

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Christhiam Douglas Caetano Ribeiro

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E POSSÍVEIS FUNÇÕES  
BIOLÓGICAS DE RGMA EM CÉLULAS SATÉLITES CULTIVADAS *IN VITRO***

Belo Horizonte

2023

Christhiam Douglas Caetano Ribeiro

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E POSSÍVEIS FUNÇÕES  
BIOLÓGICAS DE RGMA EM CÉLULAS SATÉLITES CULTIVADAS *IN VITRO***

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

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientador: Profa. Dra. Erika Cristina Jorge

Belo Horizonte

2023

043

Ribeiro, Christhiam Douglas Caetano.

Avaliação do perfil de expressão e possíveis funções biológicas de RGMA em células satélites cultivadas in vitro [manuscrito] / Christhiam Douglas Caetano Ribeiro. – 2023.

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

Orientador: Profa. Dra. Erika Cristina Jorge.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Orientação de Axônios. 3. Células Satélites de Músculo Esquelético. I. Jorge, Erika Cristina. II. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CHRISTHIAM DOUGLAS CAETANO RIBEIRO

Às **quatorze horas** do dia **27 de setembro de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO E POSSÍVEIS FUNÇÕES BIOLÓGICAS DE RGMA NAS CÉLULAS SATÉLITES CULTIVADAS IN VITRO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Erika Cristina Jorge**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq.                                     | Instituição | Indicação |
|---|-------------|-----------|
| Dra. Erika Cristina Jorge                       | UFMG        | Aprovado  |
| Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida | UFMG        | Aprovado  |
| Dr. Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior     | UFSJ        | Aprovado  |

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de setembro de 2023.**

Dr<sup>a</sup>. Erika Cristina Jorge (Orientadora) \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida \_\_\_\_\_

Dr. Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior \_\_\_\_\_



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 19/10/2023, às 13:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique de Almeida Campos Junior, Usuário Externo**, em 19/10/2023, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Coordenador(a)**, em 20/10/2023, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 25/10/2023, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2728842** e o código CRC **DA033AFD**.

*Dedico esta dissertação à instituição, que aprendi a admirar imensamente, tanto pela metodologia, quanto pelas pessoas incríveis que fizeram parte dessa trajetória.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que colocou oportunidades no meu caminho, me deu força de vontade para superar todos os desafios.

A minha família, principalmente aos meus pais Janice D Lourdes Caetano e Geraldo Sérgio Ribeiro Santos, por todo o apoio, paciência e compreensão.

Agradeço também a minha orientadora Prof. Dra. Erika Jorge por ter me aceito no seu grupo de pesquisa, e ter contribuído significativamente para minha formação pessoal e acadêmica.

A professora Dra. Gerluza Borges, por todos os apontamentos e ensinamentos passados.

Aos professores da minha banca de defesa, Profa. Dra. Fernanda Radicchi e Prof. Dr. Paulo Henrique, que através dos apontamentos, contribuíram para a melhoria deste trabalho.

A todos os colaboradores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em especial a equipe do Biotério do Departamento de Morfologia, pela paciência e apoio durante a execução deste trabalho.

Aos meus colegas Dra. Aline Gonçalves Copola e Dra. Júlia Meirelles por todos os ensinamentos passados e por estarem sempre prontas para me ajudar quando precisei.

A toda a equipe do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (LABODE) por todo o suporte e aprendizado durante os experimentos.

Agradeço também a Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular pela oportunidade de ingresso e de concretizar um grande sonho na conclusão dessa etapa importante da minha carreira.

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”*

(PAULO FREIRE, 1992)



## RESUMO

RGMa é um membro da família de moléculas orientadores repulsivas, que foi originalmente descrito como pistas para a orientação de axônios em formação. Novos estudos apontaram RGMa também no desenvolvimento, manutenção e crescimento da musculatura esquelética. Transcritos dessa molécula foram detectados em células pioneiras, desde os somitos até a célula adulta, onde RGMa foi detectado no sarcolema e com padrão estriado no sarcoplasma, semelhante as proteínas sarcoméricas. A super-expressão de RGMa em células musculares adultas, da linhagem C2C12, induziu a formação de células hipertróficas e hiperplásicas em comparação ao *knockdown* de RGMa, que resultou no fenótipo oposto. Diante desses achados, esse trabalho objetivou investigar a possível associação de RGMa com as células satélites, avaliando (i) o padrão de expressão deste orientador de axônio nas células satélites isoladas de camundongos e cultivadas *in vitro* e (ii) o seu papel durante as fases de proliferação e diferenciação celular. Células satélites foram isoladas a partir de miofibras digeridas do músculo EDL, de camundongos da linhagem C57BL/6. O padrão de expressão foi determinado por imunofluorescência das células, durante os estágios de proliferação e diferenciação. O *knockdown* de RGMa nessas células foi induzido pelo método de RNA de interferência, e os efeitos avaliados sobre a viabilidade e proliferação das células satélites. O padrão de expressão revelou a presença de RGMa predominantemente no núcleo das células satélites, tanto nos estágios de proliferação, quanto na diferenciação. O *knockdown* de RGMa nessas células induziu a diminuição da viabilidade celular, e da capacidade proliferativa dessas células em cultura, sempre comparado ao grupo controle. Juntos, nossos resultados revelaram que, RGMa está presente no núcleo da célula satélite, onde possivelmente desempenha funções associadas à viabilidade e proliferação das células satélites. Portanto, este estudo contribuiu para revelar um novo fator, associado à proliferação das células-tronco musculares adultas, que poderá ser utilizado como alvo terapêutico no tratamento de miopatias musculares; ou para a seleção de animais para a maior produção de carne.

**Palavras-chave:** Moléculas Orientadoras Repulsivas; Células Satélite; Células-tronco; RGMa.

## ABSTRACT

RGMa is a member of the family of repulsive guidance molecules, which were originally described as cues for the guidance of forming axons. New studies also point to RGMa in the development, maintenance and growth of skeletal muscles. Transcripts of this molecule were detected in pioneer cells, from the somites to the adult cell, where RGMa was detected in the sarcolemma and with a striated pattern in the sarcoplasm, similar to sarcomeric proteins. Overexpression of RGMa in adult muscle cells, of the C2C12 lineage, induced the formation of hypertrophic and hyperplastic cells compared to RGMa knockdown, which resulted in the opposite phenotype. In view of these findings, this work aimed to investigate the possible association of RGMa with satellite cells, evaluating (i) the expression pattern of this axon guide in satellite cells isolated from mice and cultured in vitro and (ii) its role during the phases of cell proliferation and differentiation. Satellite cells were isolated from digested myofibers of the EDL muscle of C57BL/6 mice. The expression pattern was determined by immunofluorescence of the cells, during the proliferation and differentiation stages. RGMa knockdown in these cells was induced by the RNA interference method, and the effects were assessed on satellite cell viability and proliferation. The expression pattern revealed the presence of RGMa predominantly in the nucleus of satellite cells, both in the proliferation and differentiation stages. The knockdown of RGMa in these cells induced a decrease in cell viability and the proliferative capacity of these cells in culture, always compared to the control group. Together, our results revealed that, RGMa is present in the satellite cell nucleus, where it possibly performs functions associated with satellite cell viability and proliferation. Therefore, this study contributed to revealing a new factor, associated with the proliferation of adult muscle stem cells, which could be used as a therapeutic target in the treatment of muscular myopathies; or for the selection of animals for greater meat production.

**Keywords:** Repulsive Guiding Molecules; Satellite Cells; Stem cells; RGMa.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Programa miogênico e perfil de expressão dos marcadores miogênicos que regulam os processos de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites. ....                               | 18 |
| Figura 2. Em (A) estrutura proteica dos RGMs, e (B) seu receptor de Neogenina....   | 19 |
| Figura 3. RGMa e RGMb são expressos durante o desenvolvimento, manutenção e crescimento da musculatura estriada esquelética.....  | 23 |
| Figura 4. Imunolocalização de RGMa, RGMb e RGMc no tecido muscular esquelético de camundongos adultos .....   | 25 |
| Figura 5. Manipulação da expressão de RGMa em células musculares da linhagem C2C12 e em células primárias. ....   | 26 |
| Figura 6. Representação esquemática das influências das células imunes na ativação das células satélites e regeneração do músculo esquelético.....  | 28 |
| Figura 7. Esquema representativo do protocolo adaptado de Rosenblatt (1995), que foi utilizado neste trabalho para o isolamento das células satélites. ....   | 34 |
| Figura 8. Imagens do procedimento cirúrgico destacando a extração do músculo EDL (extensor digitorum longus) dos animais. ....  | 34 |
| Figura 9. Padrão do cultivo das células satélites em cultura em meio de crescimento. Ativação, adesão e proliferação das células satélites após 4, 6, 9 e 14 dias de cultivo em meio de crescimento. .... | 35 |
| Figura 10. Desenho experimental do plaqueamento, e imunofluorescência das células em meio de crescimento (MC) e meio de diferenciação (MD).....   | 36 |
| Figura 11. Representação da sequência do RNA mensageiro de RGMa e os sítios de similaridade com os cinco RNAs de interferência (siRNA-RGMa) presentes no mesmo produto. ....                              | 38 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 12. Componentes do Kit de transfecção e o protocolo do reagente Lipofectamine™ Stem Transfection Reagent (Invitrogen).....                                   | 38 |
| Figura 13. Padrão de expressão de RGMa ao longo de 10 dias de cultivo em meio de crescimento. Aumento de 40x. ....  | 44 |
| Figura 14. Padrão de expressão de RGMa em células satélites cultivadas em meio de diferenciação. Aumento de 40x. ....   | 45 |
| Figura 15. Análise da expressão relativa de transcritos de RGMa nas células satélites após o knockdown com siRNA-RGMa, comparado ao controle, obtidas por PCRq..... | 46 |
| Figura 16. Resultado do ensaio de MTT após a transfecção de células satélites com siRNA-RGMa e siRNA-CTRL. ....   | 47 |
| Figura 17. Expressão relativa de RGMa, Ki67 e PCNA em células satélites tratadas com siRNA-CTRL x siRNA-RGMa. ....  | 48 |
| Figura 18. Análise do número de núcleos Ki67-positivos nas células satélites após o knockdown com siRNA-RGMa. ....  | 49 |
| Figura 19. Padrão de expressão de ki67 nas células satélites, após o knockdown com siRNA-RGMa.....  | 50 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Sequências, temperatura de anelamento e amplicon esperado dos primers utilizados neste estudo. .... | 41 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius

AntiRGMa: Anticorpo para Molécula Orientadora por Repulsão ``A``

C2C12: Linhagem de células musculares adultas.

C57BL/6: Linhagem de Camundongos.

cDNA: DNA complementar

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio de cultura utilizado para cultivo celular)

EDL: Músculo extensor longo dos dedos

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

IGF: Fator de Crescimento de Insulina

LIF: Fator Inibidor de Leucemia

M.C: Meio de crescimento

M.D: Meio de diferenciação

Min: Minutos

mL: mililitros

MTT: Teste para medir atividade metabólica, viabilidade e proliferação celular.

nM: nanômetros

Nockdown: Bloqueio temporário da proteína na célula.

O/V: Overnight (durante a noite)

Pb: pares de bases

PBS: tampão fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear da célula em proliferação

PM: Programa Miogênico

RGMa : Molécula Orientadora por Repulsão ``A``

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAi: Ácido Ribonucleico de interferência

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

Seg: segundos

siCtrl: Silenciador Controle

siRGM: Silenciador de Molécula Orientadora por Repulsão

Ta: Temperatura

µg: micrograma

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>17</b> |
| 1.1 Programa Miogênico (PM).....  | 17        |
| 1.2 Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGM) .....   | 18        |
| 1.3 Molécula Orientadora por Repulsão do tipo A (RGMa) .....  | 20        |
| 1.4 Sinalização de RGMa .....   | 21        |
| 1.5 RGMa no Desenvolvimento da musculatura esquelética. ....  | 22        |
| 1.6 RGMs na Musculatura Esquelética e sua associação com as Células Satélites .....   | 23        |
| 1.6 As Células Satélites e sua importância no crescimento e regeneração da musculatura esquelética.....                             | 27        |
| 1.7 Plasticidade das Células Satélites .....  | 30        |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>32</b> |
| 2.1 Objetivos específicos: .....  | 32        |
| <b>3. METODOLOGIA</b> .....   | <b>33</b> |
| 3.1 Animais.....  | 33        |
| 3.2 Isolamento das células satélites.....   | 33        |
| 3.3 Padrão de expressão de RGMa nas células satélites em cultura.....   | 35        |
| 3.4 <i>Knockdown</i> de RGMa nas células satélites .....  | 37        |
| 3.5 Avaliação dos efeitos do <i>knockdown</i> de RGMa na proliferação celular .....   | 38        |
| 3.5.1 Ensaio de MTT para a determinação da viabilidade celular após transfecção .....   | 39        |
| 3.5.2 RT-PCRq .....   | 39        |
| Extração do RNA total .....   | 39        |
| Síntese de cDNA (DNA complementar).....   | 40        |
| Reações da RT-PCRq e Primers.....   | 41        |
| Análise Estatística .....   | 42        |
| 3.5.3 Imunofluorescência para o marcador de proliferação ki67 e contagem dos núcleos .....  | 43        |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....  | <b>43</b> |
| 4.1 Imunolocalização de RGMa nas células satélites durante os estágios de proliferação e diferenciação. ....                        | 43        |
| 4.2 <i>knockdown</i> de RGMa nas células satélites .....  | 45        |
| 4.3 Avaliação dos efeitos do <i>knockdown</i> de RGMa.....  | 46        |
| 4.3.1 Avaliação dos efeitos do <i>knockdown</i> de RGMa sobre a viabilidade das células satélites. ....                             | 46        |
| 4.3.2 Avaliação dos efeitos do <i>knockdown</i> de RGMa sobre a expressão de genes associados à proliferação celular, por PCRq..... | 47        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.3 Avaliação dos efeitos do <i>knockdown</i> de <i>RGMa</i> sobre a expressão do marcador de proliferação celular Ki67 ..... | 48        |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>50</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>   | <b>55</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>56</b> |



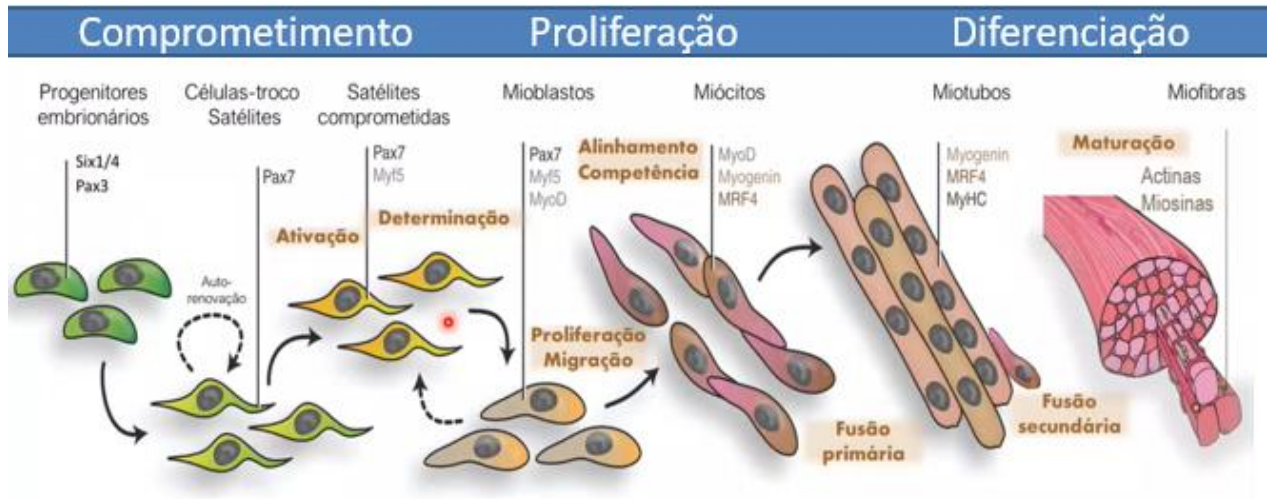
## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1 Programa Miogênico (PM)

O programa miogênico (PM) corresponde a uma sucessão de inúmeros e complexos eventos moleculares e celulares, que levam uma célula indiferenciada a se transformar em uma fibra muscular multinucleada, com função contrátil. Nas fases embrionárias, o PM ocorre em um conjunto de células de mesoderma paraxial presente nos somitos, que são inicialmente induzidas a se transformar em mioblastos (revisado por Tajbakhsh, 2009). Estes mioblastos recebem então um sinal indutor da proliferação celular, para que um número ideal de células seja produzido, suficiente para formar o músculo primário. A retirada do sinal mitogênico promove uma alteração na forma dos mioblastos, que se tornam alongados, fundem-se uns aos outros pelas extremidades das células, formando assim a fibra muscular madura multinucleada. Várias ondas de PM ocorrem para garantir a formação da massa muscular fetal (Tajbakhsh, 2009). Durante a miogênese, as células precursoras miogênicas expressam Pax3 e Pax7, que são fatores de transcrição que desempenham um papel crucial na determinação do destino dessas células. Além disso, Pax7 é um fator de transcrição expresso nas células satélites em estado de quiescência. Os mioblastos proliferam, saem do ciclo celular, expressam miogenina e MRF4, que regulam a fusão e a diferenciação da fibra muscular. MyoD é um dos MRFs que é expresso em células embrionárias com potencial para diferenciação em células musculares (Fig.1).

