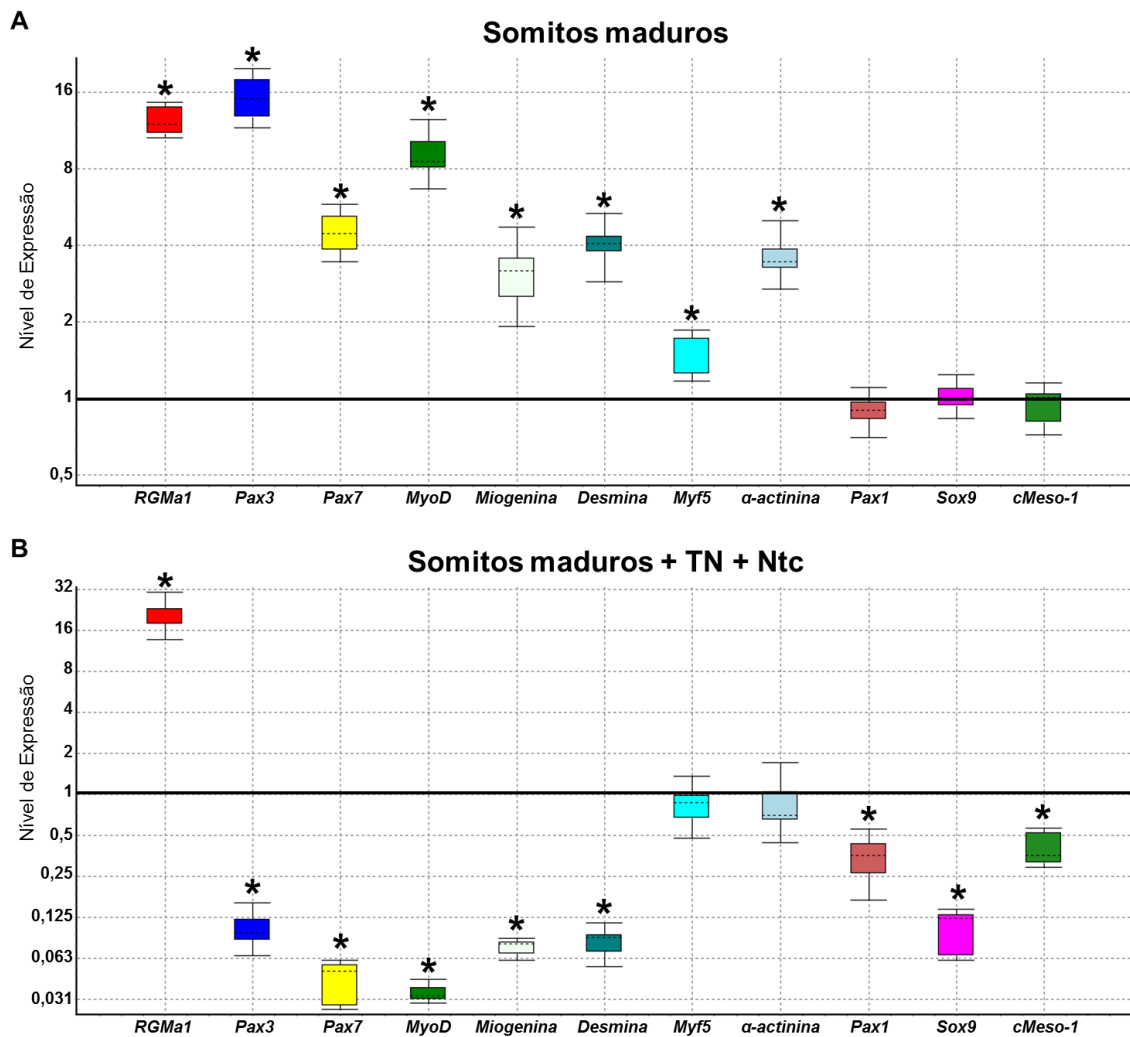
A superexpressão de transcritos de *RGMa1* também pode ser confirmada nos dois grupos avaliados: foi possível observar um aumento de 12,3 vezes na expressão de



*RGMal* nas amostras de somitos maduros (**Figura 23A**) e de 19,8 vezes nas amostras de somitos maduros associados ao tubo neural e notocorda (**Figura 23B**).

A superexpressão de *RGMal* também induziu um aumento na expressão de fatores de células satélites e miogênicos no grupo de somitos maduros independentes. *RGMal* induziu um aumento de 15,1 vezes na expressão de *Pax3* e de 4,5 vezes na expressão de *Pax7*, comparados aos respectivos controles (**Figura 23A**). Com relação aos marcadores miogênicos, *RGMal* induziu um aumento de 8,9 vezes na expressão de *MyoD*; 3,1 vezes na expressão de *Miogenina* e de 4,0 vezes na expressão de *Desmina*, comparados aos respectivos controles (**Figura 23A**). Nos somitos maduros, a superexpressão de *RGMal* induziu ainda um aumento significativo na expressão de *Myf5* (1,6 vezes); e de  $\alpha$ -*Actinina* (3,5 vezes), comparados aos controles (**Figura 23A**).

A presença de células derivadas do tubo neural e a notocorda associada às células dos somitos maduros (**Figura 23B**), no entanto, induziu uma alteração no perfil transcricional das células que superexpressaram *RGMal*. Foi observado que a superexpressão de *RGMal* levou a uma redução nos níveis de expressão dos transcritos associados à linhagem de células satélites (*Pax3* e *Pax7*); de fatores de transcrição da linhagem miogênica (*MyoD*, *Miogenina* e *Desmina*), comparados aos respectivos controles (**Figura 23B**). Nestas amostras, a superexpressão de *RGMal* pode ainda induzir uma diminuição na expressão dos marcadores de determinação e diferenciação do esclerótomo, de 3,4 vezes na expressão de *Pax1*; e de 8,9 vezes na expressão de *Sox9*, comparados aos respectivos controles (**Figura 23B**). *RGMal* induziu ainda uma diminuição de 3,1 vezes na expressão do marcador de somitos recém epitelizados, *cMeso-1* (**Figura 23B**).



**Figura 23. Efeitos da superexpressão de RGMa1 sobre a expressão gênica de células de somitos maduros.** Realizada a superexpressão, os níveis de expressão de *RGMa1* mostraram-se aumentados em ambos os grupos (A-B). Em A, foi observado aumento dos níveis de marcadores de células satélites, *Pax3* e *Pax7*, de fatores miogênicos *MyoD*, *Miogenina*, *Desmina*, *Myf5*, e do marcador de citoesqueleto,  $\alpha$ -actinina. Entretanto, a presença das células do TN e da Ntc, em B, desencadeou um efeito contrário ao observado nos somitos maduros, com a diminuição dos níveis de células satélites, *Pax3* e *Pax7*, dos fatores miogênicos, *MyoD*, *Miogenina* e *Desmina*. Ainda em B, observou-se redução dos níveis dos marcadores de esclerótomo, *Pax1* e *Sox9*, e do marcador mesenquimal, *cMeso-1*. Diferente dos somitos maduros, em B, não houve alterações dos níveis do marcador miogênico *Myf5* nem do marcador de citoesqueleto  $\alpha$ -actinina. As análises estatísticas foram avaliadas com uso do programa REST 2009 e  $p < 0.05$ . TN: tubo neural; Ntc: notocorda.

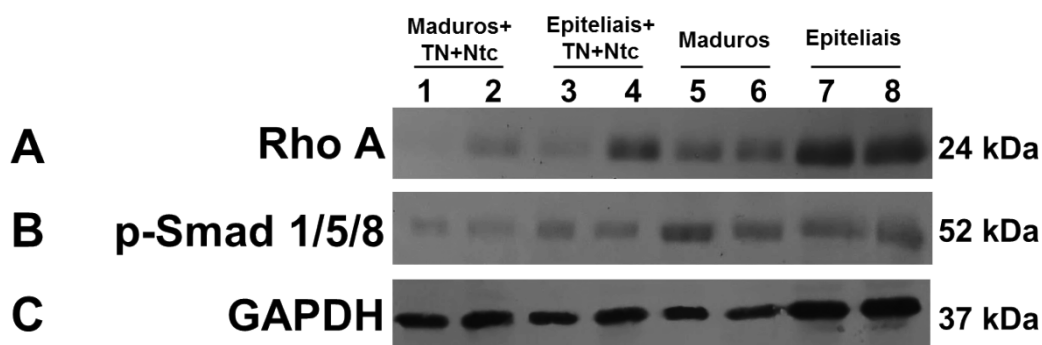
### 5.7. Avaliação das prováveis vias de sinalização intracelulares induzidas por *RGMa1* em células derivadas de somitos

Os efeitos da superexpressão de *RGMa1* na expressão de RhoA (via do receptor Neogenina) e Smad1/5/8 (via BMP) nas células dos somitos em cultura também foram

avaliados neste trabalho, a fim de identificar se *RGMa1* utiliza os mesmos receptores e vias de sinalização intracelular que já foram descritas por *RGMa* (**Figura 24**).

Nos grupos de somitos maduros e epiteliais, em que se preservou o tubo neural e notocorda, a superexpressão de *RGMa1* parece aumentar a sinalização de RhoA, quando comparados ao controle (**Figura 24A, 1-4**). No entanto, nos grupos de somitos maduros e epiteliais, independentes do tubo neural e notocorda, a sinalização de RhoA foi similar à encontrada no controle (**Figura 24A, 5-8**).

A superexpressão de *RGMa1* parece diminuir a expressão de p-Smad1/5/8 no grupo de somitos maduros (**Figura 24B, 5-6**). Nos demais grupos avaliados, não houve alteração notável na sinalização de p-Smad 1/5/8 (**Figura 24B, 1-4 e 7-8**).



