

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**Terapia celular no tecido muscular: Influência do
HGF, matriz extracelular e metaloproteases na
migração de mioblastos humanos**

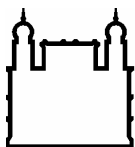
Wallace de Mello

Rio de Janeiro
Abril 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em biologia celular e molecular

Wallace de Mello

Terapia celular no tecido muscular: Influência do HGF, matriz extracelular e metaloproteases na migração de mioblastos humanos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Doutor em Biologia celular e
molecular

Orientador (es): Prof^{fa}. Dr^a. Suse Dayse Silva Barbosa
Prof. Dr. Wilson Savino

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M527

Mello, Wallace de

Terapia celular no tecido muscular: influência do HGF, matriz extracelular e metaloproteases na migração de mioblastos humanos / Wallace de Mello. – Rio de Janeiro, 2008.

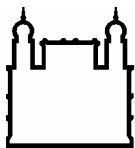
x, 107 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 89-107

1. Mioblastos. 2. Migração celular. 3. HGF. 4. Transplante. 5. Matriz extracelular. 6. Metaloproteases. I. Título.

CDD 574.88



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em biologia celular e molecular

Wallace de Mello

Terapia celular no tecido muscular: Influência do HGF, matriz extracelular e metaloproteases na migração de mioblastos humanos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Doutor em Biologia celular e
molecular.

Orientador (es): Prof. Dr. Wilson Savino
Prof^a. Dr^a. Suse Dayse Silva Barbosa

Aprovada em: 14/04/2008

Examinadores: Prof^a. Dr^a. Andréa Henriques Pons - Presidente
Prof^a. Dr^a. Claudia dos Santos Mermelstein
Prof. Dr. Marco Aurélio Martins

Apoio e suporte financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, localizado no Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, Brasil com o apoio financeiro das seguintes entidades:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
 - Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Programa CAPES – COFECUB.
 - Fundação Oswaldo Cruz – Programa INSERM – FIOCRUZ.
-

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo amor e pelo apoio incondicional para que eu realizasse todos os meus objetivos.

Aos meus orientadores, Suse e Savino pela oportunidade oferecida para que eu crescesse tanto como pesquisador como pessoa.

Aos colaboradores do Hôpital Salpêtrière em Paris, Gillian e Vincent pelas inúmeras dicas e doação de reagentes.

A minha irmã Elizângela, minha grande companheira nessa jornada. Passamos por tantos momentos difíceis, mas graças a Deus estamos aqui juntos para o que der e vier.

A minha grande amiga Fernanda!!!!!!! Pela companhia e amizade desde a iniciação científica!!!!!!!!!! Passando pelos vários congressos!!!!!!!!!!E agora no nosso trabalho em colaboração!!!!!!!!!!

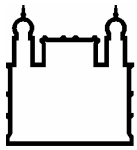
A minha “eterna aluna” Priscilla, obrigado por aturar minhas músicas que não terminavam. Saiba que tenho muito orgulho de ter participado do início de sua carreira de sucesso.

Aos amigos do Laboratório de pesquisas sobre o Timo por essa década maravilhosa de convivência, cada um de vocês tem um espaço importante na minha vida.

A toda equipe do Laboratório de Malária e Leishmaniose, do extinto departamento de imunologia do IOC, por “salvarem minha vida” diversas vezes disponibilizando suas dependências sempre que necessário.

A Dra. Patricia Jurgilas do Laboratório de Inflamação do IOC, pelas dicas dadas para o desenvolvimento da técnica de zimografia.

Aos componentes da banca que aceitaram gentilmente avaliar o meu trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Terapia celular no tecido muscular: Influência do HGF, matriz extracelular e metaloproteases na migração de mioblastos humanos

RESUMO

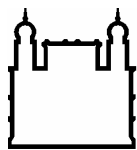
TESE DE DOUTORADO

Wallace de Mello

Um dos maiores desafios para o delineamento de terapia celular em doenças musculares é encontrar as condições ideais para a inserção das células do doador no músculo receptor. Na presente tese, avaliamos inicialmente o impacto da irradiação e criolesão local nos músculos de camundongos imunodeficientes Rag2^{-/-}/γC^{-/-}/C5^{-/-} no processo de transplante de mioblastos, analisando a migração, proliferação e sobrevivência dessas células. Vimos que, o tratamento prévio de músculos receptores com irradiação e criolesão promoveu um aumento na dispersão e sobrevivência dos precursores injetados. Além disso, observamos acúmulo das células transplantadas em sítios onde foi detectado um aumento da deposição de laminina. Experimentos *in vitro* confirmaram que a laminina é capaz de induzir a migração, proliferação e sobrevivência dessas células.

Fatores de crescimento vêm sendo bastante utilizados como forma de promover aumento da dispersão das células ao longo músculo receptor. Nesse sentido definimos o papel do fator de crescimento de hepatócito (HGF) na migração dessas células frente a diferentes moléculas de matriz extracelular, relacionando tal efeito com a produção de metaloproteases de matriz extracelular (MMP). HGF foi capaz de aumentar a migração mioblastos quando estes foram cultivados sobre laminina-111 ou fibronectina. Além disso, vimos por zimografia que diferentes doses de HGF foram capazes de aumentar a secreção de MMP-2, e que o bloqueio da produção dessa enzima poderia inibir parcialmente o incremento de respostas migratória induzido por HGF e proteínas de matriz extracelular. Tomados em conjunto, estes dados sugerem um efeito conjunto de MMP-2 e HGF. Nesse sentido, tais interações devem ser levadas em conta nas tentativas de aumentar a migração de precursores miogênicos *in vivo*.