O mesmo PM é re-ativado após o nascimento, quando o indivíduo precisa passar pela fase de crescimento até a puberdade, fazer exercícios físicos, receber estímulos hormonais, ou durante a regeneração de um músculo lesionado, por exemplo (Yin et al., 2013). Nestes casos, apenas um grupo particular e muito restrito de células presentes no tecido muscular adulto consegue ativar o PM: as células satélites (CS), as células-tronco do tecido muscular adulto. Estas células permanecem quiescentes na musculatura adulta até que sinais de crescimento ou pró-inflamatórios induzam estas células a se transformarem em mioblastos novos, que seguem, nos adultos, os mesmos passos das células mesodérmicas embrionárias, até a formação de novas fibras maduras (Yin et al., 2013). Portanto, no caso particular da musculatura esquelética, compreender quais são os mecanismos moleculares e celulares que ocorrem nas fases embrionárias e/ou os mecanismos de crescimento e regeneração a partir de células satélites, poderá revelar os alvos para o desenvolvimento de

terapias gênicas ou celulares, na tentativa de aumentar o tamanho das fibras musculares, a força e a massa muscular de pacientes com distrofias e atrofia muscular.



**Figura 1.** Programa miogênico e perfil de expressão dos marcadores miogênicos que regulam os processos de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites. Six1/4 e Pax3, marcadores presentes nas células progenitoras, antes da especificação. Pax7, marcador durante a especificação, e também presente nas células satélites quiescentes. Nessa fase, as células progenitoras se transformam em mioblastos, que são células comprometidas com a linhagem muscular. Myf5, MyoD, MyoG e Mrf4: Marcadores associados à determinação e diferenciação. Retirado de Krauss et al., 2017.

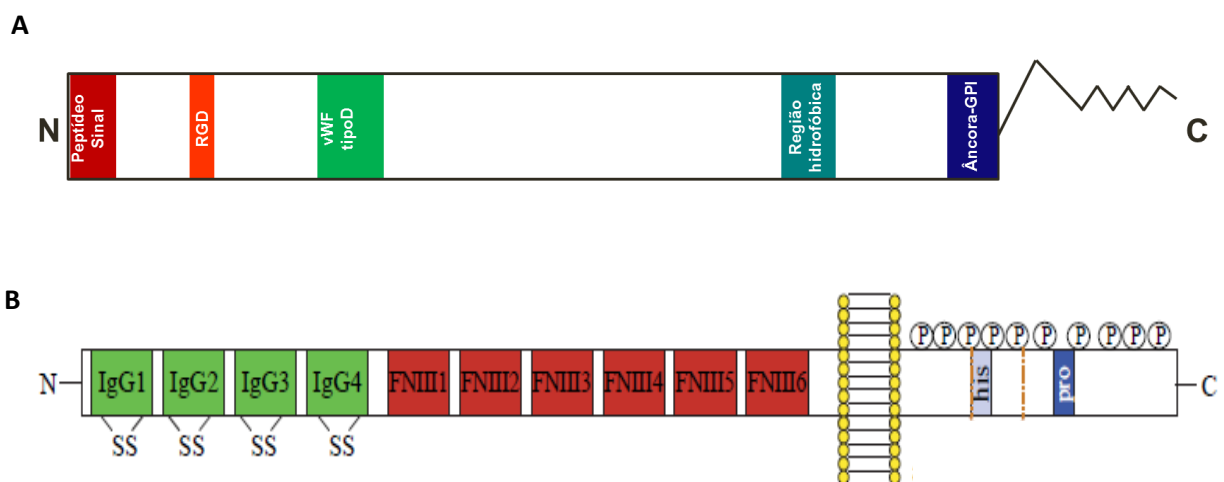
## 1.2 Moléculas Orientadoras por Repulsão (RGM)

Em 1996, Muller e colaboradores identificaram uma proteína, expressa no teto óptico de embriões de galinha, em níveis mais elevados na porção posterior e em níveis menos elevados na porção anterior. Esses achados sugeriram que esta proteína estaria envolvida na orientação repulsiva de axônios temporais da retina. Experimentos de proteômica identificaram essa nova molécula ancorada a membrana, sem homologia com nenhuma outra classe de moléculas orientadoras (Monnier et al., 2002). Esse novo fator foi então denominado como molécula orientadora por repulsão A (do inglês, *Repulsive Guidance Molecule a* - RGMa). Após a descoberta de RGMa, outros três membros da família foram ainda identificados, sendo denominados RGMb, RGMc e RGMd.

Moléculas orientadoras são moléculas que estão presentes na matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário para atuarem como sinais

atrativos ou repulsivos, direcionando o cone de crescimento do axônio em desenvolvimento (Chilton, 2006; Bonanomi & Pfaff, 2010). Várias famílias de Moléculas Orientadoras já foram identificadas. As RGMs compõem uma família de moléculas orientadoras composta por RGMa, RGMb (DRAGON), RGMc (hemojuvelina, HJV, HFE2) e RGMd. RGMa e RGMb são descritas como expressas no tecido nervoso (Oldekamp et al., 2004; Samad et al., 2004); e RGMc no tecido muscular (Kuninger et al., 2004; Kuninger et al., 2006). Nenhuma informação sobre a expressão de RGMd foi descrita até o momento (Mueller et al., 2006).

As RGMs possuem uma estrutura protéica similar, incluindo uma porção N-terminal com um peptídeo sinal; seguido pelo fator de von Willebrand tipo D (vWfD), que apresenta um sítio de clivagem proteolítica altamente conservado que é alvo de Furinas e proteínas SKI-1 (Tassew et al., 2012; Tian & Liu, 2013 ); e uma região C-terminal hidrofóbica que possui um domínio de GPI (glicosilfosfatidilinositol), responsável por ancorar a proteína à membrana plasmática (Monnier et al., 2002; Mueller et al., 2006) (Fig.2). Desse modo, essas proteínas podem ser encontradas tanto em sua forma solúvel quanto ligada à membrana pela âncora GPI (Severyn et al., 2009). Além disso, RGMa, RGMc e RGMd apresentam ainda um motivo RGD, que é composto por três aminoácidos, arginina, glicina e aspartato (Arg- Gly- Asp), um domínio conhecido por estar envolvido na adesão mediada por integrinas. Porém, nenhuma ligação de RGM ou sinalização através de integrinas foi relatado até o momento (Samad et al., 2004; Siebold et al., 2016). RGMd ainda apresenta um sinal de endocitose (YGAL) na porção C-terminal da proteína (Camus & Lambert, 2007).



**Figura 2.** Em (A) estrutura proteica das RGMs, composta por uma região N-terminal (solúvel) contendo um peptídeo sinal, seguido pelo fator de von Willebrand tipo D e um sítio de clivagem

denominado RGD; enquanto sua região C-terminal apresenta uma âncora GPI, que se interage com o receptor de neogenina presente na membrana plasmática da célula. Em (B) estrutura do seu receptor de Neogenina, composta por 4 domínios de Imunoglobulinas, 6 de Fibronectinas do tipo III, e na sua porção intracelular, possui 3 subdomínios denominados de P1,P2 e P3.

### **1.3 Molécula Orientadora por Repulsão do tipo A (RGMa)**

Apesar de ter sido primariamente relacionada com a inervação durante desenvolvimento embrionário por Monnier e colaboradores (2002), outros estudos vêm revelando a participação de RGMa com os mais variados processos fisiológicos.

RGMa foi associada ao fechamento do tubo neural (Niederkofler et al., 2004); e a processos de diferenciação e sobrevivência dos neurônios (Matsunaga et al., 2004; Matsunaga et al., 2006). RGMa e RGMb foram ainda identificadas como moléculas inibidoras do crescimento e regeneração de axônios após injúria do sistema nervoso central (Hata et al., 2006; Samad et al., 2005). Mais recentemente, RGMa e RGMb foram encontradas acumuladas nos locais de danos ou injúria nos casos de acidente vascular encefálico (Feng et al., 2012; Shabanzadeh et al., 2015), esclerose múltipla (Demicheva et al., 2015), e nas doenças de Parkinson (Muller et al., 2016) e Alzheimer (Sato et al., 2013). O uso de anticorpos neutralizadores da ação de RGMa vem apontando uma melhora na recuperação funcional nos casos de injúria da medula espinhal (Hata et al., 2006); e também do nervo óptico após injúria em modelos animais para esclerose múltipla (Demicheva et al., 2015). RGMa foi ainda apontado como supressor da angiogênese (Harada et al., 2016); e indutor da ossificação endocondral (Zhou et al., 2010). Além disso, outros estudos vêm apontando a ação de RGMa em respostas inflamatórias, onde a ligação de RGMa ao seu receptor Neogenina, presente nas células T CD4+, desencadeia o aumento da adesão dessas células aos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, o aumento na infiltração destas células nos parênquimas (Muramatsu et al, 2011). A expressão de RGMa também já foi relacionada com a gênese e evolução do câncer de colorretal (Zhao *et al.*, 2012).

Estudos recentes demonstraram ainda que RGMa é altamente expressa nas lesões em pacientes com esclerose múltipla, doenças do espectro da neuromielite óptica, infarto cerebral, lesão medular e doença de Parkinson (Malekzadeh et al, 2019; Korecka et al 2017). A expressão de RGMa é baixa em pacientes com epilepsia e a

regulação positiva da expressão de RGMa pode reduzir as crises epiléticas (Song et al, 2019). Estes dados indicaram que RGMa pode estar envolvido na patogênese das doenças acima referidas e pode tornar-se um alvo potencial para o tratamento de doenças do SNC.

Tanto RGMa quanto Neogenina (seu receptor) são altamente expressos durante as fases de proliferação e diferenciação de células-tronco neurais intestinais (Metzger, 2007). A perda de RGMa e Neogenina resultou na diminuição de neurônios, células gliais e gânglios no sistema intestinal, indicando que RGMa está envolvido na proliferação e diferenciação de células-tronco neurais intestinais (Metzger, 2007). RGMa teve um efeito de rejeição na diferenciação de progenitores neurogênicos via Neogenina (Metzger, 2007; Neckel et al, 2016). No mesencéfalo de um embrião de galinha, a super expressão de RGMa pode inibir temporariamente a proliferação celular (Isaksen et al, 2020). Além disso, RGMa promoveu a diferenciação neuronal no mesencéfalo através da transdução de sinal via Neogenina (Isaksen et al, 2020). Mais recentemente, Feng e colaboradores (2020) mostraram que RGMa pode regular a ramificação neuronal através da via RhoA para mediar a plasticidade sináptica.

#### **1.4 Sinalização de RGMa**

RGMa atua em tipos celulares diferentes quando induzem sinalização via o receptor Neogenina, ou como co-receptor da sinalização das Proteínas Morfogenéticas Ósseas (do inglês *Bone Morphogenetic Proteins*, BMP).

A Neogenina é um receptor transmembrana multifuncional que pertence a superfamília das imunoglobulinas e é composta por quatro domínios de imunoglobulinas (IG), seguidos por seis domínios de fibronectina tipo III (FNIII), um domínio transmembrana e uma porção intracelular (Rajagopalan et al., 2004; Fitzgerald et al., 2006; Vielmetter et al., 2009). Duas porções de RGMa, a N-terminal e a C-terminal, se ligam ao mesmo domínio FNIII (domínio 3 e 4) da Neogenina (Hata et al., 2006; Schwab et al., 2005). Essa interação entre RGMa e Neogenina inibe a regeneração de axônios e aumenta a neurodegeneração em locais de lesão (Demicheva et al., 2015; Hata et al., 2006; Mueller et al., 2015; Shabanzadeh et al., 2015), podendo inclusive acelerar a morte neuronal crônica por ativação da micróglia, que expressa RGMa em sua superfície quando está ativada (Kitayama et al., 2011). A inibição da interação entre RGMa e Neogenina, com anticorpos específicos contra

RGMa, diminui o tamanho da lesão causada por micróglia inflamatória em modelo animal para esclerose múltipla (Demicheva et al., 2015). Como consequência, o bloqueio da RGMa expresso pela micróglia induz o aumento do crescimento axonal, tanto *in vitro* como *in vivo*, em lesão inflamatória da medula espinhal (Demicheva et al., 2015).

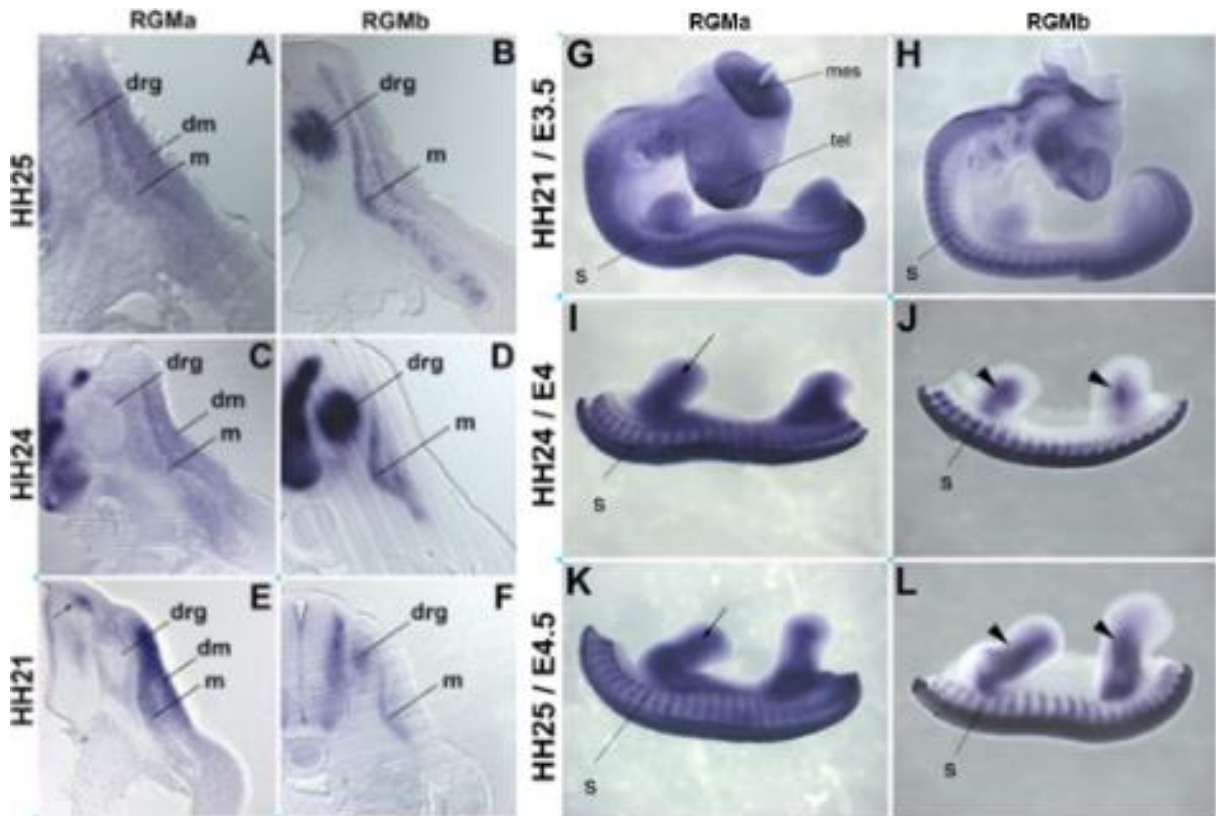
Além da interação com Neogenina, RGMa, RGMB e RGMc também foram identificadas como co-receptores da via BMP, membro da super-família TGF- $\beta$  (Babitt et al., 2005, 2006; Samad et al., 2005). A atividade das BMPs foi primariamente observada como indutoras de formação óssea ectópica (Urist, 1965), demonstrando habilidade em induzir células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em células ósseas (Wozney et al., 1988). Além da osteogênese, muitos processos e tipos celulares também são regulados pelas BMPs durante o desenvolvimento embrionário, como crescimento e proliferação celular, apoptose e diferenciação (Wu & Hill, 2009; Stewart et al., 2010). Essas moléculas também regulam a homeostase em tecidos adultos, atuando na integridade das articulações, no início do reparo da fratura óssea (Tsuji et al., 2006) e na remodelação vascular (Huang et al., 2010). O mal funcionamento das vias de sinalização causam desordens somáticas e hereditárias, incluindo anormalidades esqueléticas, doenças cardiovasculares (Cai et al., 2012) e vários tipos de cânceres (Gordon & Blobel, 2008; Massague, 2012).