**Figura 24. Efeitos da superexpressão de *RGMa1* sobre as possíveis vias de sinalização dessa molécula em células de somito.** A sinalização de RhoA mostrou-se aumentada nos grupos de somitos maduros e epiteliais em que foram mantidos o tubo neural e a notocorda (**A, 1-4**). Essa diferença de expressão de RhoA não foi observada nos grupos de somitos independentes de tubo neural e notocorda (**A, 5-8**). Não foi observada alteração da sinalização de p-Smad 1/5/8 nos grupos avaliados, com exceção do grupo de somitos maduros, independentes de tubo neural e notocorda, em que a sinalização de p-Smad 1/5/8 mostrou-se reduzida (**B, 5-6**). A expressão de GAPDH, proteína de expressão constitutiva, também está evidenciada para todos os grupos testados (**C, 1-8**). **TN:** tubo neural; **Ntc:** notocorda.

## 5.8. Resumo geral dos resultados decorrentes da superexpressão de RGMa1

De modo a facilitar a compreensão e visualização dos efeitos da superexpressão de RGMa1 em cultivo de células de somito de embriões de galinha, medidos por RT-PCRq (**Figuras 22 e 23**) e Western Blot (**Figura 24**), os resultados foram organizados e sumarizados na **Tabela 4**.

**Tabela 4. Sumarização dos resultados decorrentes dos efeitos da superexpressão de RGMa1 sobre as células de somitos de embriões de galinha *in vitro*.** As setas verticais vermelhas, com sentido voltado para cima, indicam que houve uma indução positiva na expressão dos marcadores descritos, realizada a expressão de RGMa1. As setas verticais azuis, com sentido voltado para baixo, sinalizam que houve repressão dos marcadores indicados, após expressão de RGMa1. O número 0 (zero) indica que não houve significância nos valores de expressão dos marcadores mensurados. A quantidade de setas está relacionada com os efeitos observados para o grupo, quanto maior a quantidade de setas, mais pronunciado foi o efeito de RGMa1 sobre o grupo de somitos cultivados. **TN:** tubo neural; **Ntc:** norocorda.

Marcadores e vias de sinalização	Grupos de somitos			
	Epiteliais	Epiteliais + TN + Ntc	Maduros	Maduros + TN + Ntc
Marcadores pré-miogênicos ( <i>Pax3/Pax7</i> )	↑	↑↑↑↑	↑↑	↓↓
Marcadores miogênicos ( <i>MyoD/Miogenina/Desmina</i> )	↑	↑↑↑↑	↑↑	↓↓
Marcadores de esclerótomo ( <i>Pax1/Sox9</i> )	0	0	0	↓↓
Sinalização de RhoA	0	↑	0	↑
Sinalização de BMP via Smad 1/5/8	0	0	↓	0

## 6. DISCUSSÃO

As Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGM) foram primariamente descritas desempenhando sua função como orientadoras de axônios no teto óptico dos embriões de galinha em desenvolvimento (Monnier *et al.*, 2002). A orientação axonal é um processo complexo no qual o orientador de axônio deve desencadear a ativação de uma cascata de sinalização que promova alteração e rearranjo do citoesqueleto do cone de crescimento do axonal (Huber *et al.*, 2003; Pasterkamp & Kolodkin, 2013). A associação entre RGMa, junto a seu receptor Neogenina, é capaz de ativar a via RhoA, que pode modular o crescimento do cone axonal (Conrad *et al.*, 2007; Endo & Yamashita, 2009). No entanto, estudos diversos envolvendo a família RGM evidenciaram a participação dessas proteínas com outras funções, além da orientação de axônios, em diferentes processos biológicos de suma importância, como supressão da angiogênese (RGMa; Fujita & Yamashita, 2017; Wang *et al.*, 2018), ativação de células do sistema imune (RGMb; Xiao *et al.*, 2014; Topalian *et al.*, 2015), controle dos níveis séricos de ferro do organismo (RGMc; Kuninger *et al.*, 2008; Nili *et al.*, 2013), bem como importância médica (RGMa), uma vez que estejam envolvidas com doenças tais como esclerose múltipla, Parkinson e encefalomielite autoimune (Nohra *et al.*, 2010, Demicheva *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2016).

O espectro funcional de RGMa estende-se também à origem, desenvolvimento, manutenção e crescimento da musculatura estriada esquelética (Jorge *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2015). Transcritos de *RGMa* e *RGMb* foram localizados, por hibridização *in situ*, em somitos de embriões de galinha, local de origem da musculatura esquelética do tronco, da derme, das vértebras e costelas (Jorge *et al.*, 2012). Mais especificamente, transcritos de *RGMa* foram encontrados nos sítios de origem das células progenitoras da musculatura esquelética e das células satélites musculares (Jorge *et al.*, 2012). Curiosamente, a caracterização das RGMs em amostras de somitos de embriões de galinha revelou que *RGMa* é, na verdade, expressa nesta estrutura como uma isoforma menor de *RGMa*, contendo 901 pares de base. Nós denominamos esta isoforma de *RGMa1*.

### **6.1. *RGMa1* codifica uma proteína que desempenha suas funções de forma ancorada à membrana plasmática e não exerce sua função via sinalização induzida por BMP**

A avaliação das possíveis fases de leitura abertas (ORFs) obtidas com a sequência de 901 nucleotídeos de *RGMa1* indicaram cinco possíveis ORFs, sendo apenas duas com *hit* para RGMa. O códon de início da tradução (ATG; **Figura 14A, nucleotídeo 13 de *RGMa1***) indicado pela ORF 1 de *RGMa1* seria o mesmo que o descrito para *RGMa* (Monnier *et al.*, 2002). Entretanto, a presença de um dos sítios de *splicing* alternativo alterou o quadro de leitura, induzido o aparecimento de um códon de parada precoce na sequência nucleotídica (**Figura 14A, nucleotídeo 183 de *RGMa1***), gerando um peptídeo pequeno, de apenas 56 aminoácidos. Não se sabe se este peptídeo teria a capacidade de exercer funções relacionadas à família RGM, uma vez que seria constituído apenas pela região inicial do peptídeo sinal e a região final do domínio do fator vWF-tipo D.

As análises da ORF 2 evidenciaram um segundo códon de início da tradução localizado mais à frente na sequência nucleotídica (**Figura 14A, nucleotídeo 155 de *RGMa1***). A tradução da sequência nucleotídica da ORF 2 sugere que *RGMa1* codifica uma proteína com 216 resíduos de aminoácidos; e que mantém conservada apenas o domínio C-terminal de RGMa, contendo o domínio hidrofóbico e a âncora-GPI; o sítio de *splicing* remove toda a região N-terminal da proteína. A presença exclusiva do domínio C-terminal na isoforma fornece importantes pistas com relação ao modo de ação desta proteína. Primeiro porque a âncora-GPI é responsável pela manutenção de uma gama de proteínas que estão ligadas à membrana plasmática, voltadas para o meio extracelular (Kinoshita, 2016). A manutenção da âncora-GPI no domínio C-terminal de *RGMa1* sugere, portanto, que esta proteína desempenha suas funções de forma ancorada à membrana plasmática. Em segundo lugar, a perda da porção N-terminal de *RGMa1* sugere que esta molécula não exerce sua função biológica nos somitos utilizando os membros da via de sinalização induzida por BMP, uma vez que é esta a porção das proteínas da família RGM identificada com sítios que permitem a interação com os ligantes dessa via (Healey *et al.*, 2015). Interessantemente, no grupo dos amniota, o desenvolvimento dos somitos é regulado (i) pelo ectoderma de revestimento, que secreta as proteínas WNTs, juntamente ao baixo gradiente de concentração de Shh secretado pela notocorda e região ventral do tubo neural, para promover a diferenciação

dos precursores musculares do dermiótomo (Blake & Ziman, 2014, Musumeci *et al.*, 2015); e (ii) por membros da via de sinalização BMP advindos da porção dorsal do tubo neural e do mesoderma lateral, que inibem a diferenciação da musculatura e induzem a diferenciação óssea (Reshef *et al.* 1998; Feng *et al.* 2006).

## **6.2. Nos somitos epiteliais caudais, *RGMa1* induziu a expressão do marcadores pré-miogênicos *Pax3* e *Pax7* e de uma via paralela de indução miogênica, independente de *Myf5***

A função de *RGMa1* (ORF2), possivelmente com o programa miogênico de forma BMP-independente, foi investigada neste trabalho em sistema *in vitro*, pela superexpressão desta isoforma em células de somitos de embriões de galinha. Optamos por investigar esta associação primeiramente em células derivadas dos três últimos somitos da porção caudal do tronco dos embriões, que contém somitos epiteliais ainda não-compartimentalizados, ou seja, ainda não comprometidos com a diferenciação celular em nenhum dos destinos derivados dessa estrutura de mesoderma paraxial (Münsterberg *et al.*, 1995; Musumeci *et al.*, 2015). A cultura foi ainda realizada na presença e ausência do tubo neural e notocorda, estruturas conhecidas por produzir importantes moléculas sinalizadoras que determinam o destino das células somíticas (Münsterberg *et al.*, 1995; Tapscott, 2005).

A superexpressão de *RGMa1* promoveu um aumento significativo dos níveis de expressão dos marcadores *Pax3* e *Pax7* em células derivadas de somitos epiteliais. *Pax3* e *Pax7* não são fatores com expressão tecido-específica; são também expressos no neuroectoderma, em subdomínios do cérebro, na porção dorsal do tubo neural e nas células da crista neural (revisado por Buckingham & Rigby, 2014). *Pax3* e *Pax7* são considerados marcadores pré-miogênicos (Buckingham & Relaix, 2007; Berti *et al.*, 2015). *Pax3* é expresso no mesoderma paraxial pré-somítico ainda não-segmentado (Schubert *et al.*, 2001), estando provavelmente associado com a interconversão mesênquima-epitélio que determina a compactação das células de mesoderma paraxial e a formação dos somitos epiteliais (Wiggin *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2001). A expressão de *Pax3* permanece até estágios mais avançados do desenvolvimento dos somitos, mas agora restrita às células do dermomiótomo (Goulding *et al.*, 1991), particularmente em células que se separam dessa região e migram para colonizar o tronco com precursores musculares (Birchmeier & Brohmann, 2000). Por isso,

camundongos mutantes para *Pax3* apresentam formação anormal dos somitos e defeitos na formação dos músculos do tronco (Tremblay *et al.*, 1996). *Pax3* foi ainda associado à sobrevivência dos precursores miogênicos; além disso, a ausência de *Pax3* induziu a morte celular programada de células já comprometidas com o destino miogênico (Borycki *et al.*, 1999).