### **1.5 RGMa no Desenvolvimento da musculatura esquelética.**

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

Transcritos de RGMa e RGMB foram observados nos somitos de embriões de galinha (Fig. 3), que são estruturas embrionárias, derivadas de mesoderma paraxial, que dão origem à derme, à musculatura esquelética do tronco e membros, aos tendões, vértebras e costelas. Mais especificamente, transcritos de RGMa foram detectados nos sítios de origem de precursores da musculatura esquelética e das células tronco musculares - as células satélites; enquanto transcritos de RGMB foram

detectados nos sítios de sobreposição das células musculares já diferenciadas (Jorge et al., 2012).



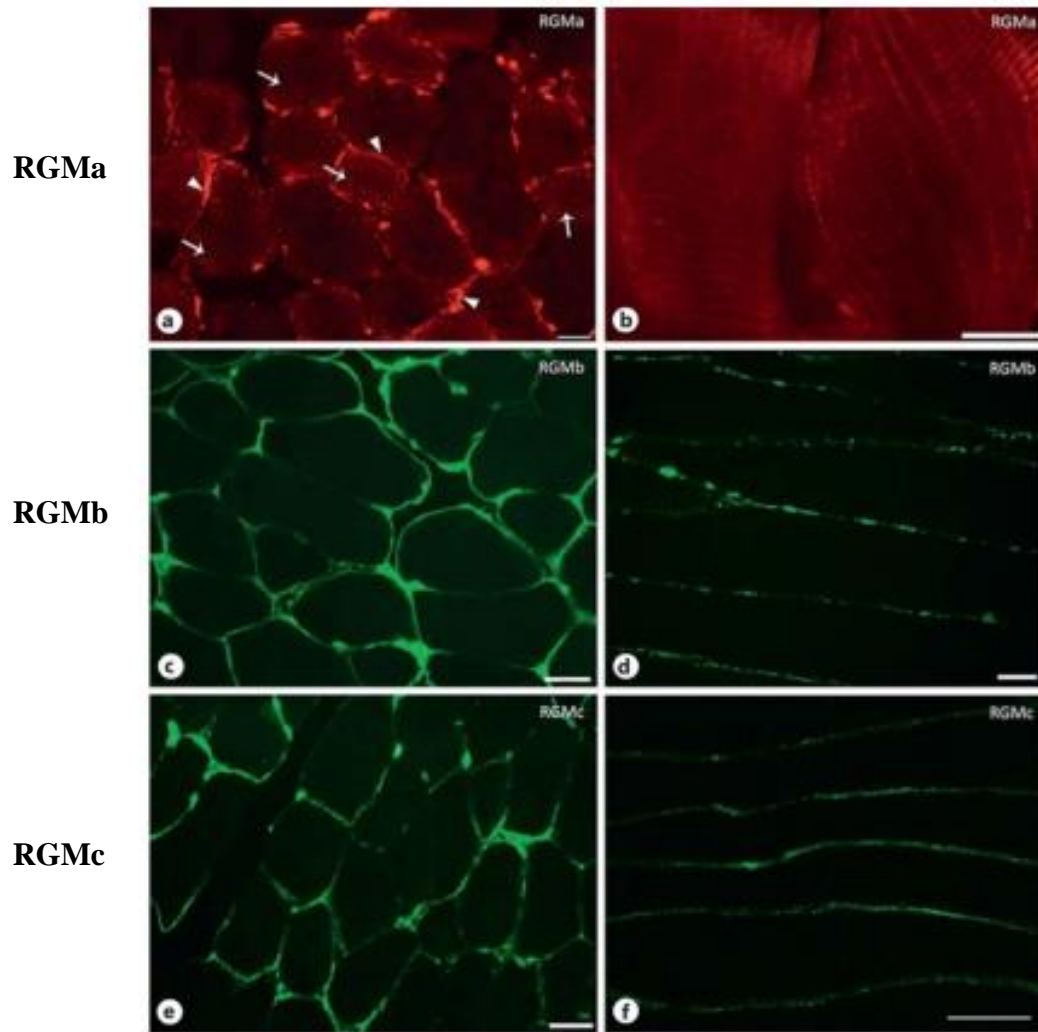
**Figura 3.** *RGMa* e *RGMb* são expressos durante o desenvolvimento, manutenção e crescimento da musculatura estriada esquelética. Em (A-F) observamos secções transversais de embriões de galinha, a nível de tronco segundo estagiamento Hamburger e Hamilton (HH). *RGMa* é expresso em células mesenquimais envolta do ganglio da raiz dorsal (DRG) e nas regiões do miotomo (M) e dermmiotomo (DM) dos somitos. Já *RGMb* se mostra expresso no DRG, e assim como *RGMa*, nas regiões do miotomo (M) e dermmiotomo (DM) dos somitos, regiões que darão origem aos precursores da musculatura esquelética. Em (G-L), observamos uma visão dorsal de embriões inteiros cujo estágios estão indicados à esquerda. Destaque para a expressão de *RGMa* e *RGMb* nos somitos (S) e nos membros em desenvolvimento (seta). Imagem retirada de Jorge et al. (2012).

### 1.6 RGMs na Musculatura Esquelética e sua associação com as Células Satélites

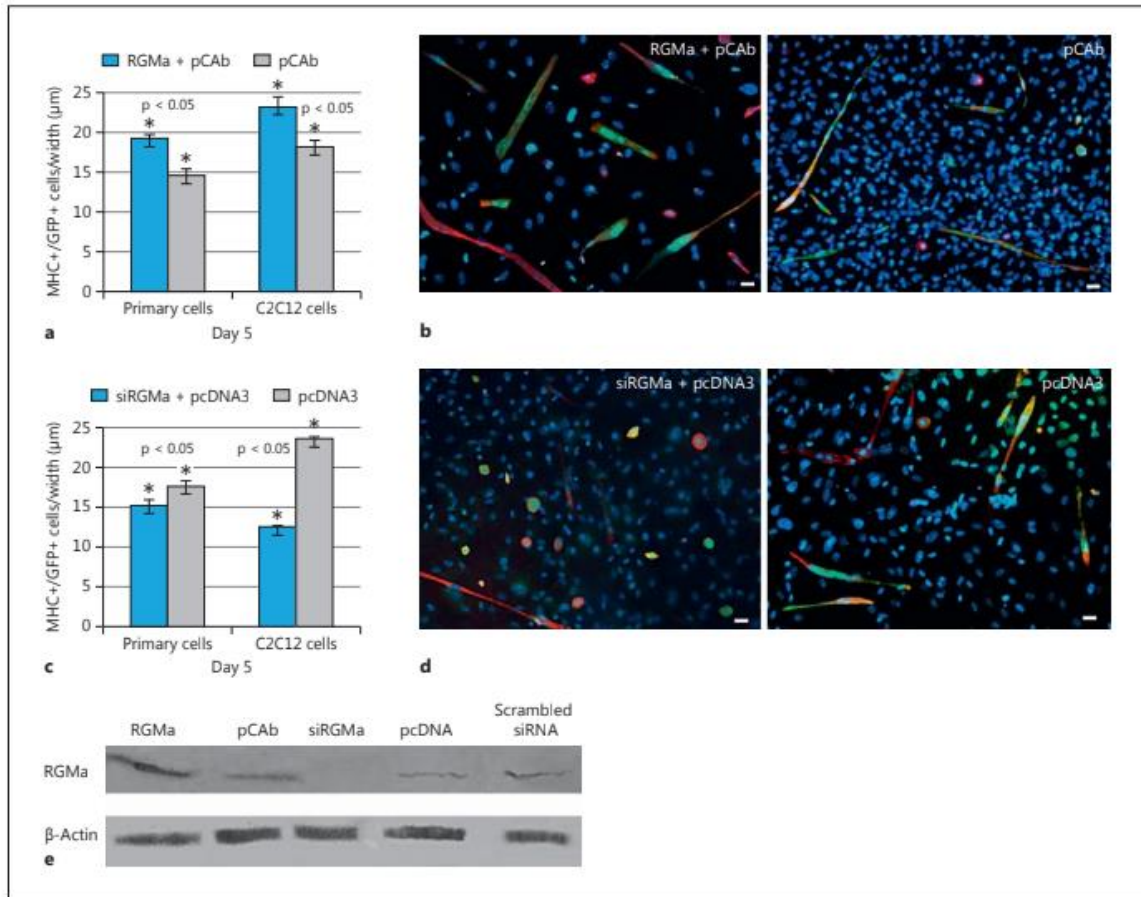
Apesar de estarem associadas com o sistema nervoso, achados de Jorge et al. (2012) e Martins *et al.* (2015) demonstraram que os domínios de expressão de *RGMa* e *RGMb* se estendem para o desenvolvimento, manutenção, crescimento e

regeneração da musculatura esquelética. Em camundongos adultos, nosso grupo demonstrou que RGMa, RGMb e RGMc estão presentes no sarcolema da célula muscular esquelética; enquanto RGMa foi adicionalmente identificado no sarcoplasma dessas células, apresentando-se com um padrão estriado similar ao de proteínas de sarcômero (Martins et al., 2015) (Fig. 4). As possíveis funções biológicas de RGMa nas células musculares foram investigadas em sistema *in vitro* utilizando-se a linhagem celular C2C12. A super-expressão de RGMa em células musculares induziu a hipertrofia das células musculares, com a formação de células com largura e consequentemente área maiores do que as células que super-expressaram o controle (Martins et al., 2015). O *knockdown* de RGMa nestas células induziu a formação de células menores, com características atróficas (Martins et al., 2015). Curiosamente, a super-expressão de RGMa nessas células também induziu uma maior eficiência de fusão de mioblastos para a formação de miotubos multinucleados: as células que super-expressaram RGMa apresentaram um maior número de núcleos (hiperplasia), quando comparado as células com super-expressão do controle (Martins et al., 2015) (Fig. 5).





**Figura 4.** Imunolocalização de RGMa, RGMb e RGMc no tecido muscular esquelético de camundongos adultos. (A e B) padrão de RGMa visto no sarcolema e no sarcoplasma; (C e D) de RGMb com expressão maior no sarcolema e quase sem expressão no sarcoplasma e (E e F) de RGMc também com maior predominância no sarcolema. Retirado de Martins et al., 2015.



**Figura 5.** Manipulação da expressão de RGMa em células musculares da linhagem C2C12 e em células primárias. A superexpressão de RGMa induziu a hipertrofia (A e B) e hiperplasia (E), enquanto *Knockdown* induziu a formação de mioblastos uninucleados (C e D). Retirado de Martins et al 2015.

Esses resultados nos permitiram atribuir um papel para o RGMa como um regulador positivo do tamanho da célula muscular esquelética e diferenciação, possivelmente através de um mecanismo de indução de fusão celular.

As células satélites estão localizadas na periferia das fibras musculares multinucleares, abaixo da lamina basal. Essas células permanecem em estado de quiescência (em repouso) até serem ativadas em resposta a estímulos de crescimento, remodelação ou trauma. Quando ativadas, as células satélites iniciam o processo proliferativo, produzindo (i) novas células satélites, para reporem a população de células-tronco existente; e (ii) novos mioblastos, que se alongam se tornando miócitos, que irão se fundir uns aos outros, se tornando miotubos, se diferenciando em novas miofibras musculares com função contrátil.

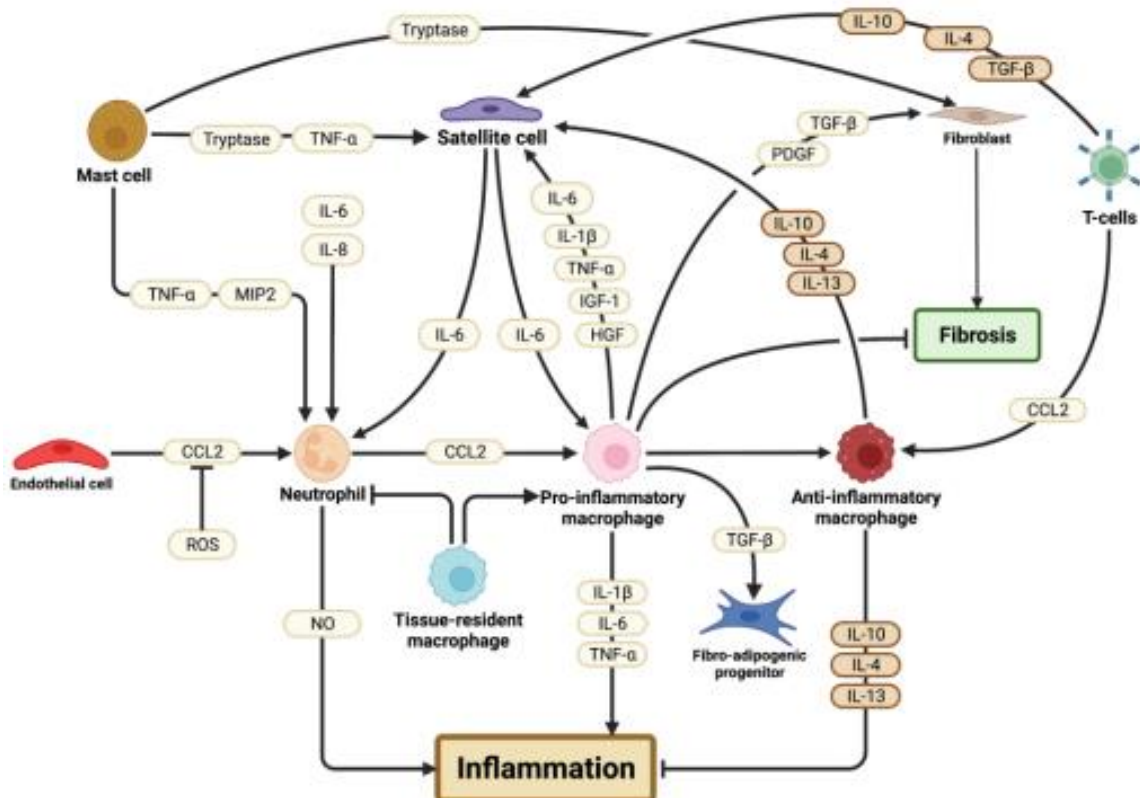
## **1.6 As Células Satélites e sua importância no crescimento e regeneração da musculatura esquelética**

Em 1961, foram descobertas as células satélites pelo pesquisador Alexander Mauro, através da sua observação criteriosa, utilizando microscopia eletrônica de um conjunto de células adormecidas entre a membrana plasmática e a lamina basal da fibra muscular, indicando que seria um mioblasto adormecido pronto para realizar a reparação do músculo quando necessário. Bernard Ktz (1970) realizou a mesma observação e apontou que essas células estavam associadas ao desenvolvimento e crescimento das fibras musculares, então ambos passaram a chama-las de “células satélites”. Atualmente as células satélites são conhecidas por serem um conjunto de células-tronco residentes no músculo esquelético e extremamente importantes para o desenvolvimento e reparo da musculatura, fornecendo mioblastos para reparar as fibras musculares danificadas no indivíduo adulto (Juergen et al., 2011).

As células satélites são extremamente importantes para a regeneração do músculo esquelético. Elas representam um volume muito pequeno em comparação com fibras musculares já existentes, mas são as únicas células capazes de reativar o PM no indivíduo adulto e promover a hipertrofia do músculo. Muitos estudos tentam entender os mecanismos moleculares por trás das células satélites, pois apesar de possuírem a capacidade de fornecer novas fibras musculares, elas não são incapazes de regenerar o músculo em lesões mais graves, ou resolver problemas patológicos como nas distrofias e atrofia muscular. No entanto, muitos pesquisadores acreditam que entender o funcionamento dessas células, pode ser a chave para resolver vários problemas patológicos, ou até mesmo ajudar em outras áreas da ciência, como selecionar animais para produção de carne, melhorar o ganho de massa muscular, ou entender como ocorre a sarcopenia.

Essas células são formadas ainda durante a embriogênese pelos somitos, e durante a vida pós-natal, quando o indivíduo passa pelo desenvolvimento muscular durante a puberdade, são essas células capazes de induzir os mesmos fenômenos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, através da ativação de fatores de transcrição genica compostos pela família MyoD e assim promover o crescimento dessa musculatura. Após a puberdade, essa população de células satélites permanece em repouso, e só irá ser reativada em caso de lesão muscular. Quando ocorre a lesão, dá-se início a degeneração, com necrose. Nesse momento, ocorre a

liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático dessas células, levando a proteólise e degeneração do tecido danificado (Yin, et al, 2013). A resposta inflamatória que é desencadeada pela necrose das miofibras, leva ao recrutamento de leucócitos circulantes. As primeiras células inflamatórias a chegarem no local são os neutrófilos, nas primeiras 6 horas após a lesão muscular (Fielding, 1993; Tidball, 1995; Yin, et al, 2013). Posteriormente os macrófagos começam a se infiltrar nas áreas danificadas. Segundo Chazaud B. (2009), esses macrófagos consistem em duas populações: (i) os primeiros a se infiltrarem na lesão são os macrófagos pró-inflamatórios CD68+/CD163+, (ii) seguidos dos anti-inflamatórios CD68-/CD163+. Esses primeiros macrófagos atingem o pico 24 horas após a lesão e são os responsáveis por realizar a fagocitose de parte do tecido danificado e assim começam a secretar citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL-1. A segunda população de macrófagos vai começar a secretar citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Fig.6), que são as facilitadoras para levar a ativação das células satélites (Bentzinger, 2013).



**Figura 6.** Representação esquemática das influências das células imunes na ativação das células satélites e regeneração do músculo esquelético. Retirado de Johnson, 2023.

A caracterização da quiescência das células satélites é marcada pela expressão de Pax7, após a lesão essas células são então ativadas, começam a entrar na fase proliferativa e a expressar MyoD, migram para o local da lesão, se fundem com as miofibras danificadas. Parte delas se auto-renova em novas células satélites, para manter o *pool* de células residentes e propiciar uma futura regeneração (Maltzahn, 2013; Bentzinger, 2012). Segundo Bentzinger (2014) a migração das células satélites após a sua ativação é controlada por sinais da miofibrila, incluindo sinalização através de Ephrin e Wnt7a.

Portanto, para que o músculo tenha uma regeneração adequada, é necessário a interação altamente controlada entre célula satélite, e outras células de suporte, que estão presente no seu microambiente. Em condições de homeostase perturbada (como no caso do envelhecimento), a regeneração é dificultada, em resposta a mudanças de interação entre o meio extracelular e as células satélites, incluindo perda de fibronectina, atividade alterada da  $\beta$ 1-integrina e níveis reduzidos do hormônio anti-envelhecimento Klotho, tudo isso levando a modificação desse microambiente onde as células satélites residem, afetando significativamente a regeneração muscular (Ahrens, et al 2018; Sahu, 2018).

Embora existam outros tipos celulares que são importantes para o reparo após lesão, as células satélites são os principais impulsionadores da regeneração do músculo esquelético. O equilíbrio entre os estágios de quiescência, ativação e diferenciação, são extremamente importantes para que se tenha uma regeneração adequada, garantindo a homeostase da musculatura esquelética. A sinalização e interação com outros tipos de células, juntamente com a matriz extracelular desempenham um papel importante no controle de todos esses processos. E o grande desafio da ciência atual, é compreender como esses processos interagem, e como são afetados na idade e também na doença.

Problemas no recrutamento dessas células levariam a um desequilíbrio nesse microambiente, resultando na não ativação das células satélites, afetando a regeneração do musculo esquelético. Porém, outro grupo de células não-miogênicas também são importantes para que essa regeneração aconteça de forma correta. Entre elas estão as progenitoras fibro-adipogênicas, (do inglês, Fibro-adipogenic progenitor, FAP), que estão localizadas no intertício e são identificadas pela expressão de PDGFR $\alpha$  - Receptor- $\alpha$  do fator de crescimento derivado de plaquetas (Schmidt, 2019).

As FAPs são uma população de células bipotentes, capazes de se diferenciar em adipócitos e fibroblastos. Elas se encontram quiescentes em músculos saudáveis, mas proliferam em caso de lesão. Diferentes fatores, como o óxido nítrico (NO), controlam a diferenciação dessas células em adipócitos. No entanto, quando estão indiferenciadas, estas células FAP podem ter efeitos positivos sobre os mioblastos ativados (Cordani, et al, 2014).

Dammone G. (2018) realizaram estudos *in vitro* e *in vivo* mostrando que FAPs indiferenciadas podem induzir a diferenciação de mioblastos ativados através da secreção de moléculas IL-6, IGF-1, Wnt1, Wnt3a e Wnt5a. Além disso, mostraram que as FAPs também controlam a ativação das células satélites *in vitro*. O efeito positivo das FAPs indiferenciadas é dado por sinais de fibras musculares intactas e saudáveis sob condições de homeostase, que impedem a diferenciação dessas células em adipócitos.

Além de serem importantes para a regeneração do músculo esquelético, essas células também contribuem durante o envelhecimento, se diferenciando e levando ao aumento de fibroblastos e a consequente liberação de colágeno tipo I (Joe, 2010).

### **1.7 Plasticidade das Células Satélites**

Embora as células satélites sejam conhecidas por apenas se diferenciarem em miofibras, estudos com células satélites *in vitro* trazem evidências que questionam a sua unipotência. Asakura (2001) provou que células satélites isoladas de camundongo podem se diferenciar em osteócitos, adipócitos e fibroblastos, a partir de sinais apropriados do ambiente. E ainda mostraram que mioblastos de camundongos C2C12 expostos a proteína morfogenética óssea -2 (BMP-2) transdiferenciadas em células progenitoras osteoblásticas, expressam marcadores como: fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina, enquanto inibem a formação de miotubos multinucleados. Além disso, quando são cultivadas em um meio adipogênico, como o receptor proliferativo gama ativado (PPARG) ou a rosiglitazona, as células satélites se diferenciam em adipócitos (Kook, 2006). Brack e seus colaboradores (2018) isolaram células satélites de camundongos idosos, e mostraram que essas células adotam um destino fibrogênico, durante a proliferação e através da ativação via sinalização wnt. Isso sugere que, quando o ambiente dentro do músculo envelhece, promove uma conversão miogênica fibrogênica.

Apesar de todos esses estudos mostrarem a capacidade multipotente, das células satélites *in vitro*, e também em condições normais *in vivo*, elas sempre permanecem como uma célula-tronco unipotente do músculo esquelético (Asakura, 2019).

Alguns resultados preliminares do nosso grupo revelaram que RGMa pode ser encontrado nos mionúcleos, ao longo da fibra muscular adulta, no mesmo local onde se encontram as células satélites, indicando uma possível associação entre eles. Compreender como as células-tronco musculares atuam, poderá não só propiciar o desenvolvimento de terapias celulares, para auxiliar no tratamento de doenças que levam a perda de massa muscular, mas também auxiliar em outras áreas da ciência, como por exemplo, entender como melhorar o ganho de massa muscular durante as atividades físicas, e também selecionar animais para maior produção de carne.

Diante desses achados, este presente estudo teve como objetivo, dar continuidade aos trabalhos que vem sendo desenvolvidos no laboratório, para investigar a possível associação de RGMa, agora com as células satélites. Avaliamos o padrão de expressão de RGMa nas células satélites, isoladas de camundongos e cultivadas *in vitro*; e investigamos as possíveis funções de RGMa na proliferação e diferenciação de células satélites.

## 2. OBJETIVOS

A presente proposta pretende avaliar (i) o padrão de expressão de RGMA nas células satélites isoladas de camundongos e cultivadas *in vitro*; e (ii) investigar as possíveis funções de RGMA na proliferação e diferenciação dessas células satélites.

### 2.1 Objetivos específicos:

2.1.1 Investigar o padrão de expressão de RGMA nas células satélites quiescentes até a sua diferenciação em cultura, por imunofluorescência.

2.1.2 Promover o *knockdown* de RGMA nas células satélites pela transfecção de siRNA-RGMA e verificar os efeitos sobre a proliferação dessas células *in vitro*;

2.1.3 Promover o *knockdown* de RGMA nas células satélites pela transfecção de siRNA-RGMA e verificar os efeitos sobre a diferenciação dessas células *in vitro* em caso de não apresentar efeitos na proliferação.



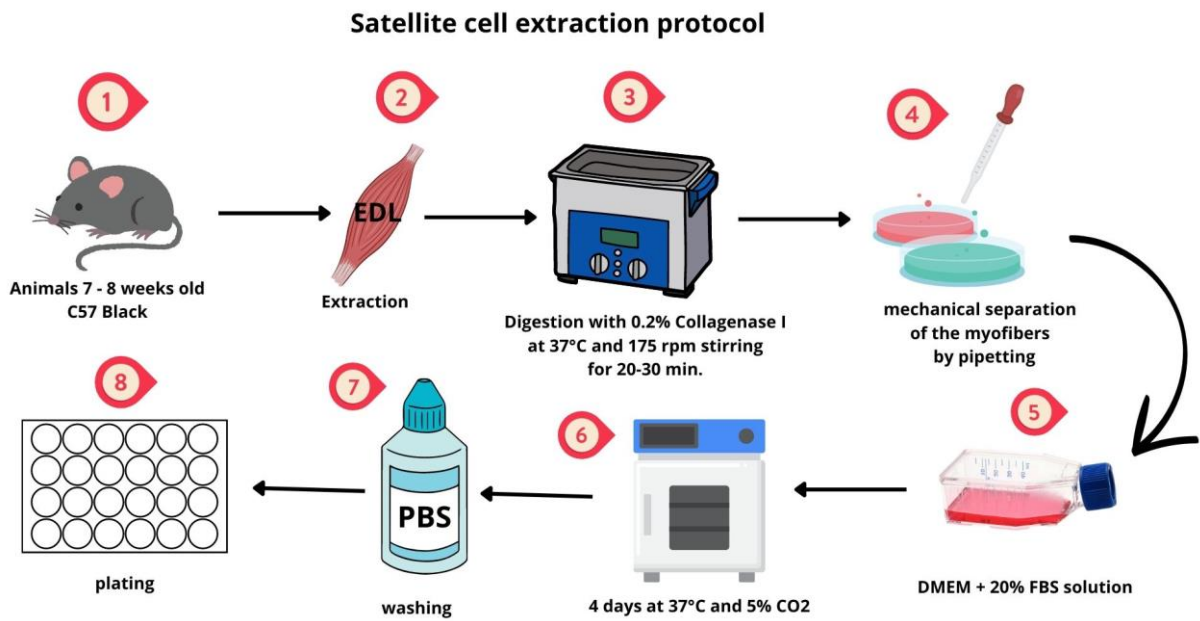
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 (machos e fêmeas) com cerca de 7 a 8 semanas de idade, foram obtidos junto ao Centro de Bioterismo da UFMG - CEBIO, e mantidos no biotério do Departamento de Morfologia, onde receberam ração (LABINA- PURINA), e água *ad libitum*. Os procedimentos de manutenção dos animais e cirúrgicos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, sob protocolo 366/2019.

#### 3.2 Isolamento das células satélites

O protocolo que foi utilizado para isolar e cultivar células satélites foi descrito por Rosenblatt e colaboradores (1995). Os animais (com cerca de 7 a 8 semanas) foram sacrificados por sobredose anestésica: xilazina (30 mg/kg por via intraperitoneal) e Cetamina (300 mg/kg por via intraperitoneal). Em seguida, foram posicionados na mesa cirúrgica com os membros inferiores estirados para a remoção do músculo EDL (*extensor digitorum longus*). Este músculo foi removido de tendão a tendão para o não prejuízo da integridade das fibras musculares (Fig.8). Todos os materiais para cirurgia foram esterilizados com antecedência, e toda a área de sacrifício foi limpa com álcool 70%. Uma vez removido, o músculo EDL foi digerido com colagenase I 0,2% em DMEM, suplementado com gentamicina (Gibco), previamente aquecida. Em seguida, o tecido foi levado ao banho-maria a 37°C sob agitação a 175 rpm por 20 – 30 min, até que as miofibras musculares começassem a se destacar umas das outras. As miofibras foram finalmente separadas por pipetagem e mantidas em meio de crescimento [MC: DMEM contendo 20% soro fetal bovino (FBS) e gentamicina], em placas de petri, e depois, transferidas cada uma em um poço de placas de cultivo, contendo MC. As miofibras isoladas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 4 dias, sem trocar o meio (Fig.7).



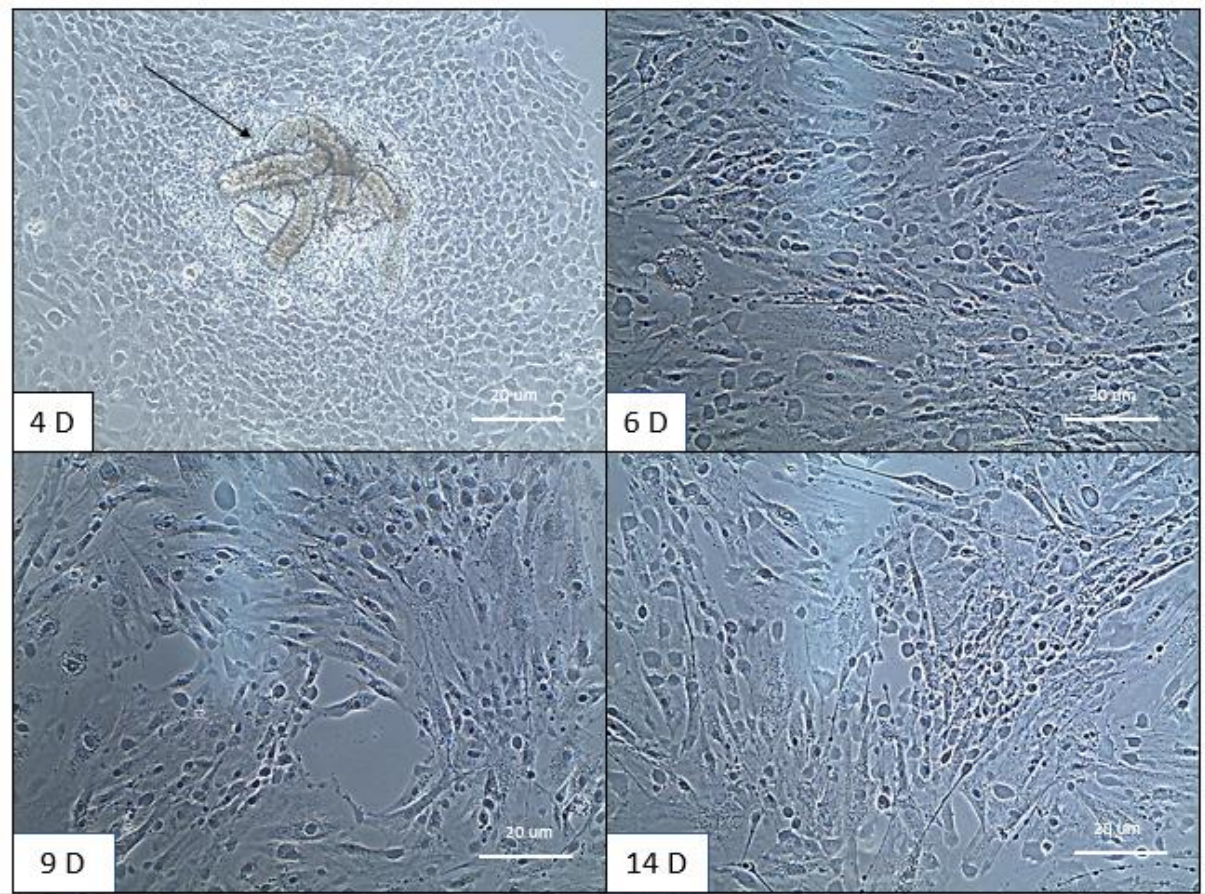
**Figura 7.** Esquema representativo do protocolo adaptado de Rosenblatt (1995), que foi utilizado neste trabalho para o isolamento das células satélites.



**Figura 8.** Imagens do procedimento cirúrgico, destacando a extração do músculo EDL (extensor digitorum longus) dos animais. Utilizamos o músculo TA (Tibial Anterior), que fica situado na região anterior da tíbia, para localização do músculo EDL, durante o procedimento cirúrgico de extração muscular.

Depois dos 4 dias de incubação, foi possível observar que as células satélites, ativadas devido o processo de digestão, começam a migrar das miofibras e a aderirem

ao fundo da garrafa (Fig.9). Então foi feita uma lavagem com solução tampão (PBS), para retirar restos de fibras mortas, e as células aderidas deixadas na incubadora para iniciar o processo proliferativo até atingirem a confluência necessária para realização do plaqueamento. Após atingirem 60 a 70% de confluência, as células foram dissociadas com tripsina a 0,5%, contadas em câmara de *Neubauer* e realizado o plaqueamento sobre lamínulas de plástico sem tratamento.