Células progenitoras *Pax3*<sup>+</sup>/*Pax7*<sup>+</sup> da região central do dermomiótomo são fontes de células progenitoras musculares, as células satélites (Relaix *et al.*, 2005; Buckingham & Rellaix, 2015). No entanto, trabalhos anteriores de Reshef e colaboradores (1998) revelaram que células de culturas de somitos epiteliais de embriões de galinha no estágio HH10, cultivados na ausência de tubo neural e notocorda, não expressam *Pax3* e *Pax7*. A expressão de *Pax3* e *Pax7* e o processo de miogênese no miótomo *in vivo* também é altamente dependente dos sinais advindos do TN+Ntc e ectoderma de revestimento (Spence *et al.*, 1996; Denetclaw & Ordahl, 2000). Nossos resultados sugerem *RGMal* como um fator *upstream*, capaz de induzir precocemente a expressão de *Pax3* e *Pax7*, que são fatores que determinam o início da miogênese e o estabelecimento das células satélites em somitos epiteliais. *RGMal* foi capaz de induzir esses fatores mesmo na ausência das estruturas axiais compostas pelo tubo neural e notocorda. Curiosamente, o padrão de expressão de *RGMal* nos somitos de embriões de galinha revelou sobreposição da expressão deste orientador de axônio e dos marcadores pré-miogênicos *Pax3* e *Pax7* nos somitos ainda epitelializados (Jorge *et al.*, 2012).

*RGMal* foi ainda capaz de induzir a expressão dos fatores miogênicos *MyoD* e *Miogenina*, mas não de *Myf5*, nas células de somitos epiteliais. Células de somitos epiteliais de embriões de galinha no estágio HH12 revelaram não serem capazes de expressar os fatores miogênicos na ausência do TN+Ntc quando cultivadas *in vitro* (Münsterberg & Lassar, 1995). Portanto, *RGMal* foi capaz de induzir a expressão desses fatores em um local e momento em que eles não são normalmente expressos. *Myf5* e *MRF4* são fatores envolvidos com a determinação primária do programa miogênico; enquanto que *MyoD* é considerado o ponto de convergência para vias regulatórias que dirigem a diferenciação miogênica (L'honoré *et al.*, 2010). O *enhancer* de *Myf5* é ativado diretamente pela ligação de *Pax3*, e também de outros fatores como *Six1/4* e das proteínas *Gli*, sinalizadoras intracelulares de *Shh*. Neste trabalho, a ativação da via *RGMal-Pax3* não foi capaz de induzir a expressão de *Myf5*. Por outro lado, *RGMal-Pax3* foi capaz de ativar *MyoD*, e subsequentemente de *Miogenina*. A ativação



de *MyoD/Miogenina* por *Pax3* ocorre apenas como uma via paralela de ativação miogênica, que é intermediada por *Pitx2* e ocorre durante a formação do miótomo e na formação da musculatura dos membros (L'honoré *et al.*, 2010). Juntos, estes resultados sugerem a participação de *RGMal* como um fator *upstream* especificamente da via paralela *Pax3/Pitx2/MyoD/Miogenina*.

*RGMal* induziu a expressão de *Desmina* nas células derivadas de somitos epiteliais, um marcador tardio da diferenciação miogênica. Durante transição e diferenciação do miotubo para miofibras, as proteínas músculo-específicas são expressas em sequência: *Desmina* é a primeira proteína expressa por miócitos em diferenciação, seguida pela expressão de *Titina* e de *Actina* músculo-específica (Musumeci *et al.*, 2015). Portanto, é possível que a ativação da *Desmina* seja alvo da expressão aumentada da via *RGMal/Pitx2/MyoD/Myogenina*.

Os resultados da superexpressão de *RGMal* em células de somitos epiteliais cultivados juntamente às estruturas axiais (TN+Ntc) foram similares aos obtidos com células epiteliais quando cultivadas isoladas: *RGMal* foi capaz de induzir a expressão de *Pax3* e *Pax7*, e de *MyoD*, *Miogenina* e *Desmina*, mas não de *Myf5*. Münsterberg e Lassar (1995) mostraram que os somitos epiteliais+TN+Ntc de embriões de galinha no estágio HH12 expressam os fatores de determinação e diferenciação miogênicos, evidenciando que o processo de miogênese no miótomo é dependente de sinais advindos de TN e Ntc.

É válido ressaltar ainda que os valores de aumento dos níveis de expressão de *RGMal* obtidos nas células de somitos epiteliais+TN+Ntc (~16 vezes) foram maiores em relação aos obtidos no grupo de somitos epiteliais (de ~5 vezes). Curiosamente, o mesmo ocorreu para os níveis de expressão dos marcadores pré-miogênicos e miogênicos (com aumentos nos níveis de expressão também aumentados). É possível que parte dos efeitos observados, especialmente sobre *Pax3*, seja resultado da superexpressão de *RGMal* em células de tubo neural, também presentes nesta cultura. Mas também é possível que juntos, estes resultados estejam sugerindo que sinais provenientes do TN+Ntc, nesta região dos somitos caudais, exercem uma influência positiva na expressão de *RGMal* e, conseqüentemente, na ativação da via *Pax3/MyoD/Miogenina/Desmina* (quanto maior a expressão de *RGMal*, maior a expressão dos membros da via).

### 6.3. Nos somitos maduros, *RGMa1-Pax3* foi capaz de induzir um sutil aumento da expressão de *Myf5*

A função de *RGMa1* (ORF2) também foi investigada neste trabalho em células de somitos de embriões de galinha da porção mais cranial do tronco dos embriões, que contém somitos já compartimentalizados em dermomiótomo, miótomo, sindétomo e esclerótomo (Delfini *et al.*, 2009; Thorsteinsdóttir *et al.*, 2011).

Nestas células, inicialmente cultivadas na ausência do TN+Ntc, a superexpressão de *RGMa1* também induziu um aumento dos níveis de expressão de *Pax3* e *Pax7*, *MyoD/Miogenina/Desmina*, similar ao que ocorreu com as células derivadas dos somitos epiteliais, corroborando com o potencial de *RGMa1* de fator regulador *upstream* da ação desta via miogênica. *RGMa1* foi capaz de, particularmente nestas células, também induzir um aumento sutil na expressão de *Myf5*, o que não havia ocorrido nas células derivadas de somitos epiteliais. *Myf5* é o primeiro fator miogênico expresso durante a miogênese e sua ativação é regulada por diferentes *enhancers*, distribuídos a mais de 100 kb *upstream* do gene, em sua maioria, *Pax3*-dependentes (Bajard *et al.*, 2006; Daubas *et al.*, 2013; Moncaut *et al.*, 2013). Nossos resultados sugerem, portanto, que a capacidade de *RGMa1-Pax3* induzir a expressão de *Myf5* possivelmente ocorre apenas após a compartimentalização do somito em dermomiótomo e miótomo. A expressão aumentada de *Myf5* nestes somitos provavelmente está associada à diferenciação do miótomo epaxial. É possível também que a ativação da expressão de *Myf5* por *RGMa1-Pax3* nestes somitos tenha sido ativada em função da presença dos outros ativadores necessários para a ativação do *enhancer* de *Myf5*, que incluem os membros da família *Six1/4* e os EYA cofatores (Giordani *et al.*, 2007) e também dos fatores *Gli* induzidos por Shh (Anderson *et al.*, 2012).

A indução e progressão da miogênese das células de somitos maduros em cultura, em função da presença de *RGMa1*, foi ainda comprovada pelo aumento da expressão do marcador de citoesqueleto,  *$\alpha$ -actinina*. Essa proteína foi primariamente descrita como a principal componente do disco Z do sarcômero capaz de ligar Titina aos filamentos de Actina (Masaki *et al.*, 1967; Ribeiro *et al.*, 2014). No entanto,  *$\alpha$ -actinina* foi localizada em todos os tipos celulares, fixando os filamentos de Actina à membrana plasmática e coordenando a montagem dos filamentos de Actina em áreas de contato célula-célula (Lazarides & Burridge, 1975; Foley & Young, 2014). Nossos resultados

sugerem que *RGMa1* exerceu um efeito indireto no aumento dos níveis de  $\alpha$ -actinina, sendo provavelmente um reflexo do aumento de *Pax3/MyoD*, que desencadeou a expressão de fatores de diferenciação (*Miogenina*) e de montagem do sarcômero (*Desmina* e a própria  $\alpha$ -actinina) nesses somitos maduros independentes das estruturas axiais.

#### **6.4. Os efeitos indutores de miogênese promovidos por *RGMa1* são inibidos nos somitos maduros cultivados na presença do TN+Ntc**

Surpreendentemente, a presença do tubo neural e da notocorda induziram um efeito oposto na promoção da miogênese induzida por *RGMa1*. Mesmo após a superexpressão de *RGMa1* confirmada, observou-se um efeito de redução significativa da expressão dos marcadores miogênicos, (*Pax3*, *Pax7*, *MyoD*, *Myf5*, *Miogenina*, *Desmina*), de esclerótomo (*Pax1* e *Sox9*) e o mesodérmico (*c-Mesol*). Portanto, por meio de vias de sinalização ainda desconhecidas, *RGMa1* não consegue mais ativar os fatores determinantes dos destinos celulares testados neste trabalho (condro e miogênicos).