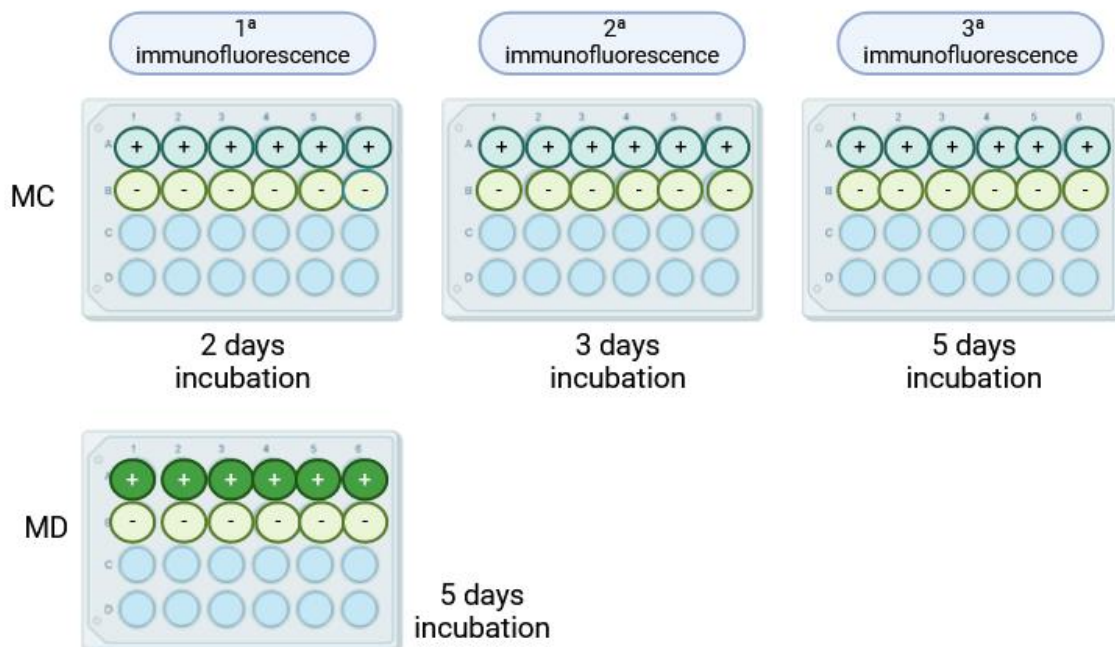
**Figura 9.** Padrão do cultivo das células satélites, em meio de crescimento. Ativação, adesão e proliferação das células satélites após 4, 6, 9 e 14 dias de cultivo em meio de crescimento. A seta (em preto) indica uma miofibra ainda presente na cultura.

### 3.3 Padrão de expressão de RGMa nas células satélites em cultura

O padrão de expressão de RGMa nas células satélites foi obtido por imunofluorescência, utilizando anticorpo primário anti-RGMa (Thermo Fisher).

Resumidamente, as células satélites foram plaqueadas a  $4 \times 10^4$  células/ poço em placas de 24 poços e cultivadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2, 3 e 5 dias em MC,

para a avaliação do perfil de expressão nas células em proliferação; e por 5 dias em meio de diferenciação [MD: DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo e 1% de anti-anti], para a avaliação do perfil de expressão durante a diferenciação dessas células em miotubos. Ao término do período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS. As células foram então fixadas em PFA 4% por 8 min, e lavadas por três vezes em PBS. A permeabilização foi feita por incubação durante 30 min em Tween-20 0,1% em PBS a 37°C. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com BSA 5% em PBS, incubando-se por 1 hora a 37 °C. Em seguida, o anticorpo primário anti-RGMA (Thermo Fisher ou Santa Cruz Biotecnologia) foi adicionado diluído 1:100 em Tween-20 0,1% em PBS e BSA 1% e incubados à 4°C *overnight*. A incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 anti-rabbit, ocorreu da mesma forma, diluído 1:1000 em solução de Tween-20 0,1% em PBS e BSA 1% à temperatura ambiente (TA), protegido da luz. Os núcleos foram corados com DAPI (diluído 1:1000 em PBS). A documentação dos resultados foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss® Axio Vert.A1 e as imagens coletadas foram analisadas utilizando-se o software ImageJ®.

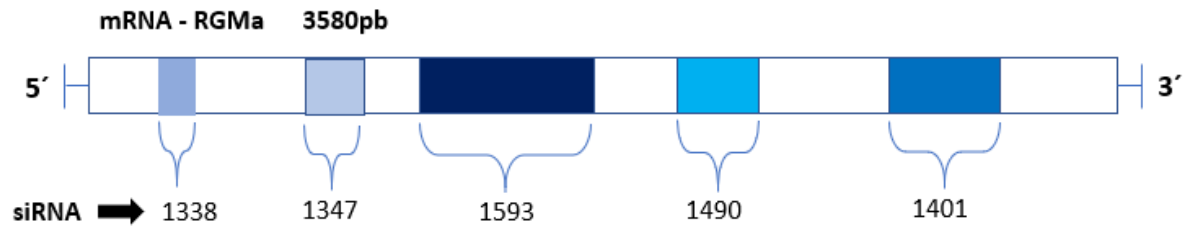


**Figura 10.** Desenho experimental do plaqueamento e imunofluorescência das células em meio de crescimento (MC) e meio de diferenciação (MD). Os controles positivos (+) e negativos (-) foram determinados na presença e ausência do anticorpo primário anti-RGMA.

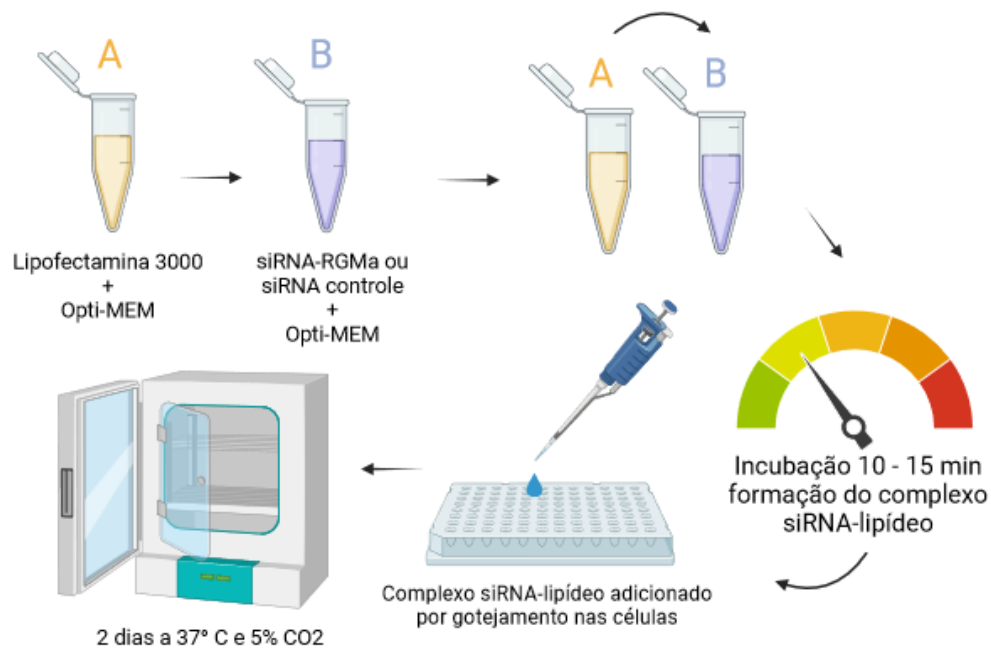
### 3.4 *Knockdown* de RGMA nas células satélites

Os siRNA-RGMA e siRNA-controle foram obtidos na Thermo Fisher Scientific. O RNA mensageiro de RGMA possui cerca de 3.580 pb e o siRNA-RGMA adquirido consegue se ligar em vários éxons do RNAm, conferindo assim, uma maior eficiência no processo de diminuição da tradução desse RNAm ou de encaminhamento deste RNAm para ser destruído nas células (Fig.11). Já o siRNA-controle foi desenvolvido para que fosse inserido um RNA pequeno nas células como controle da transfecção, mas sua sequência de nucleotídeos não possui similaridade com qualquer RNAm presente nas células.

Para promover o *knockdown* dos transcritos endógenos de *RGMA*, as células satélites foram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços em MC, sobre lamínulas de plástico. Após um dia de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, foi feita a preparação das soluções A e B, seguindo-se as instruções do reagente Lipofectamina 3000 (Invitrogen) (Fig.12). Resumidamente, por poço a ser transfectado, 5ul de Lipofectamina 3000 foi diluída em 25 uL de meio Opti-MEM para o preparo da solução A, que foi então misturada em vórtex (2-3 vezes). Em seguida, preparou-se a solução B, contendo 50 uM do siRNA-RGMA ou do siRNA-controle, diluídos em 25 uL de Opti-MEM cada (também preparada em volume suficiente para transfectar todos os poços necessários para as replicatas experimentais). Em seguida, misturou-se a solução A com a B na proporção de 1:1, seguido da incubação por 10-15 min em TA, para permitir a formação do complexo siRNA-lipídeo. Após este período de incubação, o complexo foi adicionado as células por gotejamento. Após incubação por 2 dias à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, o meio de transfecção foi substituído por MC fresco e a cultura incubada por um período adicional de 2 dias.



**Figura 11.** Representação da sequência do RNA mensageiro de RGMa e os sítios de similaridade com os cinco RNAs de interferência (siRNA-RGMa) presentes no mesmo produto.



**Figura 12.** Desenho adaptado, a partir do protocolo do reagente Lipofectamine™ Stem Transfection Reagent (Invitrogen). Disponível em: [https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFSAssets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0017080\\_LipofectamineStem\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFSAssets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0017080_LipofectamineStem_UG.pdf).

### 3.5 Avaliação dos efeitos do *knockdown* de RGMa na proliferação celular

Os efeitos do *knockdown* de RGMa na proliferação celular foram avaliados sobre (i) a viabilidade celular, pelo ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolin] (Life Technologies); (ii) por PCRq para marcadores de proliferação de mioblastos; e (iii) por imunofluorescência utilizando-se o marcador de proliferação Ki67 e contagem dos núcleos positivos para esta marcação.

### 3.5.1 Ensaio de MTT para a determinação da viabilidade celular após transfecção

A viabilidade celular foi avaliada após 2, 3 e 5 dias de transfecção. O ensaio colorimétrico é baseado na redução de tetrazólio amarelo ([3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) - 2,5-difenil brometo de tetrazolin] (Life Technologies) para cristais de formazan de coloração roxa por células metabolicamente ativas. As células viáveis contêm enzimas oxidorreduzases dependentes de NAD(P)H, que reduzem o MTT em formazan. Os cristais de formazan são dissolvidos usando uma solução de solubilização contendo isopropanol. A solução colorida resultante foi quantificada através da medida de sua absorvância em 500-600 nanômetros usando um espectrofotômetro para placas multipoços. Quanto mais escura a solução, maior o número de células viáveis, metabolicamente ativas.

Resumidamente, as células foram plaqueadas a uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços em MC. Após 24 horas de incubação, o MC foi substituído por 500 uL de solução de MTT por poço. Após incubação por 2 horas à 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, a solução de MTT foi retirada e cada poço foi lavado com PBS. Em seguida, foram adicionados 500 uL de isopropanol ácido em cada poço, para dissolver os cristais de formazan. Feito todo o processo, 100 uL de cada amostra foi transferido em triplicatas para uma placa de 96 poços, sendo 3 poços da placa destinados ao controle somente com 100 uL de isopropanol. As amostras foram inseridas no aparelho de ELISA, e a leitura foi realizada a 595 nm.

### 3.5.2 RT-PCRq

#### Extração do RNA total

Para as análises de RT-PCRq, o RNA total presente nas células satélites após *knockdown* com siRNA-RGMA e siRNA-controle foram extraídos, segundo protocolo adaptado de Chomczynski e Sacchi (1987), utilizando o reagente Trizol Reagent (Invitrogen).

Foram utilizadas 6 amostras das células (3 siRNA-RGMA e 3 siRNA-controle), em triplicata, após o *knockdown* para a extração do RNA total. Para isso, inicialmente foi retirado o MC de cada amostra seguida de sua lavagem em PBS. Em seguida, foi adicionado 1 mL de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) no primeiro poço de cada triplicata.

Após ressuspensão das células, estes 1 mL foram transferidos para o segundo poço para a ressuspensão das células, seguido do terceiro poço da triplicata. Após a ressuspensão dos 3 poços, a solução contendo 1 mL de Tri-Reagent e células foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL limpo. Este procedimento foi realizado para a coleta de todas as amostras.

Após 5 min de incubação à temperatura ambiente (TA) foram adicionados 200 µL de clorofórmio por tubo e, após mistura por inversão, o material foi centrifugado por 15 min a 12.000 x g. Aproximadamente 400 µL da fase superior contendo o RNA total foram transferidos para um novo tubo eppendorf 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 centrifugadas por 10 min a 12.000 x g e o isopropanol foi descartado. Em seguida, 1 mL de etanol 75% (para RNA) foi adicionado à amostra e após mistura em vórtex, o material foi novamente centrifugado por 5 min a 12.000 x g. 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 DEPC (nuclease-free) e incubado por 5 min a 55 °C. A integridade do RNA total isolado foi verificada após eletroforese em agarose 1% e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro da marca NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers.

### **Síntese de cDNA (DNA complementar)**

Após avaliação da qualidade e quantidade do material extraído, cerca de 1 µg de RNA total foi então convertido em cDNA, seguindo instruções dos fabricantes do *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). O processo ocorreu em duas reações. A primeira reação correspondeu a adição de 1 µL de Oligo dT (100µM), 1 µL de *random primer* e 1 µg de RNA total em um volume final de reação de 12 µL; seguindo-se incubação em termociclador, (*MyCycler™ Thermo Cycler System* - Bio-Rad) a 65°C por 5 min, para ocorrer a desnaturação do RNA. Em seguida a reação permaneceu por 1 min em gelo, para que ocorresse o anelamento do primer à cauda Poli(A) do RNAm presente na amostra total. A segunda reação foi realizada após este período de incubação, com a adição de 1 µL da enzima Transcriptase Reversa (*RevertAid™ H Minus*), 2 µL de dNTP MIX (10 mM), 1 µL de inibidor de RNase (*RiboLock™*) e 4 µL de Buffer 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 250 mM KCl; 20



mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT). A reação foi incubada a 42°C por 1h, para permitir a polimerização das cópias do RNAm em moléculas de cDNA e 70°C por 5 min, para inativação das enzimas.

### Reações da RT-PCRq e Primers

As reações de PCR quantitativa (RT-PCRq) foram realizadas utilizando-se 1 µL do cDNA (diluído 1:10), 0,4 µL de cada um dos primers (a 10µM cada) e 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher), para um volume final da reação de 10 µL. O procedimento de amplificação ocorreu no termociclador Rotor-Gene (Qiagen). As condições de ciclagem utilizadas foram de 95°C por 2 min (ativação enzimática), seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 seg (desnaturação), 60°C por 15 seg (anelamento) e 30 seg a 72°C (extensão). Foram quantificados os níveis relativos de expressão dos seguintes marcadores: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que foi utilizado como gene referência; Ki67 e PCNA, ambos marcadores de proliferação celular. As sequências dos pares dos primers, a temperatura de anelamento e o tamanho do amplicon esperado para cada um deles está disponível na Tabela 1. O *PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)* é uma proteína cuja síntese ocorre no início das fases G1 e S do ciclo celular. Embora inespecífico, é um excelente marcador para células em proliferação, inclusive as células satélites (Yablonka., 1994). Já o *Ki67* é um marcador presente nas fases S, G2 e M do ciclo celular, mas ausente em G0. Uma vez tendo início a diferenciação celular, a sua expressão também declina, e não é específico para células musculares. O GAPDH foi escolhido como gene referência pois não está presente apenas nas células musculares, mas sim em todos os tipos celulares.