É possível que, de alguma forma, a tradução dos transcritos de *RGMa1* superexpressos tenha sido bloqueada e sua conversão em proteína ativa, inibida. Se os efeitos de *RGMa1* na expressão de *Pax3* forem diretos, a falta de *RGMa1* ativa induziria o bloqueio do programa miogênico, conforme foi visto em nossos resultados. É ainda possível que algum sinal proveniente desta porção particular do TN e/ou Ntc esteja modulando o potencial de indução miogênico da via *RGMa1-Pax3/Pax7/Myf5/MyoD/Miogenina*. De fato, *Pax3* é considerado um importante fator regulador *upstream* da miogênese, atuando em vários estágios desde o estabelecimento dos precursores miogênicos, a partir dos precursores multipotentes dos somitos; mas apenas até o comprometimento desses precursores com o programa de diferenciação muscular (Ridgeway & Skerjanc, 2001). A progressão do programa de diferenciação miogênica, no entanto, é dependente da inibição da ação de *Pax3*. Além disso, nos precursores miogênicos derivados da porção hipaxial do dermomiótomo, comprometidos com a migração celular para a colonização dos membros e diafragma, por exemplo, também precisam regular negativamente a ativação dos marcadores miogênicos para impedir a diferenciação prematura dessas células enquanto elas ainda estão migrando (Blake & Ziman, 2014). Diversos fatores atuam inibindo a expressão de *Pax3*, incluindo sinais provenientes do TN e Ntc que incluem Notch e FGF (Dayanidhi

& Lieber, 2014), ou fatores que são expressos pelas próprias células musculares já comprometidas, como *Msx1*, *Sim2* e *Dach* (Bendall *et al.*, 1999; Kuang & Rudnicki, 2008). Seria importante investigar os efeitos da presença desses inibidores sobre a ação de *RGMa1* na miogênese.

### **6.5. RGMa1 não promove o desenvolvimento do esclerótomo ou manutenção do estado mesodérmico indiferenciado das células dos somitos**

Diferentemente dos efeitos observados para estabelecimento e maturação do miótomo, *RGMa1* não parece exercer efeito sobre o desenvolvimento do esclerótomo. A expressão dos marcadores esclerótomo-específicos, *Pax1* e *Sox9*, não mostraram alteração devido à superexpressão de *RGMa1*, com exceção do grupo de somitos maduros juntos de TN e Ntc, no qual foram reprimidos. É possível que a diminuição da expressão destes dois fatores neste grupo não seja em função da ação direta de *RGMa1*, pode ser apenas um reflexo da inibição de desenvolvimento do miótomo. O correto desenvolvimento do esclerótomo é dependente de fatores de crescimento (como FGF5) produzidos pelo miótomo diferenciado (Brent & Tabi, 2004). Além disso, os níveis inalterados desses marcadores para os demais grupos também corroboram com a hipótese de que *RGMa1* não influencia o desenvolvimento do esclerótomo.

De maneira semelhante aos resultados obtidos para os marcadores do esclerótomo, acreditamos que *RGMa1* não influencia a expressão do marcador pré-somítico *cMeso-1*. Este gene também faz parte da família bHLH, da qual fazem parte também os Fatores de Transcrição Miogênicos, além de ser expresso no mesoderma pré-somítico, estando envolvido com a somitogênese ao demarcar a área de aparecimento do par de somito seguinte durante a segmentação (Buchberger *et al.*, 1998). A expressão desse gene não mostrou alteração nos grupos analisados neste trabalho, com exceção, do grupo de somitos cultivados juntos com TN e Ntc. Essa diminuição dos níveis de *cMeso-1* deve ser decorrente ao efeito inibitório generalizado desencadeado pela superexpressão de *RGMa1* nesse grupo de somitos em específico.

### **6.6. RGMa1 não exerce seus efeitos sobre os fatores pré-miogênicos e miogênicos por vias conhecidas induzidas por RGMa (Neogenina e BMP)**

Os efeitos de *RGMa1* observados neste trabalho sobre a expressão de fatores de transcrição pré-miogênicos e miogênicos devem provavelmente ser efetivados por

mensageiros secundários intracelulares, uma vez que *RGMa1* apresenta-se como uma proteína contendo uma âncora-GPI na sua porção C-terminal, com função de ancoragem da proteína à membrana plasmática. A perda da porção N-terminal durante o processo de *splicing* alternativo de *RGMa1* sugeriu ainda que as funções desempenhadas por esta molécula nessas células não devem ser exercidas via ligação deste cofator aos ligantes da via BMP, uma vez que esse potencial dos membros da família RGM reside justamente nesta porção da proteína (Healey *et al.* 2015). Sendo assim, investigamos: (i) se os efeitos observados na ativação de fatores pré-miogênicos e miogênicos foram resultantes da ativação/repressão do fator RhoA, mensageiro da via induzida pela ligação de *RGMa* a Neogenina; e (ii) se as análises da sequência de nucleotídeos de *RGMa1* confirmariam a independência desta isoforma em relação aos membros da via BMP, investigando a expressão de Smad1/5/8 (mensageiro da via BMP2/4/receptor tipo I/receptor tipo II).

A superexpressão de *RGMa1* induziu um aumento na expressão de RhoA, mas apenas nas amostras em que as estruturas axiais (TN+Ntc) estavam presentes. Este resultado sugere, portanto, que os efeitos da superexpressão de *RGMa1* observados sobre os marcadores pré-miogênicos e miogênicos sejam independentes do mensageiro secundário RhoA. RhoA atua em uma variedade de processos celulares, incluindo a organização do citoesqueleto de actina, participação na dinâmica e organização de microtúbulos e envolvimento com a sobrevivência, polaridade e migração celular (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Bement *et al.*, 2005; Wojnacki *et al.*, 2014). A sinalização *RGMa*-Neogenina-RhoA foi descrita na indução da modulação da dinâmica do citoesqueleto do cone axonal no processo de orientação de axônios durante o desenvolvimento (Conrad *et al.*, 2007; Hata *et al.*, 2009); e com o processo de nucleação de actina e manutenção das junções de aderência por ativação de Arp-2/3 durante o processo de fechamento do tubo neural (Lee *et al.* 2016). A ativação de RhoA observada nestes grupos experimentais particulares desse trabalho devem ser, portanto, resultantes da superexpressão de *RGMa1* em células não-mesodérmicas, provavelmente em células do tubo neural presentes na cultura.

A superexpressão de *RGMa1* induziu uma diminuição da expressão do sinalizador Smad1/5/8 apenas nas células derivadas de somitos craniais independentes do TN+Ntc. Mais uma vez, os efeitos da superexpressão de *RGMa1* sobre a expressão de fatores pré-miogênicos e miogênicos também parecem ser independentes da

atividade como cofator da sinalização BMP exercida pelos membros da família RGM, confirmando assim, nossos dados da análise da sequência de *RGM1*. A expressão de *RGM1*, restrita aos somitos, pode, portanto, estar funcionando como um mecanismo de evasão à sinalização de BMP existente no dermomiótomo, permitindo seus efeitos no programa miogênico em detrimento à via condrogênica. Novos experimentos deverão revelar o completo mecanismo do programa miogênico induzido por *RGM1*.

## 7. CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho permitiu concluir que:

- *RGMa1* é gerado por *splincing* alternativo de *RGMa* em células de mesoderma paraxial formadoras dos somitos, resultando em uma molécula que desempenha suas funções de forma ancorada à membrana plasmática via âncora-GPI;
- *RGMa1* induz a expressão de marcadores pré-miogênicos e miogênicos em somitos epiteliais caudais;
- Os efeitos nos fatores pré-miogênicos e miogênicos induzidos por *RGMa1* são bloqueados nas células maduras já comprometidas, provavelmente por sinais provenientes das estruturas axiais (tubo neural e notocorda);
- *RGMa1* não influencia a determinação e diferenciação condrogênica em células derivadas do esclerótomo;
- Os mensageiros secundários induzidos por *RGMa1* ancorada à membrana plasmática são diferentes (e ainda desconhecidos) dos que são relatados por serem induzidos por *RGMa*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abmayr SM, Zhuang S, Geisbrecht ER. Myoblast fusion in *Drosophila*. *Methods Mol Biol*. 2008;475:75-97.

Amthor H, Christ B, Patel K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development*. 1999 Feb;126(5):1041-53.

Andermatt I, Wilson N, Stoeckli ET. In ovo electroporation of miRNA-based-plasmids to investigate gene function in the developing neural tube. *Methods Mol Biol*. 2014;1101:353-68.

Anderson C, Williams VC, Moyon B, Daubas P, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Shiroishi T, Hughes SM, Borycki AG. Sonic hedgehog acts cell-autonomously on muscle precursor cells to generate limb muscle diversity. *Genes Dev*. 2012 Sep 15;26(18):2103-17.

Applebaum M, Ben-Yair R, Kalcheim C. Segregation of striated and smooth muscle lineages by a Notch-dependent regulatory network. *BMC Biol*. 2014 Jul 12;12:53.

Aulehla A, Pourquié O. Signaling gradients during paraxial mesoderm development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Feb;2(2):a000869.

Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):531-9.

Babitt JL, Zhang Y, Samad TA, Xia Y, Tang J, Campagna JA, Schneyer AL, Woolf CJ, Lin HY. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem*. 2005 Aug 19;280(33):29820-7.

Bae GU, Yang YJ, Jiang G, Hong M, Lee HJ, Tessier-Lavigne M, Kang JS, Krauss RS. Neogenin regulates skeletal myofiber size and focal adhesion kinase and extracellular signal-regulated kinase activities in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*. 2009 Dec;20(23):4920-31.

Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P, Buckingham ME. A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes Dev*. 2006 Sep 1;20(17):2450-64.