**Tabela 1.** Sequências, temperatura de anelamento e amplicon esperado dos primers utilizados neste estudo.

| PRIMER  | SEQUÊNCIA                        | Ta<br>(°C) | AMPLICON<br>(pb) |
|---|----------------------------------|------------|------------------|
| GAPDH<br>(Gliceraldeído-<br>3-fosfato<br>desidrogenase) | F: 5`-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3`   | 60         | 200              |
|   | R: 5`-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3` |            |                  |

|  |                               |    |     |
|--|-------------------------------|----|-----|
| <b>RGMA</b><br>(Repulsive<br>Guidance<br>Molecule A)   | F: 5`-CAACATCAGGAAGGCAGAAG-3` | 60 | 314 |
|  | R: 5`-GCGTAGCACTGGGTAGGAAG-3` |    |     |
| <b>Ki67</b><br>(ou MIB-1)                              | F: 5`-GCAGCCTCTTCACCCAAA-3`   | 60 | 200 |
|  | R: 5`-GGCACTTTCACCTTCATCCA-3` |    |     |
| <b>PCNA</b><br>(Proliferating cell<br>nuclear antigen) | F: 5`-ACATTGGAGATGCTGTTGTG-3` | 60 | 200 |
|  | R: 5`-CAGTGGAGTGGCTTTTGTG-3`  |    |     |

### Análise Estatística

A expressão diferencial dos genes foi avaliada estatisticamente por meio do cálculo do intervalo de confiança de 95% para as replicatas biológicas, fornecendo uma medida robusta da variação entre as amostras. A metodologia estatística seguiu o modelo proposto por Pfaffl et al. (2002), que é amplamente reconhecido por sua precisão e confiabilidade na análise de dados de expressão gênica.

Os resultados obtidos foram sistematicamente organizados em tabelas, facilitando a visualização e interpretação dos dados. Foram calculados a média dos valores de Ct, o desvio padrão, e as diferenças relativas de expressão gênica ( $\Delta$ CT e  $\Delta\Delta$ CT). Além disso, aplicou-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta$ CT, conforme descrito por Pfaffl et al. (2001), para quantificar a expressão relativa dos genes de interesse em comparação com um controle de referência.

Por fim, a análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software REST2009, que permite uma avaliação detalhada e específica da expressão gênica, incluindo a validação estatística das diferenças observadas. Este software é reconhecido por sua eficácia na análise de dados de RT-PCR quantitativa, proporcionando uma interpretação confiável e precisa dos resultados experimentais.

### **3.5.3 Imunofluorescência para o marcador de proliferação ki67 e contagem dos núcleos**

O Ki67 é um marcador biológico amplamente reconhecido por sua capacidade de indicar a proliferação celular. Ele é expresso no núcleo das células que estão no ciclo de divisão celular, mas não naquelas em repouso. Para avaliar a expressão de Ki67 e os efeitos sobre a proliferação celular, empregamos a técnica de imunofluorescência. Esta metodologia permite a visualização e quantificação das células que estão ativamente se dividindo, ou seja, as células Ki67-positivas.

Para isso, 2 h após a transfecção com siRNA-RGMA e siRNA-CTRL, células satélites foram fixadas com PFA 4% por 8 min, seguido de 3 lavagens com PBS. Em seguida, as células foram submetidas a uma permeabilização durante 30 min em Tween-20 0,1% em PBS à 37°C. O bloqueio foi realizado com BSA 5% em PBS, incubando-se por 1 hora a 37 °C. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário Ki67/MKI67, diluído 1:100 em Tween-20 0,1% em PBS e BSA 1% e incubados à 4°C *overnight*. A incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 anti-rabbit ocorreu da mesma forma, diluído 1:1000 em solução de Tween-20 0,1% em PBS e BSA 1% à temperatura ambiente (TA), protegido da luz. Os núcleos foram corados com DAPI (diluído 1:1000 em PBS). A documentação dos resultados foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss® Axio Vert.A1 (aumento de 10x) e as imagens foram coletadas de 5 áreas por poço.

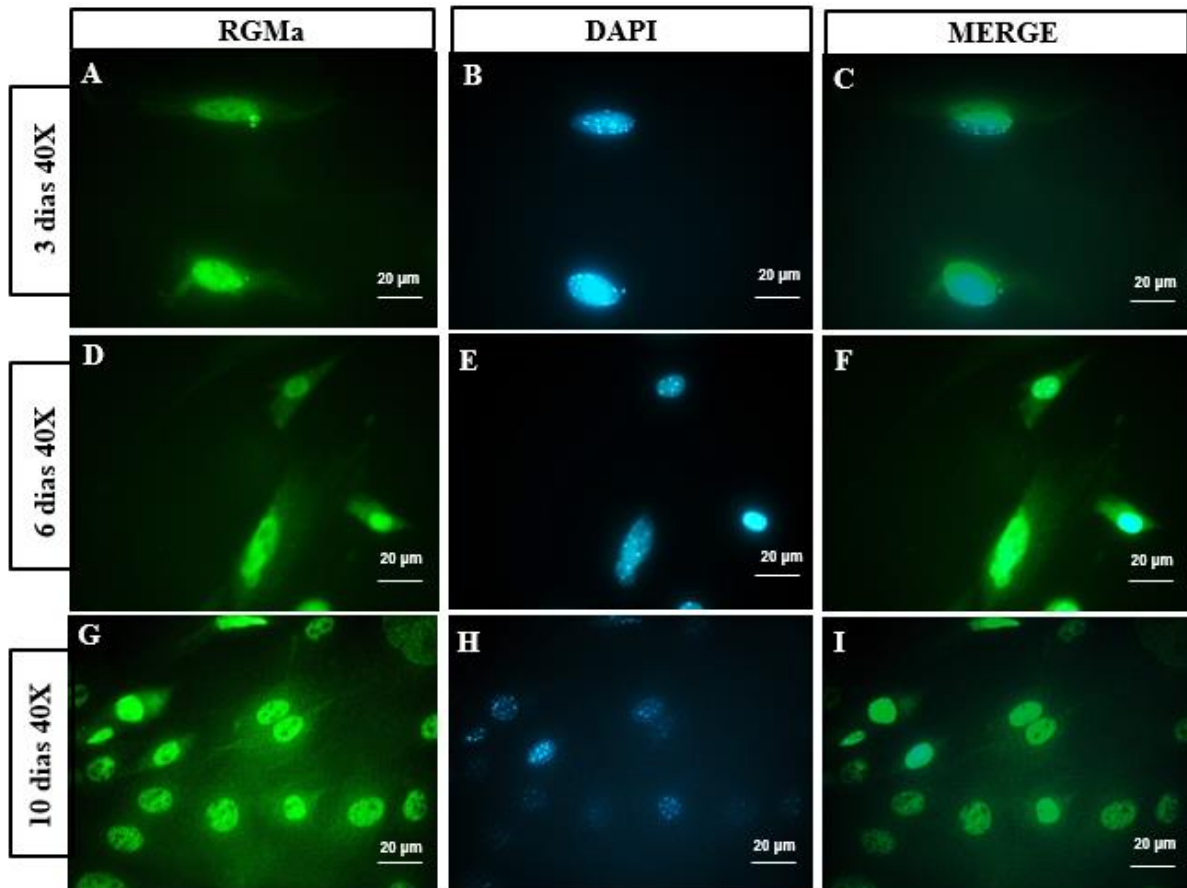
As imagens foram utilizadas para contagem manual dos núcleos positivos para ki67, entre os tratamentos siRNA-RGMA e siRNA-CTRL, utilizando as marcações com DAPI como controle. A análise estatística foi realizada seguindo-se o método Student's t test, utilizando-se a média de núcleos positivos por poço.

## **4. RESULTADOS**

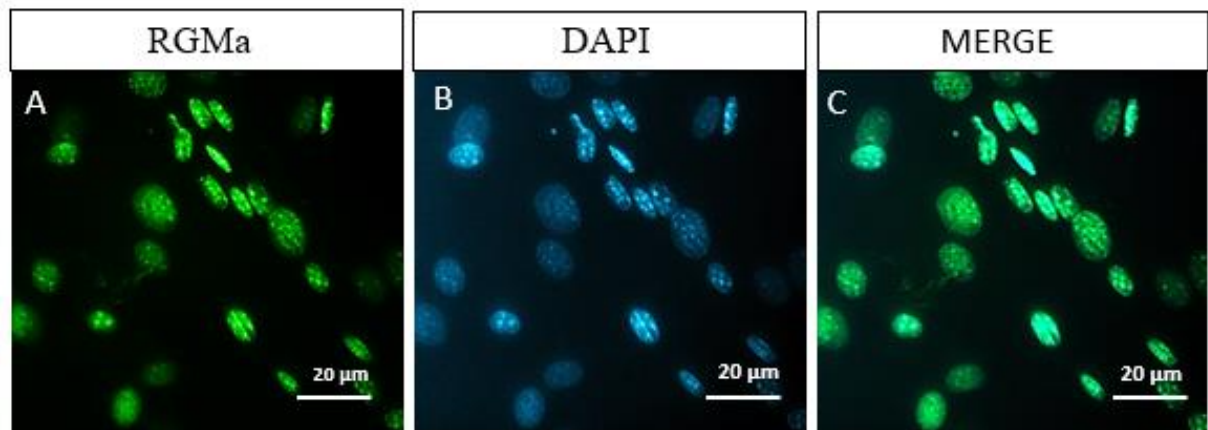
### **4.1 Imunolocalização de RGMA nas células satélites durante os estágios de proliferação e diferenciação.**

Ao analisar as imagens obtidas por imunofluorescência para o anticorpo anti-RGMA, foi possível observar que, ao longo de 10 dias após o plaqueamento das células satélites em MC, RGMA encontrou-se predominantemente localizado no núcleo das células satélites, embora tenha uma baixa expressão no citoplasma

durante os estágios proliferativos (Fig. 13). A partir do décimo quarto ou décimo sexto dia de cultivo em meio de crescimento, no entanto, foi possível observar que a expressão de RGMa apresentou-se exclusivamente no núcleo das células. Já durante a diferenciação das células satélites, foi possível observar que a expressão de RGMa encontrou-se exclusivamente na região nuclear das células (Fig.14).



**Figura 13.** Padrão de expressão de RGMa ao longo de 10 dias de cultivo em MC. Aumento de 40x. Em (A) Imunolocalização de RGMa na célula satélite após 3 dias de plaqueamento e cultivo em MC; (B) marcação do núcleo das células com DAPI; e em (C) a sobreposição de A e B; (D) Imunolocalização de RGMa na célula satélite após 6 dias de plaqueamento e cultivo em MC; em (E) marcação dos núcleos com DAPI; e em (F) sobreposição de D e E; (G) Imunolocalização de RGMa nas células satélites após 10 dias de plaqueamento e cultivo em MC; (H) marcação dos núcleos com DAPI; e em (I) a sobreposição de G e H.

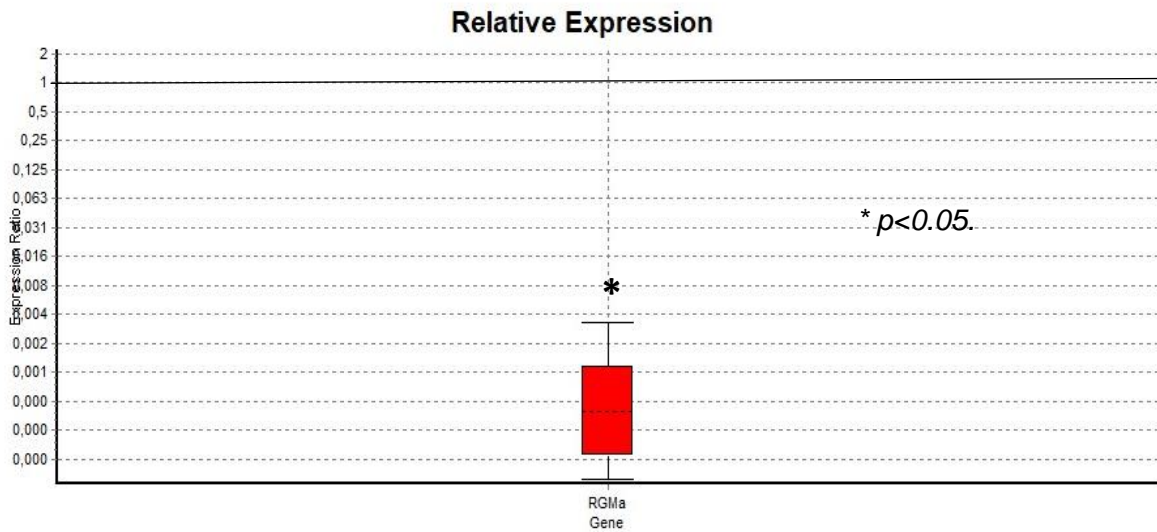


**Figura 14.** Padrão de expressão de RGMa em células satélites cultivadas em meio de diferenciação. Aumento de 40x. Em (A) Imunolocalização de RGMa nas células satélites após 3 dias de plaqueamento e 5 dias de cultivo em MD; (B) marcação dos núcleos dessas células com DAPI; e em (C) a sobreposição de A e B.

#### 4.2 *knockdown* de RGMa nas células satélites

Inicialmente, realizamos uma análise de PCRq (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) para confirmar o sucesso do *knockdown* do gene *RGMa* nas células satélites. Essa etapa foi crucial para avaliar se o siRNA-RGMa estava efetivamente reduzindo a expressão desse gene.

Os resultados indicaram uma redução significativa na expressão de RGMa nas células transfectadas com siRNA-RGMa em comparação com as células transfectadas com o controle, como mostrado no gráfico (Fig. 15). Isso confirmou que o siRNA-RGMa estava cumprindo seu objetivo de reduzir a expressão do gene RGMa.



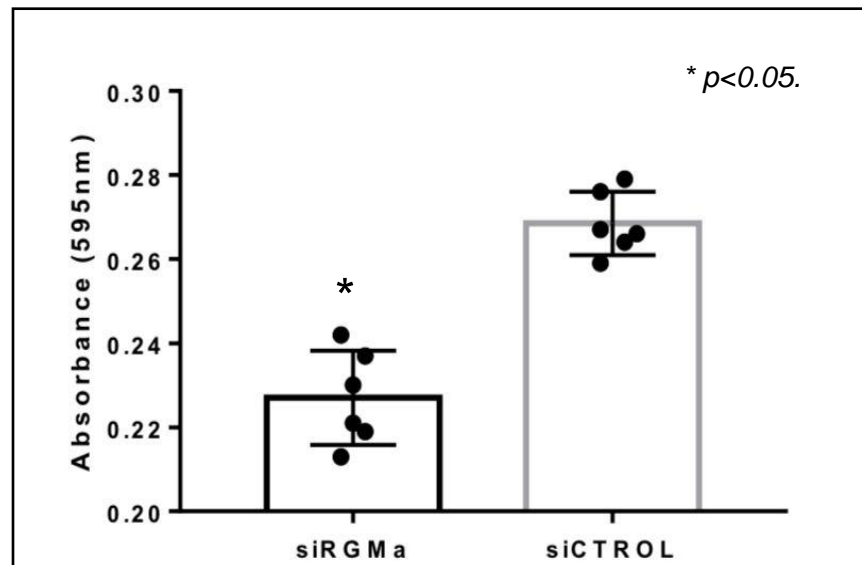
**Figura 15.** Análise da expressão relativa de transcritos de *RGMa* nas células satélites após o *knockdown* com siRNA-*RGMa*, comparado ao controle, obtidas por PCRq. As células satélites transfectadas com siRNA-*RGMa* sofreram uma diminuição significativa da expressão de *RGMa*, comparada aos níveis de expressão observados nas células transfectadas com o controle. Significância estatística \*  $p < 0.05$ .

### 4.3 Avaliação dos efeitos do *knockdown* de *RGMa*

Após confirmar o sucesso na indução do *knockdown* na expressão de *RGMa* nas células satélites, nós passamos a investigar os efeitos da ausência de transcritos para este orientador de axônio sobre (i) a viabilidade celular, (ii) a expressão de genes associados à proliferação celular e (iii) a expressão do marcador de proliferação celular ki67.

#### 4.3.1 Avaliação dos efeitos do *knockdown* de *RGMa* sobre a viabilidade das células satélites.

Nesta etapa, investigamos os efeitos do *knockdown* do gene *RGMa* na viabilidade das células satélites. Utilizamos o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular. Os resultados indicaram uma redução significativa na viabilidade das células satélites tratadas com siRNA-*RGMa*, em comparação com as células tratadas com siRNA-CTRL (Figura 16). Essa observação sugere que a ausência ou baixos níveis de transcritos de *RGMa* afetam negativamente a viabilidade das células satélites em cultura.