Banerjee P, Harada H, Tassew NG, Charish J, Goldschneider D, Wallace VA, Sugita S, Mehlen P, Monnier PP.  $\gamma$ -secretase and LARG mediate distinct RGMa activities to control appropriate layer targeting within the optic tectum. *Cell Death Differ*. 2016 Mar;23(3):442-53.

Barrionuevo F, Taketo MM, Scherer G, Kispert A. Sox9 is required for notochord maintenance in mice. *Dev Biol*. 2006 Jul 1;295(1):128-40.



Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 2000 Dec 11;151(6):1221-34.

Bell CH, Healey E, van Erp S, Bishop B, Tang C, Gilbert RJC, Aricescu AR, Pasterkamp RJ, Siebold C. Structure of the repulsive guidance molecule (RGM)-neogenin signaling hub. *Science.* 2013 Jul 5;341(6141):77-80.

Bement WM, Benink HA, von Dassow G. A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J Cell Biol.* 2005 Jul 4;170(1):91-101.

Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Feb 1;4(2). pii: a008342. Review.

Bendall AJ, Ding J, Hu G, Shen MM, Abate-Shen C. Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors. *Development.* 1999 Nov;126(22):4965-76.

Ben-Yair R, Kahane N, Kalcheim C. Coherent development of dermomyotome and dermis from the entire mediolateral extent of the dorsal somite. *Development.* 2003 Sep;130(18):4325-36.

Ben-Yair R, Kalcheim C. Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Development.* 2005 Feb;132(4):689-701.

Bergstrom DA, Tapscott SJ. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Mol Cell Biol.* 2001 Apr;21(7):2404-12.

Berti F, Nogueira JM, Wöhrle S, Sobreira DR, Hawrot K, Dietrich S. Time course and side-by-side analysis of mesodermal, pre-myogenic, myogenic and differentiated cell markers in the chicken model for skeletal muscle formation. *J Anat.* 2015 Sep;227(3):361-82.

Birchmeier C, Brohmann H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):725-30.

Biressi S, Bjornson CR, Carlig PM, Nishijo K, Keller C, Rando TA. Myf5 expression during fetal myogenesis defines the developmental progenitors of adult satellite cells. *Dev Biol.* 2013 Jul 15;379(2):195-207.

Blake JA, Ziman MR. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development.* 2014 Feb;141(4):737-51. Review.

Borghini N, James Nelson W. Intercellular adhesion in morphogenesis: molecular and biophysical considerations. *Curr Top Dev Biol.* 2009;89:1-32.

Borycki AG, Li J, Jin F, Emerson CP, Epstein JA. Pax3 functions in cell survival and in pax7 regulation. *Development.* 1999 Apr;126(8):1665-74.

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*. 2011 Apr;23(4):609-20.

Brasse-Lagnel C, Poli M, Lesueur C, Grandchamp B, Lavoinnie A, Beaumont C, Bekri S. Immunoassay for human serum hemojuvelin. *Haematologica*. 2010 Dec;95(12):2031-7.

Brand-Saberi B, Christ B. Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr Top Dev Biol*. 2000;48:1-42. Review.

Brent AE, Tabin CJ. FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors *Pea3* and *Erm* to regulate *scleraxis* expression. *Development*. 2004 Aug;131(16):3885-96.

Brinks H, Conrad S, Vogt J, Oldekamp J, Sierra A, Deitinghoff L, Bechmann I, Alvarez-Bolado G, Heimrich B, Monnier PP, Mueller BK, Skutella T. The repulsive guidance molecule *RGMa* is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus. *J Neurosci*. 2004 Apr 14;24(15):3862-9.

Bryson-Richardson RJ, Currie PD. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet*. 2008 Aug;9(8):632-46.

Buchberger A, Ragge K, Arnold HH. The myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor *MEF-2*. *J Biol Chem*. 1994 Jun 24;269(25):17289-96.

Buchberger A, Seidl K, Klein C, Eberhardt H, Arnold HH. *cMeso-1*, a novel bHLH transcription factor, is involved in somite formation in chicken embryos. *Dev Biol*. 1998 Jul 15;199(2):201-15.

Buckingham M, Houzelstein D, Lyons G, Ontell M, Ott MO, Sassoon D. Expression of muscle genes in the mouse embryo. *Symp Soc Exp Biol*. 1992;46:203-17.

Buckingham M, Relaix F. *PAX3* and *PAX7* as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Aug;44:115-25.

Buckingham M, Rigby PW. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev Cell*. 2014 Feb 10;28(3):225-38.

Bulusu V, Prior N, Snaebjornsson MT, Kuehne A, Sonnen KF, Kress J, Stein F, Schultz C, Sauer U, Aulehla A. Spatiotemporal Analysis of a Glycolytic Activity Gradient Linked to Mouse Embryo Mesoderm Development. *Dev Cell*. 2017 Feb 27;40(4):331-341.e4.

Burke AC, Nowicki JL. A new view of patterning domains in the vertebrate mesoderm. *Dev Cell*. 2003 Feb;4(2):159-65. Review.

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010 Jan;9(1):77-93.

Camus LM, Lambert LA. Molecular evolution of hemojuvelin and the repulsive guidance molecule family. *J Mol Evol.* 2007 Jul;65(1):68-81.

Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Nov 1;561:64-73.

Chang TI, Horal M, Jain SK, Wang F, Patel R, Loeken MR. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia.* 2003 Apr;46(4):538-45.

Chen EH, Olson EN. Towards a molecular pathway for myoblast fusion in *Drosophila*. *Trends Cell Biol.* 2004 Aug;14(8):452-60. Review.

Cheng L, Alvares LE, Ahmed MU, El-Hanfy AS, Dietrich S. The epaxial-hypaxial subdivision of the avian somite. *Dev Biol.* 2004 Oct 15;274(2):348-69.

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 1996 Oct 3;383(6599):407-13.

Chilton JK. Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol.* 2006 Apr 1;292(1):13-24.

Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706.

Colak D, Ji SJ, Porse BT, Jaffrey SR. Regulation of axon guidance by compartmentalized nonsense-mediated mRNA decay. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1252-65.

Conrad S, Genth H, Hofmann F, Just I, Skutella T. Neogenin-RGMA signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC. *J Biol Chem.* 2007 Jun 1;282(22):16423-33.

Conrad S, Stimpfle F, Montazeri S, Oldekamp J, Seid K, Alvarez-Bolado G, Skutella T. RGMb controls aggregation and migration of Neogenin-positive cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Neurosci.* 2010 Feb;43(2):222-31.

Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988 Nov 25;16(22):10881-90.

Cossu G, Biressi S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Aug-Oct;16(4-5):623-31. Review.

Cyrino JE, Mulvaney DR. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells--BB line. *Rev Bras Biol.* 1999 Aug;59(3):517-25.

Daoud G, Kempf H, Kumar D, Kozhemyakina E, Holowacz T, Kim DW, Ionescu A, Lassar AB. BMP-mediated induction of GATA4/5/6 blocks somitic responsiveness to SHH. *Development.* 2014 Oct;141(20):3978-87.

Daubas P, Buckingham ME. Direct molecular regulation of the myogenic determination gene *Myf5* by *Pax3*, with modulation by *Six1/4* factors, is exemplified by the -111 kb-*Myf5* enhancer. *Dev Biol.* 2013 Apr 15;376(2):236-44.

Dayanidhi S, Lieber RL. Skeletal muscle satellite cells: mediators of muscle growth during development and implications for developmental disorders. *Muscle Nerve.* 2014 Nov;50(5):723-32.

Degenhardt KR, Milewski RC, Padmanabhan A, Miller M, Singh MK, Lang D, Engleka KA, Wu M, Li J, Zhou D, Antonucci N, Li L, Epstein JA. Distinct enhancers at the *Pax3* locus can function redundantly to regulate neural tube and neural crest expressions. *Dev Biol.* 2010 Mar 15;339(2):519-27.

Denetclaw WF, Ordahl CP. The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. *Development.* 2000 Feb;127(4):893-905.

De Vries M, Cooper HM. Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. *J Neurochem.* 2008 Aug;106(4):1483-92.

Deato MD, Marr MT, Sottero T, Inouye C, Hu P, Tjian R. MyoD targets TAF3/TRF3 to activate myogenin transcription. *Mol Cell.* 2008 Oct 10;32(1):96105.

Delfini MC, De La Celle M, Gros J, Serralbo O, Marics I, Seux M, Scaal M, Marcelle C. The timing of emergence of muscle progenitors is controlled by an FGF/ERK/SNAIL1 pathway. *Dev Biol.* 2009 Sep 15;333(2):229-37.

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. Targeting repulsive guidance molecule A to promote regeneration and neuroprotection in multiple sclerosis. *Cell Rep.* 2015 Mar 24;10(11):1887-98.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003 Oct 9;425(6958):577-84. Review.

- Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol.* 2003 May;5(5):410-21.
- Dietrich S, Schubert FR, Healy C, Sharpe PT, Lumsden A. Specification of the hypaxial musculature. *Development.* 1998 Jun;125(12):2235-49.
- Ding YQ, Yin J, Xu HM, Jacquin MF, Chen ZF. Formation of whisker-related principal sensory nucleus-based lemniscal pathway requires a paired homeodomain transcription factor, *Drg11*. *J Neurosci.* 2003 Aug 13;23(19):7246-54.
- Dubrulle J, McGrew MJ, Pourquié O. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell.* 2001 Jul 27;106(2):219-32.
- El-Ghali N, Rabadi M, Ezin AM, De Bellard ME. New methods for chicken embryo manipulations. *Microsc Res Tech.* 2010 Jan;73(1):58-66.
- Emery, A; EH, FM, Rosaline, CM. *Duchenne muscular dystrophy.* OUP Oxford, 2015.
- Endo M, Yamashita T. Inactivation of Ras by p120GAP via focal adhesion kinase dephosphorylation mediates RGMa-induced growth cone collapse. *J Neurosci.* 2009 May 20;29(20):6649-62.
- Epperlein HH, Vichev K, Heidrich FM, Kurth T. BMP-4 and Noggin signaling modulate dorsal fin and somite development in the axolotl trunk. *Dev Dyn.* 2007 Sep;236(9):2464-74.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002 Dec 12;420(6916):629-35. Review.
- Fan CM, Tessier-Lavigne M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1175-86.
- Faralli H, Dilworth FJ. Turning on myogenin in muscle: a paradigm for understanding mechanisms of tissue-specific gene expression. *Comp Funct Genomics.* 2012;2012:836374.
- Feng X, Adiarte EG, Devoto SH. Hedgehog acts directly on the zebrafish dermomyotome to promote myogenic differentiation. *Dev Biol.* 2006 Dec 15;300(2):736-46.
- Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:659-93. Review.
- Fitzgerald DP, Seaman C, Cooper HM. Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo. *Dev Dyn.* 2006 Jun;235(6):1720-5.

- Foley KS, Young PW. The non-muscle functions of actinins: an update. *Biochem J*. 2014 Apr 1;459(1):1-13.
- Francetic T, Li Q. Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Transcription*. 2011 May;2(3):109-114.
- Fujita Y, Yamashita T. The roles of RGMA-neogenin signaling in inflammation and angiogenesis. *Inflamm Regen*. 2017 Mar 8;37:6.
- Gerhart J, Elder J, Neely C, Schure J, Kvist T, Knudsen K, George-Weinstein M. MyoD-positive epiblast cells regulate skeletal muscle differentiation in the embryo. *J Cell Biol*. 2006 Oct 23;175(2):283-92.
- Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):343-5.
- Giordani J, Bajard L, Demignon J, Daubas P, Buckingham M, Maire P. Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11310-5.
- Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Abu-Elmagd M, Chapnik E, Dalmay T, Hornstein E, Münsterberg A. MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 19;108(29):11936-41.
- Goel AJ, Rieder MK, Arnold HH, Radice GL, Krauss RS. Niche Cadherins Control the Quiescence-to-Activation Transition in Muscle Stem Cells. *Cell Rep*. 2017 Nov 21;21(8):2236-2250.
- Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J*. 1991 May;10(5):1135-47.
- Gros J, Manceau M, Thomè V, Marcelle C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 2005;435:954–8.
- Guasconi V, Puri PL. Chromatin: the interface between extrinsic cues and the epigenetic regulation of muscle regeneration. *Trends Cell Biol*. 2009 Jun;19(6):286-94.
- Gustafsson MK, Pan H, Pinney DF, Liu Y, Lewandowski A, Epstein DJ, Emerson CP Jr. Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev*. 2002 Jan 1;16(1):114-26.
- Halbrooks PJ, Ding R, Wozney JM, Bain G. Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *J Mol Signal*. 2007 Jul 5;2:4.
- Hamburger V; Hamilton H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, v.88, p.49-92, 1951.

- Harada K, Fujita Y, Yamashita T. Repulsive guidance molecule A suppresses angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):993-9.
- Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergermann JH, Hassel S, Henis YI, Knaus P. Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol*. 2006 Oct;26(20):7791-805.
- Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, Doya H, Saito T, Yamagishi S, Mueller BK, Yamashita T. RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J Cell Biol*. 2006 Apr 10;173(1):47-58.
- Hata K, Kaibuchi K, Inagaki S, Yamashita T. Unc5B associates with LARG to mediate the action of repulsive guidance molecule. *J Cell Biol*. 2009 Mar 9;184(5):737-50.
- Healey EG, Bishop B, Elegheert J, Bell CH, Padilla-Parra S, Siebold C. Repulsive guidance molecule is a structural bridge between neogenin and bone morphogenetic protein. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Jun;22(6):458-65.
- Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*. 1996 Aug;6(4):432-8. Review.
- Hollway G, Currie P. Vertebrate myotome development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Sep;75(3):172-9. Review.
- Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell*. 2003 May 16;113(4):483-94.
- Horsley V, Pavlath GK. Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. *Cells Tissues Organs*. 2004;176(1-3):67-78. Review.
- Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2187-91.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26:509-63.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 2006 Oct 1;119(Pt 19):3901-3. Review.
- Hutcheson DA, Zhao J, Merrell A, Haldar M, Kardon G. Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev*. 2009 Apr 15;23(8):997-1013.
- Imbesi R, D'Agata V, Musumeci G, Castrogiovanni P. [Skeletal muscle: from development to function]. *Clin Ter*. 2014;165(1):47-56.
- Ishii Y, Mikawa T. Somatic transgenesis in the avian model system. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Mar;75(1):19-27.

Jorge EC, Ahmed MU, Bothe I, Coutinho LL, Dietrich S. RGMA and RGMb expression pattern during chicken development suggest unexpected roles for these repulsive guidance molecules in notochord formation, somitogenesis, and myogenesis. *Dev Dyn*. 2012 Dec;241(12):1886-900.

Jorge EC, Melo CM, Rosário MF, Rossi JR, Ledur MC, Moura AS, Coutinho LL. Chicken skeletal muscle-associated macroarray for gene Discovery. *Genet Mol Res*. 2010 Feb; 9(1):188-207.

Kablar B, Krastel K, Ying C, Asakura A, Tapscott SJ, Rudnicki MA. MyoD and Myf5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development*. 1997 Dec;124(23):4729-38.

Kahane N, Cinnamon Y, Bachelet I, Kalcheim C. The third wave of myotome colonization by mitotically competent progenitors: regulating the balance between differentiation and proliferation during muscle development. *Development*. 2001 Jun;128(12):2187-98.

Kalcheim C. Epithelial-Mesenchymal Transitions during Neural Crest and Somite Development. *J Clin Med*. 2015 Dec 25;5(1).

Kam JW, Dumontier E, Baim C, Brignall AC, Mendes da Silva D, Cowan M, Kennedy TE, Cloutier JF. RGMB and neogenin control cell differentiation in the developing olfactory epithelium. *Development*. 2016 May 1;143(9):1534-46.

Kang JS, Yi MJ, Zhang W, Feinleib JL, Cole F, Krauss RS. Netrins and neogenin promote myotube formation. *J Cell Biol*. 2004 Nov 8;167(3):493-504.

Kassar-Duchossoy L, Giacone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomès D, Tajbakhsh S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev*. 2005 Jun 15;19(12):1426-31.

Kee N, Wilson N, De Vries M, Bradford D, Key B, Cooper HM. Neogenin and RGMA control neural tube closure and neuroepithelial morphology by regulating cell polarity. *J Neurosci*. 2008 Nov.

Kee N, Wilson N, Key B, Cooper HM. Netrin-1 is required for efficient neural tube closure. *Dev Neurobiol*. 2013 Feb;73(2):176-87.

Kinoshita T. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *J Lipid Res*. 2016 Jan;57(1):4-5.

Klein R. Eph/ephrin signalling during development. *Development*. 2012 Nov;139(22):4105-9.

Klumpp D, Horch RE, Kneser U, Beier JP. Engineering skeletal muscle tissue--new perspectives in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2010 Nov;14(11):2622-9.

Kolodkin AL, Pasterkamp RJ. SnapShot: Axon guidance II. *Cell*. 2013 Apr 25;153(3):722.e1.



Krauss RS, Cole F, Gaio U, Takaesu G, Zhang W, Kang JS. Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J Cell Sci.* 2005 Jun 1;118(Pt 11):2355-62. Review.

Krauss RS, Joseph GA, Goel AJ. Keep Your Friends Close: Cell-Cell Contact and Skeletal Myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Feb 1;9(2). pii:a029298.  
Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell.* 2008 Jan 10;2(1):22-31. Review.

Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med.* 2008 Feb;14(2):82-91

Kubo T, Endo M, Hata K, Taniguchi J, Kitajo K, Tomura S, Yamaguchi A, Mueller BK, Yamashita T. Myosin IIA is required for neurite outgrowth inhibition produced by repulsive guidance molecule. *J Neurochem.* 2008 Apr;105(1):113-26.

Kuninger D, Kuns-Hashimoto R, Kuzmickas R, Rotwein P. Complex biosynthesis of the muscle-enriched iron regulator RGMc. *J Cell Sci.* 2006 Aug 15;119(Pt 16):3273-83.

Kuninger D, Kuns-Hashimoto R, Nili M, Rotwein P. Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. *BMC Biochem.* 2008 Apr 2;9:9.

Kuninger D, Kuzmickas R, Peng B, Pintar JE, Rotwein P. Gene discovery by microarray: identification of novel genes induced during growth factor-mediated muscle cell survival and differentiation. *Genomics.* 2004.

Kuns-Hashimoto R, Kuninger D, Nili M, Rotwein P. Selective binding of RGMc/hemojuvelin, a key protein in systemic iron metabolism, to BMP-2 and neogenin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Apr;294(4):C994-C1003.

Kwee BJ, Mooney DJ. Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2017 Oct;47:16-22.

Lai Wing Sun K, Correia JP, Kennedy TE. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development.* 2011 Jun;138(11):2153-69. Review.

Lazarides E, Burridge K. Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell.* 1975 Nov;6(3):289-98.

L'honoré A, Ouimette JF, Lavertu-Jolin M, Drouin J. Pitx2 defines alternate pathways acting through MyoD during limb and somitic myogenesis. *Development.* 2010 Nov;137(22):3847-56.

Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y, Xi CX, Mei L, Xiong WC. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood.* 2010 Apr 15;115(15):3136-45.

Lee NK, Fok KW, White A, Wilson NH, O'Leary CJ, Cox HL, Michael M, Yap AS, Cooper HM. Neogenin recruitment of the WAVE regulatory complex maintains adherens junction stability and tension. *Nat Commun.* 2016 Mar 31;7:11082.

Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood.* 2005 Oct 15;106(8):2884-9.

Lin L, Nemeth E, Goodnough JB, Thapa DR, Gabayan V, Ganz T. Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. *Blood Cells Mol Dis.* 2008 Jan-Feb;40(1):122-31. Epub 2007 Sep 14.