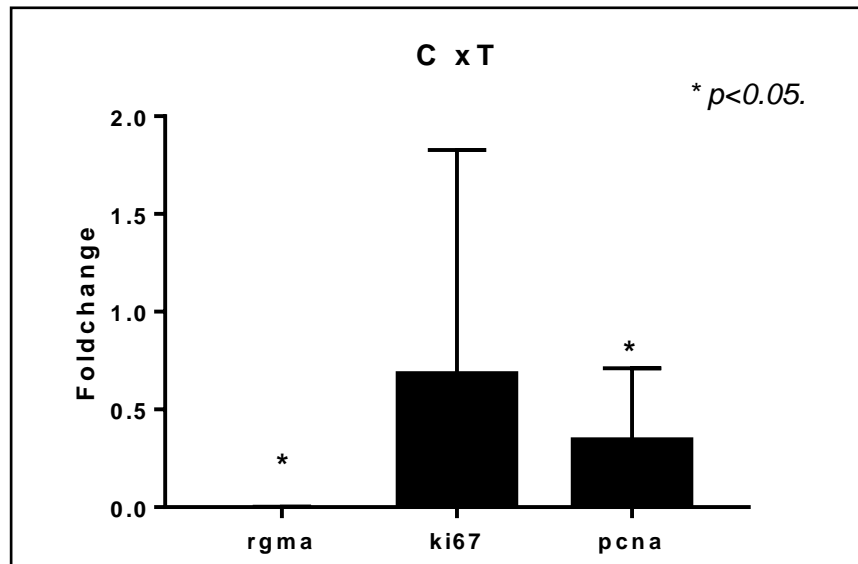


**Figura 16.** Resultado do ensaio de MTT após a transfecção de células satélites com siRNA-RGMa e siRNA-CTRL. Foi possível observar uma diminuição significativa da viabilidade das células satélites tratadas com siRNA-RGMa em comparação com o controle.

#### 4.3.2 Avaliação dos efeitos do *knockdown* de *RGMa* sobre a expressão de genes associados à proliferação celular, por PCRq

A análise quantitativa foi realizada para avaliar os efeitos da ausência de transcritos para *RGMa* na expressão de marcadores de proliferação celular (*Ki67* e *PCNA*).

Os resultados mostram que as expressões de *ki67* e *PCNA* foram reprimidas nas amostras transfectadas com siRNA-RGMa, quando comparadas ao controle, mas sendo significativa apenas na expressão de *PCNA* (Fig.17). Juntos, estes dados sugerem que a ausência de transcritos de *RGMa* interfere na expressão de marcadores de proliferação celular.



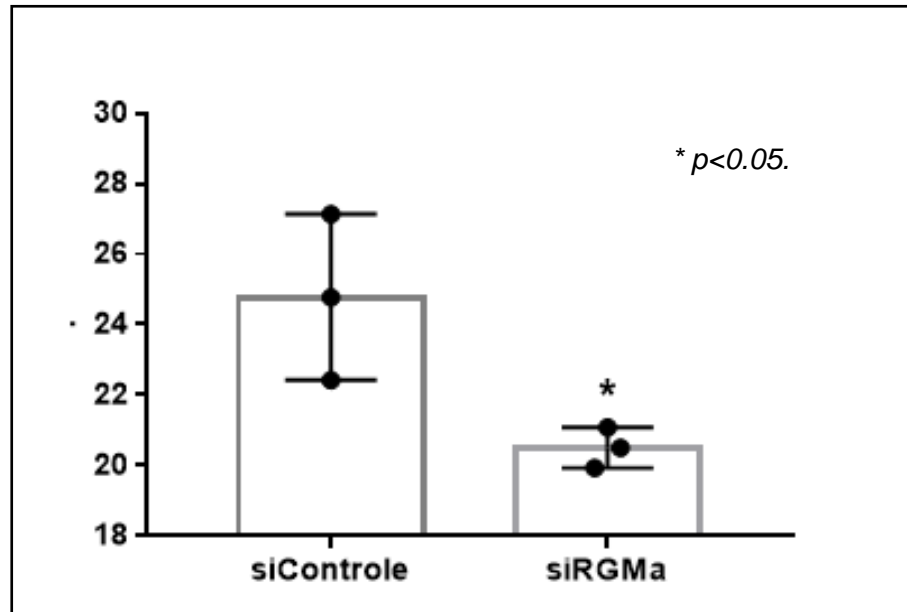
**Figura 17.** Expressão relativa de *RGMa*, *Ki67* e *PCNA* em células satélites tratadas com siRNA-CTRL x siRNA-RGMA. O *knockdown* de *RGMa* induziu a repressão significativa na transcrição de *RGMa* e *PCNA*, comparado às amostras controle. Análise realizada pelo REST2009. \* $p < 0,05$ .

#### 4.3.3 Avaliação dos efeitos do *knockdown* de *RGMa* sobre a expressão do marcador de proliferação celular *Ki67*

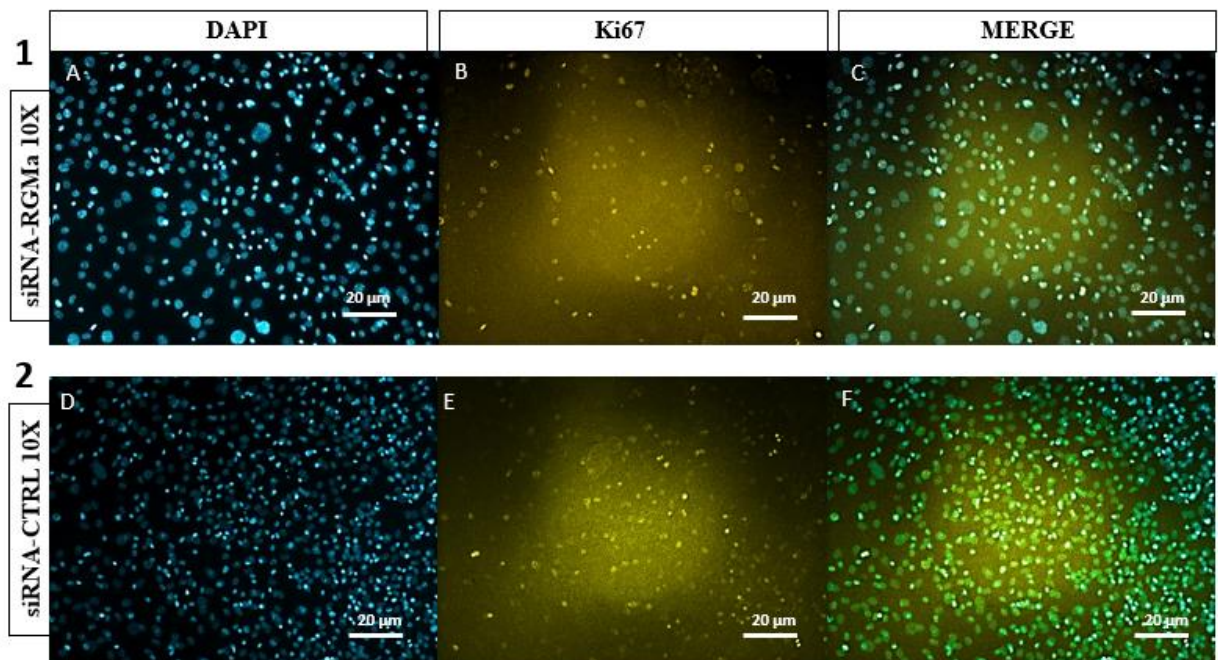
Mais uma vez nossos resultados mostram que a ausência de transcritos de *RGMa* nas células satélites interfere na proliferação das células satélites, uma vez que as células transfectadas com siRNA-RGMA apresentaram um número significativamente menor de núcleos *ki67*-positivos, comparadas às células transfectadas com siRNA-CTRL (Fig. 18 e 19).

A morfologia das células também foi avaliada em microscópio invertido, antes da contagem dos núcleos, para investigar se houve uma diferença após o *Knockdown*, em relação ao controle. Não foi observado nenhuma diferença considerável nessas células que pudesse concluir que a ausência dos transcritos de *RGMa* afetaria também na sua morfologia, mas sim uma diminuição significativa na expressão de genes que marcam proliferação celular, como mostrado no gráfico a seguir.





**Figura 18.** Análise do número de núcleos Ki67-positivos nas células satélites após o *knockdown* com siRNA-RGMa.



**Figura 19.** Padrão de expressão de ki67 nas células satélites, após o *knockdown* com siRNA-RGMa (aumento de 10x). Em (1) células que foram transfectadas com siRNA-RGMa, (A) marcação com DAPI; (B) Núcleos marcados com ki67, e (C) sobreposição de A e B. Em (2) representando o controle, (D) marcação com DAPI, (E) marcação dos núcleos com ki67, e (F) sobreposição de D e E. A documentação dos resultados foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss® Axio Vert.A1, e as imagens foram coletadas de 5 áreas por poço.

## 5 DISCUSSÃO

RGMa foi o primeiro membro da família RGM descrito atuando como pista repulsiva para o crescimento axonal (Monnier et al.,2002). Mais tarde, os outros membros da família foram encontrados e descritos com base na semelhança entre sua sequência, sendo eles: RGMb, RGMc e RGMd (Hata et al.,2006; Liu et al.,2009). Além do papel extensivamente estudado no tecido neuronal, RGMa foi ainda encontrado por nosso grupo de pesquisa, como sendo expresso no tecido muscular esquelético (Jorge et al.,2012). Trabalhos diferentes do nosso grupo, vem consistentemente comprovando que RGMa é capaz de promover a hiperplasia e hipertrofia das células musculares esqueléticas, quando cultivadas em meio de diferenciação (Martins et al., 2015; Costa et al., 2021, Copola et al., 2022). Esses membros da família RGM têm papéis variados e podem estar envolvidos em processos além do crescimento axonal. Em resumo, RGMa desempenha funções importantes tanto no sistema nervoso quanto no tecido muscular esquelético, e suas atividades são objeto de pesquisa contínua para entender melhor seus mecanismos e implicações.

O presente estudo procurou investigar o padrão de expressão e as possíveis funções desempenhadas por RGMa nas células-tronco musculares esqueléticas, conhecidas como células satélites. Essas células são extremamente importantes para o tecido muscular, pois são responsáveis por reativar o processo de crescimento e regeneração desse tecido em indivíduos após o nascimento (Juergen et al., 2011). Portanto, entender o funcionamento dessas células é um grande desafio na ciência atual. Isso possibilita o desenvolvimento de futuras terapias celulares para tratar doenças que levam à perda de massa muscular. Além disso, essas pesquisas podem ter aplicações em outras áreas, como a produção de carne ou o esporte.

A primeira pergunta que fizemos neste trabalho, foi onde RGMa estaria localizada nas células satélites, e se o seu padrão de expressão mudaria em condições de ativação dessas células, a partir do estado quiescente até a proliferação e diferenciação em miotubos maduros. Curiosamente, nossas análises revelaram que RGMa apresenta expressão mais abundante no núcleo, mas com alguma expressão citoplasmática nas células satélites, desde seu estado ativado até a sua diferenciação em cultura. O padrão de expressão esperado, era que RGMa fosse encontrado exclusivamente na membrana plasmática da célula satélite (assim como de todas as

células), uma vez que se trata de proteína de matriz extracelular, contendo uma cauda glicosilfosfatidilinositol (GPI) em sua porção C-terminal, que permite a sua ligação à membrana plasmática das células, via o receptor Neogenina (Tassew et al., 2012; Tian & Liu, 2013). A presença de RGMa no núcleo e citoplasma das células satélites, levantou a hipótese de que RGMa esteja sendo processada, e encaminhada para dentro da célula, para desempenhar alguma função diferente da esperada para a proteína presente na membrana. Essa descoberta abre novas perspectivas para entender o papel multifacetado do RGMa no contexto da regulação muscular, e pode ter implicações importantes para futuras terapias celulares.

O padrão de expressão de RGMa nas células satélites levantou uma segunda pergunta a ser respondida por este trabalho: por que o RGMa estaria no núcleo das células satélites? A presença de uma proteína no núcleo sugere sua participação na proliferação celular, ou na regulação da expressão gênica.

Para responder esta pergunta, nós decidimos promover o *knockdown* dos transcritos endógenos de RGMa nas células satélites, pelo mecanismo de RNA de interferência. Por este método, um RNA fita dupla é sintetizado comercialmente de forma a conter sequências que sejam complementares à sequência de RNAm do alvo que precisa ser bloqueado. Ao ser introduzido na célula, este RNA dupla fita é clivado em fitas simples, que são então reconhecidas pelo complexo RISC. O complexo RISC associado à uma dessas fitas simples de RNA, migram pelo citoplasma da célula até encontrar o RNAm endógeno, com complementariedade de bases com o RNA de interferência. Ao encontrar seu par complementar, o RNA de interferência forma uma fita dupla com o RNAm alvo, o que é suficiente para ativar na célula um mecanismo de bloqueio da tradução deste RNAm, ou de destruição desse RNAm, resultando em ambos os casos na diminuição dos RNAm disponíveis para serem traduzidos em proteína nas células (Franca, et al. 2010). Portanto, o método de RNA de interferência é considerado uma forma de induzir o *knockout* de forma transiente (temporária) nas células. Utilizando este método, fomos capazes de reduzir significativamente o número de transcritos para *RGMa* nas células satélites, o que foi comprovado pela quantificação por PCRq.

A partir desta comprovação, iniciamos investigando se a ausência de transcritos de *RGMa* poderiam resultar em efeitos na viabilidade dessas células-tronco musculares. Os efeitos sobre a viabilidade celular foram avaliados pelo ensaio de MTT. Este é um ensaio colorimétrico que permite quantificar a atividade das enzimas

oxidorreduções das mitocôndrias. Células que apresentam maior atividade dessas enzimas, são consideradas mais viáveis (Bournine, 2017). Este ensaio também é muito utilizado para se aferir efeitos sobre a proliferação celular, de forma indireta, uma vez que células mais viáveis proliferam mais (Bournine, 2017; Oliveira, 2009). Nossos resultados, revelaram que a ausência de transcritos para *RGMa* foi capaz de comprometer significativamente a viabilidade, e de forma indireta, a proliferação das células satélites, quando comparado ao controle.

Os efeitos de *RGMa* na viabilidade das células satélites durante os processos de regeneração muscular ainda não estão completamente elucidados. No entanto, os achados deste estudo fornecem evidências do papel regulador do *RGMa* na viabilidade dessas células *in vitro*. É importante ressaltar que, embora tenhamos observado a influência de *RGMa* nas células satélites em cultura, estudos mais aprofundados são necessários. Essas investigações devem buscar entender os mecanismos moleculares específicos pelos quais *RGMa* afeta a viabilidade celular durante os estágios de proliferação. Essa análise deve ser realizada tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, é crucial considerar que as células satélites respondem a estímulos variados, dependendo do ambiente e das condições presentes. Portanto, compreender como o *RGMa* interage com outros fatores e sinalizações é fundamental para desvendar seu papel completo na regulação da viabilidade celular.

Como o MTT não é um ensaio que avalia diretamente o ciclo celular e a proliferação, decidimos avaliar os efeitos do *knockdown* de *RGMa* também sobre a expressão de genes associados ao ciclo celular, como *ki67* e *PCNA*. O gene *ki67* codifica uma proteína envolvida na segregação dos cromossomos e na regulação da divisão nuclear mitótica (Bullwinkel et al., 2006). Já o *PCNA* é um gene que codifica para um cofator da DNA polimerase delta, portanto, associado com a alongação da fita de DNA durante a replicação (Sakurai et al., 2005).

A expressão desses transcritos foi avaliada por PCRq e análise da quantificação de células Ki67-positivas, detectadas por imunofluorescência. Nossos resultados de PCRq revelaram que o *knockdown* de *RGMa* induziu a diminuição significativa na expressão de *PCNA*, comparado ao controle. Nenhum efeito significativo foi observado sobre a expressão de *ki67*. A análise de quantificação de células marcadas por fluorescência revelou, no entanto, um efeito significativo na quantidade de células Ki67-positivas, com uma redução significativa nesse número

nas células transfectadas com siRNA-RGMA, comparado ao controle. As diferenças observadas nos efeitos sobre a expressão de Ki67 detectadas por PCRq e imunofluorescência, podem ser justificadas pela presença de isoformas de transcritos para Ki67, que sejam não associados à proliferação, mas quantificados por PCRq. Juntos, estes resultados sugerem um papel importante para RGMA na proliferação das células-tronco musculares em condições *in vitro*.