Lu M, Krauss RS. N-cadherin ligation, but not Sonic hedgehog binding, initiates Cdo-dependent p38alpha/beta MAPK signaling in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 2;107(9):4212-7.

Marcelle C, Stark MR, Bronner-Fraser M. Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development.* 1997 Oct;124(20):3955-63.

Maroto M, Reshef R, Münsterberg AE, Koester S, Goulding M, Lassar AB. Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell.* 1997 Apr 4;89(1):139-48.

Martins AF, Xavier Neto J, Azambuja A, Sereno ML, Figueira A, Campos-Junior PH, Rosário MF, Toledo CB, Silva GA, Kitten GT, Coutinho LL, Dietrich S, Jorge EC. Repulsive Guidance Molecules a, b and c Are Skeletal Muscle Proteins, and Repulsive Guidance Molecule a Promotes Cellular Hypertrophy and Is Necessary for Myotube Fusion. *Cells Tissues Organs.* 2014;200(5):326-38. doi: 10.1159/000433491. Epub 2015 Sep 24.

Masaki T, Endo M, Ebashi S. Localization of 6S component of alpha-actinin at Z-band. *J Biochem.* 1967 Nov;62(5):630-2.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000 Mar 15;14(6):627-44. Review.

Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Oct;13(10):616-30.

Matsunaga E, Nakamura H, Chédotal A. Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. *J Neurosci.* 2006 May 31;26(22):6082-8.

Matsunaga E, Tauszig-Delamasure S, Monnier PP, Mueller BK, Strittmatter SM, Mehlen P, Chédotal A. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat Cell Biol.* 2004 Aug;6(8):749-55.

Mawdsley DJ, Cooper HM, Hogan BM, Cody SH, Lieschke GJ, Heath JK. The Netrin receptor Neogenin is required for neural tube formation and somitogenesis in zebrafish. *Dev Biol.* 2004 May 1;269(1):302-15.

- Merz DC, Zheng H, Killeen MT, Krizus A, Culotti JG. Multiple signaling mechanisms of the UNC-6/netrin receptors UNC-5 and UNC-40/DCC in vivo. *Genetics*. 2001 Jul;158(3):1071-80.
- Mirakaj V, Brown S, Laucher S, Steinl C, Klein G, Köhler D, Skutella T, Meisel C, Brommer B, Rosenberger P, Schwab JM. Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr 19;108(16):6555-60.
- Mitchell KJ, Pannérec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, Marazzi G, Sassoon DA. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):257-66.
- Moncaut N, Rigby PW, Carvajal JJ. Dial M(RF) for myogenesis. *FEBS J*. 2013 Sep;280(17):3980-90.
- Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature*. 2002 Sep 26;419(6905):392-5.
- Monsoro-Burq AH. Sclerotome development and morphogenesis: when experimental embryology meets genetics. *Int J Dev Biol*. 2005;49(2-3):301-8. Review.
- Mueller BK, Yamashita T, Schaffar G, Mueller R. The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Sep 29;361(1473):1513-29. Review.
- Mueller BK. Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:351-88. Review.
- Mueller TD. RGM co-receptors add complexity to BMP signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 Jun;22(6):439-40.
- Müller T, Trommer I, Muhlack S, Mueller BK. Levodopa increases oxidative stress and repulsive guidance molecule A levels: a pilot study in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2016 Apr;123(4):401-6.
- Münsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev*. 1995 Dec 1;9(23):2911-22.
- Münsterberg AE, Lassar AB. Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Development*. 1995 Mar;121(3):651-60.
- Muramatsu R, Kubo T, Mori M, Nakamura Y, Fujita Y, Akutsu T, Okuno T, Taniguchi J, Kumanogoh A, Yoshida M, Mochizuki H, Kuwabara S, Yamashita T. RGMA modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2011 Apr;17(4):488-94.

Musumeci G, Castrogiovanni P, Coleman R, Szychlinska MA, Salvatorelli L, Parenti R, Magro G, Imbesi R. Somitogenesis: From somite to skeletal muscle. *Acta Histochem.* 2015 May-Jun;117(4-5):313-28. Review.

Musumeci G, Trovato FM, Avola R, Imbesi R, Castrogiovanni P. Serotonin/growth hormone/insulin-like growth factors axis on pre- and post-natal development. A contemporary review. *OA Anat* 2013;1:12.

Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Mueller TD. Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Oct-Dec;20(5-6):367-77.

Nicol X, Hong KP, Spitzer NC. Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 16;108(33):13776-81.

Nie X, Chen W, Zhu Y, Huang B, Yu W, Wu Z, Guo S, Zhu Y, Luo L, Wang S, Chen L. B7-DC (PD-L2) costimulation of CD4(+) T-helper 1 response via RGMb. *Cell Mol Immunol.* 2017 May 8.

Niederkofler V, Salie R, Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):2180-6.

Niederkofler V, Salie R, Sigrist M, Arber S. Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. *J Neurosci.* 2004 Jan 28;24(4):808-18.

Nili M, David L, Elferich J, Shinde U, Rotwein P. Proteomic analysis and molecular modelling characterize the iron-regulatory protein haemojuvelin/repulsive guidance molecule c. *Biochem J.* 2013 May 15;452(1):87-95.

Nohra R, Beyeen AD, Guo JP, Khademi M, Sundqvist E, Hedreul MT, Sellebjerg F, Smestad C, Oturai AB, Harbo HF, Wallström E, Hillert J, Alfredsson L, Kockum I, Jagodic M, Lorentzen J, Olsson T. RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis. *Genes Immun.* 2010 Jun;11(4):279-93.

Okamura Y, Kohmura E, Yamashita T. TACE cleaves neogenin to desensitize cortical neurons to the repulsive guidance molecule. *Neurosci Res.* 2011 Sep;71(1):63-70.

Oldekamp J, Krämer N, Alvarez-Bolado G, Skutella T. Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. *Gene Expr Patterns.* 2004 May;4(3):283-8.

Olivera-Martinez I, Coltey M, Dhouailly D, Pourquié O. Mediolateral somatic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras. *Development.* 2000 Nov;127(21):4611-7.

Ordahl CP, Berdugo E, Venters SJ, Denetclaw WF Jr. The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium. *Development.* 2001 May;128(10):1731-44.

Oustanina S, Hause G, Braun T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 2004 Aug 18;23(16):3430-9.

Palmeirim I, Rodrigues S, Dale JK, Maroto M. Development on time. *Adv Exp Med Biol.* 2008;641:62-71. Review.

Pani L, Horal M, Loeken MR. Rescue of neural tube defects in Pax-3 deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3- dependent development and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2002 Mar 15;16(6):676-80.

Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2004 Jan;36(1):77-82.

Pasterkamp RJ, Kolodkin AL. SnapShot: Axon Guidance. *Cell.* 2013 Apr 11;153(2):494, 494e1-2.

Pasterkamp RJ. Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat Rev Neurosci.* 2012 Sep;13(9):605-18.

Pfaffl M., Lange I., Meyer HH. The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: Quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$  and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCR. *Proc 15th Int Symp J Steroid Biochem Mol Biol - Poster Present.* 2003 Feb;84(2-3):159-66.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST<sup>®</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e36-e36.

Patterson SE, Bird NC, Devoto SH. BMP regulation of myogenesis in zebrafish. *Dev Dyn.* 2010 Mar;239(3):806-17.

Phelan SA, Ito M, Loeken MR. Neural tube defects in embryos of diabetic mice: role of the Pax-3 gene and apoptosis.

Pietrangelo A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology.* 2007 Oct;46(4):1291-301. Review.

Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:747-83.

Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol.* 2004 Aug;6(8):756-62.

Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 2005 Jun 16;435(7044):948-53.

Reshef R, Maroto M, Lassar AB. Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *Genes Dev*. 1998 Feb 1;12(3):290-303.

Ribeiro Ede A Jr, Pinotsis N, Ghisleni A, Salmazo A, Konarev PV, Kostan J, Sjöblom B, Schreiner C, Polyansky AA, Gkoukoulia EA, Holt MR, Aachmann FL, Zagrović B, Bordignon E, Pirker KF, Svergun DI, Gautel M, Djinović Carugo K. The structure and regulation of human muscle  $\alpha$ -actinin. *Cell*. 2014 Dec 4;159(6):1447-60.

Ridgeway AG, Skerjanc IS. Pax3 is essential for skeletal myogenesis and the expression of Six1 and Eya2. *J Biol Chem*. 2001 Jun 1;276(22):19033-9.

Rodriguez A, Pan P, Parkkila S. Expression studies of neogenin and its ligand hemojuvelin in mouse tissues. *J Histochem Cytochem*. 2007 Jan;55(1):85-96.

Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanlou AH, Attisano L, Woolf CJ. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):14122-9.

Samad TA, Srinivasan A, Karchewski LA, Jeong SJ, Campagna JA, Ji RR, Fabrizio DA, Zhang Y, Lin HY, Bell E, Woolf CJ. DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. *J Neurosci*. 2004 Feb 25;24(8):2027-36.

Sartori R, Sandri M. Bone and morphogenetic protein signalling and muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015.

Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, Stantzou A, Mouisel E, Toniolo L, Ferry A, Stricker S, Goldberg AL, Dupont S, Piccolo S, Amthor H, Sandri M. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1309-18.

Schmidtmer J, Engelkamp D. Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. *Gene Expr Patterns*. 2003 Jan;4(1):105-10.

Sauka-Spengler T, Barembaum M. Gain- and loss-of-function approaches in the chick embryo. *Methods Cell Biol*. 2008;87:237-56.

Schnichels S, Conrad S, Warstat K, Henke-Fahle S, Skutella T, Schraermeyer U, Julien S. Gene expression of the repulsive guidance molecules/neogenin in the developing and mature mouse visual system: C57BL/6J vs. the glaucoma model DBA/2J. *Gene Expr Patterns*. 2007 Dec;8(1):1-11.

Schubert FR, Tremblay P, Mansouri A, Faisst AM, Kammandel B, Lumsden A, Gruss P, Dietrich S. Early mesodermal phenotypes in splotch suggest a role for Pax3 in the formation of epithelial somites. *Dev Dyn*. 2001 Nov;222(3):506-21.

Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, Robinson H, Salvesen GS, Schwarzenbacher R, Riedl SJ. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature*. 2009 Feb 19;457(7232):1019-22.

Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000 Sep 15;102(6):777-86.

Severyn CJ, Shinde U, Rotwein P. Molecular biology, genetics and biochemistry of the repulsive guidance molecule family. *Biochem J*. 2009 Aug 27;422(3):393-403. Review.

Shearman RM, Burke AC. The lateral somitic frontier in ontogeny and phylogeny. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Sep 15;312(6):603-12.

Schwab JM, Conrad S, Monnier PP, Julien S, Mueller BK, Schluesener HJ. Spinal cord injury-induced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM). *Eur J Neurosci*. 2005 Mar;21(6):1569-76.

Siebold C, Yamashita T, Monnier PP, Mueller BK, Pasterkamp RJ. RGMs: Structural Insights, Molecular Regulation, and Downstream Signaling. *Trends Cell Biol*. 2017 May;27(5):365-378.

Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):924-31. Epub 2007 Oct 15.

Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*. 2008 Dec;8(6):502-11.

Sjöblom B, Salmazo A, Djinović-Carugo K. Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Sep;65(17):2688-701.

Smith CA, Tuan RS. Functional involvement of Pax1 in somite development: somite dysmorphogenesis in chick embryos treated with Pax1 paired-box antisense oligodeoxynucleotide. *Teratology*. 1995 Dec;52(6):333-45.

Spence MS, Yip J, Erickson CA. The dorsal neural tube organizes the dermamyotome and induces axial myocytes in the avian embryo. *Development*. 1996 Jan;122(1):231-41.

Sutherland DJ, Goodhill GJ. The interdependent roles of Ca(2+) and cAMP in axon guidance. *Dev Neurobiol*. 2013 Nov;75(4):402-10.

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell*. 1997 Apr 4;89(1):127-38.

Tamariz E, Varela-Echavarría A. The discovery of the growth cone and its influence on the study of axon guidance. *Front Neuroanat*. 2015 May 15;9:51. Review.

Tanabe S, Yamashita T. Repulsive guidance molecule-a is involved in Th17-cell-induced neurodegeneration in autoimmune encephalomyelitis. *Cell Rep.* 2014 Nov 20;9(4):1459-70.

Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development.* 2005 Jun;132(12):2685-95.

Tassew NG, Charish J, Chestopalova L, Monnier PP. 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.* 2009 Jan 28;29(4):1126-31.

Tassew NG, Charish J, Seidah NG, Monnier PP. SKI-1 and Furin generate multiple RGMa fragments that regulate axonal growth. *Dev Cell.* 2012 Feb 14;22(2):391-402.

Tassew NG, Mothe AJ, Shabanzadeh AP, Banerjee P, Koeberle PD, Bremner R, Tator CH, Monnier PP. Modifying lipid rafts promotes regeneration and functional recovery. *Cell Rep.* 2014 Aug 21;8(4):1146-59.

Tessier SN, Storey KB. Lessons from mammalian hibernators: molecular insights into striated muscle plasticity and remodeling. *Biomol Concepts.* 2016 May 1;7(2):69-92.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 1996 Nov 15;274(5290):1123-33. Review.

Thorsteinsdóttir S, Deries M, Cachação AS, Bajanca F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2011 Jun 15;354(2):191-207.

Tian C, Liu J. Repulsive guidance molecules (RGMs) and neogenin in bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *Mol Reprod Dev.* 2013 Sep;80(9):700-17.

Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol.* 2011 Oct;1(4):2029-62.

Torti SV, Lemler E, Mueller BK, Popp A, Torti FM. Effects of Anti-repulsive Guidance Molecule C (RGMc/Hemojuvelin) Antibody on Heparin and Iron in Mouse Liver and Tumor Xenografts. *Clin Exp Pharmacol.* 2016 Nov;6(6).

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015 Apr 13;27(4):450-61.

Tremblay P, Pituello F, Gruss P. Inhibition of floor plate differentiation by Pax3: evidence from ectopic expression in transgenic mice. *Development.* 1996 Aug;122(8):2555-67.

Van Battum EY, Brignani S, Pasterkamp RJ. Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2015 May;14(5):532-46.

van Erp S, van den Heuvel DM, Fujita Y, Robinson RA, Hellemons AJ, Adolfs Y, Van Battum EY, Blokhuis AM, Kuijpers M, Demmers JA, Hedman H, Hoogenraad CC,



Siebold C, Yamashita T, Pasterkamp RJ. Lrig2 Negatively Regulates Ectodomain Shedding of Axon Guidance Receptors by ADAM Proteases. *Dev Cell*. 2015.

Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein WH. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol*. 1995 Feb;128(4):563-76.

Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ. Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2009-20.

Wang X, Cheng JL, Ran YC, Zhang Y, Yang L, Lin YN. Expression of RGMb in brain tissue of MCAO rats and its relationship with axonal regeneration. *J Neurol Sci*. 2017 Dec 15;383:79-86.

Wang Y, Jaenisch R. Myogenin can substitute for Myf5 in promoting myogenesis but less efficiently. *Development*. 1997 Jul;124(13):2507-13.

Wang Y, Zhang R, Xing X, Guo J, Xie F, Zhang G, Qin X. Repulsive guidance molecule a suppresses angiogenesis after ischemia/reperfusion injury of middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Lett*. 2018 Jan 1;662:318-323.

Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*. 1991 Feb 15;251(4995):761-6. Review.

Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013 Jan-Feb;2(1):47-63.

White RB, Biérinx AS, Gnocchi VF, Zammit PS. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev Biol*. 2010 Feb 22;10:21.

Wilson NH, Key B. Neogenin interacts with RGMa and netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain. *Dev Biol*. 2006 Aug 15;296(2):485-98.

Wojnacki J, Quassollo G, Marzolo MP, Cáceres A. Rho GTPases at the crossroad of signaling networks in mammals: impact of Rho-GTPases on microtubule organization and dynamics. *Small GTPases*. 2014;5:e28430.

Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*. 1989 Feb 24;56(4):607-17.

Wu Q, Sun CC, Lin HY, Babitt JL. Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). *PLoS One*. 2012;7(9):e46307.

Xia Y, Yu PB, Sidis Y, Beppu H, Bloch KD, Schneyer AL, Lin HY. Repulsive guidance molecule RGMa alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. *J Biol Chem*. 2007 Jun 22;282(25):18129-40.

Xiao Y, Yu S, Zhu B, Bedoret D, Bu X, Francisco LM, Hua P, Duke-Cohan JS, Umetsu DT, Sharpe AH, DeKruyff RH, Freeman GJ. RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med*. 2014 May 5;211(5):943-59.

Xu X, Gao Y, Shan F, Feng J. A novel role for RGMa in modulation of bone marrow-derived dendritic cells maturation induced by lipopolysaccharide. *Int Immunopharmacol*. 2016 Apr;33:99-107.

Yang F, West AP Jr, Allendorph GP, Choe S, Bjorkman PJ. Neogenin interacts with hemojuvelin through its two membrane-proximal fibronectin type III domains. *Biochemistry*. 2008 Apr 8;47(14):4237-45.

Ypsilanti AR, Zagar Y, Chédotal A. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development*. 2010 Jun;137(12):1939-52.

Yu S, Jeung K, Kim H, Xiao Y, Albacker AL, Lee H, Umetsu DT, Freeman GJ, Dekruff RH. Blockade of the Neogenin-RGMb-BMP signaling hub inhibits allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol*. 2016 May;196(1):192-12;

Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Dec;72:19-32.

Zeng L, Kempf H, Murtaugh LC, Sato ME, Lassar AB. Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes Dev*. 2002 Aug 1;16(15):1990-2005.

Zhang AS, Anderson SA, Meyers KR, Hernandez C, Eisenstein RS, Enns CA. Evidence that inhibition of hemojuvelin shedding in response to iron is mediated through neogenin. *J Biol Chem*. 2007 Apr 27;282(17):12547-56.

Zhang AS, Yang F, Wang J, Tsukamoto H, Enns CA. Hemojuvelin-neogenin interaction is required for bone morphogenic protein-4-induced hepcidina expression. *J Biol Chem*. 2009 Aug 21;284(34):22580-9.

Zhang G, Wang R, Cheng K, Li Q, Wang Y, Zhang R, Qin X. Repulsive Guidance Molecule a Inhibits Angiogenesis by Downregulating VEGF and Phosphorylated Focal Adhesion Kinase In Vitro. *Front Neurol*. 2017 Sep 26;8:504.

Zhang Y, Duan X, Cao R, Liu HL, Cui XS, Kim NH, Rui R, Sun SC. Small GTPase RhoA regulates cytoskeleton dynamics during porcine oocyte maturation and early embryo development. *Cell Cycle*. 2014;13(21):3390-403.

Zhou Z, Xie J, Lee D, Liu Y, Jung J, Zhou L, Xiong S, Mei L, Xiong WC. Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. *Dev Cell*. 2010 Jul 20;19(1):90-102.

## **ANEXO 1. Protocolo do Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA-UFMG) aprovando os procedimentos com animais utilizados no presente trabalho.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** [270/2017](#)

**Título do projeto:** Análise dos efeitos da superexpressão de uma isoforma da Molécula Orientadora por Repulsão a (RGMa1) em células de somitos de embriões de galinha

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Erika Cristina Jorge

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Morfologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 23/10/2017. Validade: 23/10/2017 à 22/10/2022  
Belo Horizonte, 24/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@proq.ufmg.br](mailto:cetea@proq.ufmg.br)