Os mecanismos que envolvem o controle da proliferação das células satélites *in vivo*, é extremamente complexo e envolve fatores que podem atuar de maneira direta ou indireta. Alguns autores apontam a participação efetiva da matriz extracelular (MEC) e fatores de crescimento na regulação desses processos (Yin, 2010). Os componentes da MEC, como laminina, fibronectina e colágeno, desempenham um papel importante na manutenção das células satélites no estado quiescente, na proliferação e fusão. Através da interação com a membrana plasmática, esses componentes podem desempenhar funções estruturais e regulatória, afetando a morfologia da célula, organização do citoesqueleto, biossíntese e expressão gênica (Shenkman, 2010; Dong, 2013). Nossos resultados trazem RGMA como um integrante do importante processo regulador da proliferação das células satélites. Um dos grandes desafios é buscar entender se em condições normais fora da cultura, RGMA também poderia afetar na proliferação dessas células, e se sua ausência poderia implicar na viabilidade celular. Qualquer que seja o estímulo desencadeador, as respostas obtidas de hiperplasia, hipertrofia ou simplesmente regeneração muscular, devem cursar com a ativação, proliferação e fusão das CS as fibras musculares já existentes, revelando a importância de RGMA para essas células e a regeneração do músculo esquelético.

Vários estudos têm demonstrado o alto poder proliferativo das células satélites (Sachec, 2015; Dong, 2013; Shenkman, 2010). No entanto, dados quantitativos também indicam que a proliferação das células satélites não é constante ao longo da vida (Sachec, 2015). Alguns autores sugerem que, à medida que o músculo atinge seu peso adulto, o número de células satélites diminui, e essa redução se intensifica com o envelhecimento. Por esse motivo, vários pesquisadores buscam entender quais fatores ou estímulos afetam o metabolismo dessas células em resposta à idade, lesões (sejam microlesões ou lesões mais graves) e doenças.

Com isso podemos concluir que RGMA: um regulador multifacetado nas células satélites do tecido muscular, além de ser uma molécula produzida pelo Sistema

Nervoso Central (SNC) e exercer a função de orientação repulsiva no crescimento axonal, o RGMA também é encontrado em diversos outros tecidos do corpo, incluindo o tecido muscular. No entanto, sua função específica nas células satélites do músculo esquelético é particularmente intrigante.

Nossas descobertas revelaram que RGMA desempenha um papel importante nas células satélites *in vitro*. Embora sua presença no núcleo e citoplasma tenha sido surpreendente, essa observação abre novas perspectivas para entender como essa molécula influencia a viabilidade e o comportamento dessas células.

Para avançar, novos estudos são necessários. Devemos analisar outros aspectos de RGMA, especialmente em resposta a miopatias, como distrofias e atrofas musculares. Essa pesquisa pode fornecer *insights* valiosos para o desenvolvimento de terapias celulares, e contribuir para o campo da ciência do desenvolvimento muscular. Suas implicações nas células satélites representam um importante avanço científico e motivam investigações futuras.

## 6 CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, foi possível concluir que:

- RGMa é expresso nas células satélites, as células-tronco musculares adultas;
- RGMa é predominantemente encontrado no núcleo das células satélites, tanto nos estágios de proliferação quanto na diferenciação celular, sugerindo um papel importante para este orientador de axônio com mecanismos de proliferação celular ou controle da expressão gênica;
- A ausência de RGMa compromete a viabilidade das células satélites em cultura;
- A ausência de RGMa compromete a expressão de marcadores associados à proliferação celular.

## 7 REFERÊNCIAS

AHRENS HE, HUETTEMEISTER J, SCHMIDT M, KAETHER C, VON MALT-ZAHN J (2018) Klotho expression is a prerequisite for proper muscle stem cell function and regeneration of skeletal muscle. *Skeletal Muscle* 8:20

ALVARES, L.E., F.R. SCHUBERT, C. THORPE, R.C. Mootoosamy, L. Cheng, G. Parkyn, A. Lumsden, S. Dietrich (2003) Intrinsic Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. *Dev Cell* 5: 379–390.

ALVARES, L.E., F.R. SCHUBERT, C. THORPE, R.C. Mootoosamy, L. Cheng, G. Parkyn, A. Lumsden, S. Dietrich (2003) Intrinsic Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. *Dev Cell* 5: 379–390.

ARTILHEIRO P; OLIVEIRA, E. N.; VISCARDI, C. S.; MARTINS M. D.; BUSSADORI S. K.; SANTOS K. P.; FERRAR R. A. Effects of continuous therapeutic ultrasound on proliferation and viability of C2C12 muscle cells. *Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo*, v.17, n.2, p.167-72, abr/jun. 2010.

ASAKURA, A.; RUDNICKI, M.A.; KOMAKI, M. Muscle Satellite Cells Are Multipotential Stem Cells That Exhibit Myogenic, Osteogenic, and Adipogenic Differentiation. *Differentiation* 2001, 68, 245–253.

ASAKURA, A.; SEALE, P.; GIRGIS-GABARDO, A.; RUDNICKI, M.A. Myogenic Specification of Side Population Cells in Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* 2002, 159, 123–134.

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



BABITT, J.L., Y. ZHANG, T.A. SAMAD, Y. XIA, J. TANG, J.A. CAMPAGNA, A.L. SCHNEYER, C.J. Woolf, H.Y. Lin (2005) Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a boné morphogenetic protein co-receptor. *J BiolChem* 280: 29820–29827.

BENTZINGER CF, WANG YX, DUMONT NA, RUDNICKI MA (2013) Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep*14:1062–1072

BONANOMI D & PFAFF SL (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2(3):1-19.

BONANOMI D & PFAFF SL (2010). Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2(3):1-19, 2010.

BOURNINE, LAMINE. Evaluation of the cytotoxic and cytostatic activities of alkaloid extracts from different parts of *Peganum harmala* L.(Zygophyllaceae). *European Journal of Integrative Medicine*, v. 9, p. 91-96, 2017.

BRACK, A.S.; CONBOY, I.M.; CONBOY, M.J.; SHEN, J.; RANDO, T.A. A Temporal Switch from Notch to Wnt Signaling in Muscle Stem Cells Is Necessary for Normal Adult Myogenesis. *Cell Stem Cell* 2008, 2, 50–59.

BRACK, A.S.; CONBOY, M.J.; ROY, S.; LEE, M.; KUO, C.J.; KELLER, C.; RANDO, T.A. Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* 2007, 317, 807–810.

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

CHILTON JK (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol*, 292(1):13-24.

CORDANI N, PISA V, POZZI L, SCIORATI C, CLEMENTI E (2014) Nitricoxide controls fat deposition in dystrophic skeletal muscle by regulating fibro-adipogenic precursor differentiation. *Stem Cells* 32:874–885

COSTA AC, COPOLA AGL, SOUZA CC, NOGUEIRA JM, SILVA GB, JORGE EC. (2021). RGMA can induce skeletal muscle cell hyperplasia via association with neogenin signaling pathway. *In vitro cell & Dev Biol – Animal*, 57:415-427.

DAMMONE G, KARAZ S, LUKJANENKO L, WINKLER C, SIZZANO F, JACOT G, MIGLIAVACCA E, PALINI A, DESVERGNE B, GILARDI F, FEIGE JN (2018) PPARgamma controls ectopic adipogenesis and cross-talks with myogenesis during skeletal muscle regeneration. *Int J Mol Sci* 19:E2044

DEMICHEVA E, CUI YF, BARDWELL P, BARGHORN S, KRON M, MEYER AH, SCHMIDT M, GERLACH B, LEDDY M, BARLOW E, O'CONNOR E, CHOI CH, HUANG L, VELDMAN GM, RUS H, SHABANZADEH AP, TASSEW NG, MONNIER PP, MÜLLER T, CALABRESI PA, SCHOEMAKER H, MUELLER BK. (2015). Targeting repulsive guidance molecule A to promote regeneration and neuroprotection in multiple sclerosis. *Cell Rep.*, 10(11):1887-98.

FENG J, WANG T, LI Q, WU X, QIN X. (2012). RNA interference against repulsive Guidance molecule A improves axon sprout and neural function recovery of rats after MCAO/reperfusion. *Exp Neurol.*, 238(2):235-42.

FENG Y., DUAN C., LUO Z., XIAO W., TIAN F. Silencing miR-20a-5p inhibits axonal growth and neuronal branching and prevents epileptogenesis through RGMA-RhoA-mediated synaptic plasticity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.24(18):10573–10588, 2020.

FIELDING RA, MANFREDI TJ, DING W, FIATARONE MA, EVANS WJ, CANNON JG (1993) Acute phase response in exercise. III. Neu-trophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am JPhysiol* 265:R166–R172

FITZGERALD, Daniel P.; SEAMAN, Clare; COOPER, Helen M. Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo. *Developmental dynamics*, v. 235, n. 6, p. 1720-1725, 2006.

H. F.; WALLSTRÖM, E.; HILLERT, J.; ALFREDSSON, L.; KOCKUM, I.; HARADA, Ryuichi et al. 18F-THK5351: a novel PET radiotracer for imaging neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 2, p. 208-214, 2016.

HARADA, Ryuichi et al. 18F-THK5351: a novel PET radiotracer for imaging neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 2, p. 208-214, 2016.

HATA, Katsuhiko et al. RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. **The Journal of cell biology**, v. 173, n. 1, p. 47-58, 2006.

HAWKE TJ, GARRY DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;9(2):534-51.

ISAKSEN T. J., YAMASHITA T. Repulsive guidance molecule a regulates adult neurogenesis via the neogenin receptor. *Neuroscience Insights*. 2020.

IMBESI R, D'AGATA V, MUSUMECI G, CASTROGIOVANNI P. [Skeletal muscle: from development to function]. *Clin Ter*. 2014;165(1):47-56.

JOE AW, YI L, NATARAJAN A, LE GRAND F, SO L, WANG J, RUDNICKI MA, ROSSI FM (2010) Muscle injury activates resident fbro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 12:153–163

JORGE, E. C. et al. RGMa and RGMb expression pattern during chicken development suggest unexpected roles for these repulsive guidance molecules in notochord formation, somitogenesis, and myogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 241, n. October, p. 1886– 1900, 2012.

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

KADI F, ERIKSSON A, HOLMNER S, THORNELL LE. Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strength-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31(11):1528-34.

KOOK, S.; CHOI, K.; SON, Y.; LEE, K.; HWANG, I.; LEE, H.; CHANG, J.; CHOI, I.; LEE, J.C. Satellite Cells Isolated from Adult Hanwoo Muscle Can Proliferate and Differentiate into Myoblasts and Adipose-like Cells. *Mol. Cells* 2006, 22, 239–245.

KORECKA J., MOLONEY E., EGGERS R., et al. Repulsive guidance molecule a (RGMa) induces neuropathological and behavioral changes that closely resemble Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience.* 2017;37(39):9361–9379.

KUNINGER D, KUNS-HASHIOMOTO R, KUZMICKAS R, ROTWEIN P (2006). Complex biosynthesis of the muscle-enriched iron regulator RGMc. *J. Cell Sci.*, 119:3273-3283.

KUNINGER D, KUZMICKAS R, PENG B, PINTAR J, ROTWEIN P (2004). Gene discovery by microarray: identification of novel genes induced during growth factor-mediated muscle cell survival and differentiation. *Genomics*, 84:876-889.

LAH, Grace J.; KEY, Brian. Novel roles of the chemorepellent axon guidance molecule RGMa in cell migration and adhesion. *Molecular and cellular biology*, v. 32, n. 5, p. 968-980, 2012.

LIU, X., M. HASHIMOTO, H. HORII, A. YAMAGUCHI, K. NAITO, T. YAMASHITA (2009) Repulsive guidance molecule b inhibits neurite growth and is increased after spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 795–800.

LOPES-MARTINS RAB, MARCOS RL, LEONARDO PS, PRIANTI JR AC, MUSCARÁ MN, AIMBIRE F, FRIGO L, IVERSEN VV, BJORDAL JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol* 2006;101:283–288.

MAIER A, ZHOU Z, BORNEMANN A. The expression profile of myogenic transcription factors in satellite cells from denervated rat muscle. *Brain Pathol.* 2002;12(2):170-7.

MALEKZADEH A., LEURS C., VAN WIERINGEN W., et al. Plasma proteome in multiple sclerosis disease progression. *Annals of Clinical Translational Neurology.* 2019;6(9):1582–1594. doi: 10.1002/acn3.771

MARQUES MM, PEREIRA NA, FUJIHARA NA, NOGUEIRA FN, EDUARDO CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2004;34(3): 260–265

MARTINS, Aline Fagundes et al. 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**, v. 200, n. 5, p. 326-338, 2014.

MATSUNAGA, Eiji; CHÉDOTAL, Alain. Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development. **Development, growth & differentiation**, v. 46, n. 6, p. 481-486, 2004.

MATSUNAGA, Eiji; NAKAMURA, Harukazu; CHÉDOTAL, Alain. Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 22, p. 6082-6088, 2006.

MENEGUZZO DT. Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser de baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana.[Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

METZGER M., CONRAD S., SKUTELLA T., JUST L. RGMA inhibits neurite outgrowth of neuronal progenitors from murine enteric nervous system via the neogenin receptor in vitro. *Journal of Neurochemistry*. 2007;103(6):2665–2678.

MUELLER BK, YAMASHITA T, SCHAFFAR G, MUELLER R (2006). The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 361:1513-1529.

MÜLLER T, TROMMER I, MUHLACK S, MUELLER BK (2016). Levodopa increases oxidative stress and repulsive guidance molecule A levels: a pilot study in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 123(4):401-6.

MURAMATSU, Rieko et al. RGMA modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis. **Nature medicine**, v. 17, n. 4, p. 488-494, 2011.

NECKEL P. H., MOHR R., ZHANG Y., HIRT B., JUST L. Comparative microarray analysis of proliferating and differentiating murine ENS progenitor cells. *Stem Cells International*. 2016;2016:13. doi: 10.1155/2016.

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

NOHRA, R.; BEYEEN, A. D.; GUO, J. P.; KHADEMI, M.; SUNDQVIST, E.; OLDEKAMP J, KRAMER N, ALVAREZ-BOLADO G, SKUTELLA T (2004). Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. *Gene Expr. Patterns*, 4:283-288.

OLDEKAMP J, KRAMER N, ALVAREZ-BOLADO G, SKUTELLA T (2004). Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. *Gene Expr. Patterns*, 4:283-288.

OLDEKAMP, J.; KRAMER, N.; ALVAREZ-BOLADO, G.; SKUTELLA, T. (2004). neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *The Journal of cell biology*, v. 127, n. 6, p. 2009-2020.

PEDERSEN, B. K. (2011). Muscle and their myokines. *J. Exp. Biol.*, 214, pp.

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

ROSENBLATT JD, LUNT AI, PARRY DJ, PARTRIDGE TA. (1995). Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 31(10):773-779.

SAHU A, MAMIYA H, SHINDE SN, CHEIKHI A, WINTER LL, VO NV, STOLZ D, ROGINSKAYA V, TANG WY, ST CROIX C, SANDERS LH, FRANTI M, VAN HOUTEN B, RANDO TA, BARCHOWSKY A, AMBROSIO F (2018) Age-related declines in alpha-Klotho drive progenitor cell mitochondrial dysfunction and impaired muscle regeneration. *Nat Commun* 9:4859

SAMAD, T. A et al. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 14, p. 14122–9, 8 abr. 2005.

SAMAD, Tarek A. et al. 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. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 2027-2036, 2004.

- SATO H J, TABUNOKI H, ISHIDA T, SAITO Y, ARIMA K. (2013). Accumulation of a Repulsive axonal guidance molecule RGMa in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 39(2):109-20.
- SHABANZADEH AP, TASSEW NG, SZYDLOWSKA K. (2015). Uncoupling Neogenin association with lipid rafts promotes neuronal survival and functional recovery after stroke. *Cell Death & Disease*, 6: e1744.
- SONG M., TIAN F., XIA H., XIE Y. Repulsive guidance molecule a suppresses seizures and mossy fiber sprouting via the FAK-p120RasGAP-Ras signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2019;19(4):3255–3262.
- 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.
- TAJBAKHS S. (2009) Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med*. 266(4):372-89.
- TIAN C & LIU J (2013). Repulsive guidance molecules (RGMs) and neogenin in bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *Mol. Reprod. Dev.*, 80(9):700-1.
- YIN H, PRICE F, RUDNICKI MA (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 93:23–67 Tidball JG (1995) Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 27:1022–1032
- YIN, Hang; PRICE, Feodor; RUDNICKI, Michael A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 23-67, 2013.
- ZHAO ZW, LIAN WJ, CHEN GQ, ZHOU HY, WANG GM, CAO X, YANG HJ, HOU YP. (2012). Decreased expression of repulsive guidance molecule member A by DNA methylation in colorectal cancer is related to tumor progression. *Oncol Rep.*, 27(5):1653-9.



ZHOU, ZHENG ET AL. Neogenin regulation of BMP-induced canonical Smad signaling and endochondral bone formation. **Developmental cell**, v. 19, n. 1, p. 90-102, 2010.