Palavras-chave: 1. Mioblastos 2. Migração celular 3. HGF 4. Transplante 5. Matriz extracelular 6. Metaloproteases



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Terapia celular no tecido muscular: Influência do HGF, matriz extracelular e metaloproteases na migração de mioblastos humanos

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Wallace de Mello

One major challenge in developing cell therapy for muscle diseases is to define the best condition for the recipient's muscle to niche donor cells. We have examined the impact of local irradiation on Rag2⁻/gc⁻/C5⁻ immunodeficient mouse muscle after myoblast transplantation, analyzing its migration, proliferation and surviving. It was noticed that irradiation regimen lead an increasing on myoblast dispersion and surviving after four weeks post transplantation. Moreover, an increase on laminin deposition was seen, with accumulation of myoblasts in these laminin-enriched niches. *In vitro* experiments confirmed that laminin may enhance recruitment, proliferation and surviving of these cells.

The use of growth factors to enhance cell dispersion along recipient's muscle has been studied for the last decades. In this way, we defined the role of HGF on extracellular matrix-driven migration relating its involvement with matrix metalloproteases (MMP). Our data demonstrated that Hepatocyte growth factor (HGF) was able to increase myoblast migration upon laminin-111 and fibronectin substrates. By zymography, different doses of HGF were able to induce MMP-2 up-regulation and, when this enzyme was blocked, the increment on HGF-induced migration was no longer seen. Taken together, these data point to a concerted role of MMP-2 and HGF upon the migration of human myoblasts mediated by extracellular matrix proteins. In this respect, these interactions should be taken into account for better designing therapeutical strategies aiming to improve migration of human myogenic precursors *in vivo*.

Keywords: 1. Myoblasts 2. Cell migration 3. HGF 4. Transplantation 5. Extracellular matrix 6. Metalloproteinases

Abreviaturas

AAV – Vírus adeno-associado

BMD - Distrofia de Becker

BMP – Proteína morfogenética de osso

BrdU – 5-bromo-2'-desoxiuridina

CMD – Distrofia muscular congênita

DMD - Distrofia Muscular de Duchenne

ECM – Matriz Extracelular

EDMD – Distrofia de Emery-Dreifuss

FGFb - Fator de crescimento fibroblástico básico

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina- I

LGMD – Distrofia muscular do tipo cintura

MMP - Metaloprotease

OPMD – Distrofia da musculatura orofaríngea

PBS – Tampão fosfato

PGI2 - prostaciclina

PTC – Códon de terminação prematura

rAAV – Vírus adeno-associados recombinantes

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR - Reação de polimerase em cadeia precedida de transcrição reversa

SP – *Side population*

TGF- β - Fator de crescimento de transformação – beta

VLA – “Very late antigen”

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	viii
Abreviaturas	ix
1 – Introdução	1
1.1 - Estrutura e desenvolvimento do tecido muscular esquelético	1
1.2 - Distrofias musculares	10
1.2.1- Descrição geral	10
1.2.2 - Alternativas de correção	14
1.2.2.1 - Terapia celular	15
1.2.2.2 - Modulação gênica	19
1.2.2.3 - Limitações das terapias celular e gênica	22
1.3 - Fatores que influenciam a migração celular	25
2 – Justificativa e Objetivos	30
3 – Resultados	31
3.1 – Artigo 1 – Human myoblast engraftment is improved in laminin enriched microenvironment.	31
3.2 – Artigo 2 – HGF enhances extracellular matrix-driven migration of human myoblasts: involvement of matrix metalloproteases	42
4 – Discussão	79
5 – Conclusões	88
6 – Referências bibliográficas	89

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Estrutura e desenvolvimento do tecido muscular esquelético

O tecido muscular esquelético é constituído por unidades contráteis denominadas de fibras musculares. Cada fibra muscular é uma célula multinucleada (sincício) que contém no seu citoplasma estruturas altamente diferenciadas, as miofibrilas. Estas, por sua vez, são formadas por proteínas contráteis, organizadas em unidades funcionais repetitivas, os sarcômeros, responsáveis pelo fenómeno de contração muscular. Em função da composição molecular dos sarcômeros, as fibras podem apresentar propriedades mecânicas e energéticas distintas. Cada sarcômero é composto por 2 proteínas majoritárias: a actina, e a miosina, proteína mais abundante no músculo (Figura 1). Duas isoformas de actina podem ser expressas pela fibra muscular estriada humana: a α -esquelética, e a α -cardíaca (Gunning *et al*, 1997). A actina se apresenta em sua forma monomérica como uma proteína globular de aproximadamente 41kDa. Em função da polimerização desses monômeros são formados filamentos finos, os filamentos de actina, aos quais outras proteínas como a troponina e tropomiosina estão associadas (Milligan *et al*, 1990). A miosina por sua vez é formada a partir da associação de moléculas de MHC (*myosin heavy chain*, cadeia pesada da miosina), e moléculas MLC (*myosin light chain*, cadeia leve da miosina). Tais cadeias se associam, formando uma estrutura em hélice com domínios globulares, os quais contém sítios catalíticos para hidrólise de ATP, sendo também responsáveis pela interação com a actina, permitindo assim o movimento de contração (Hayashibara & Miyanishi, 1994).

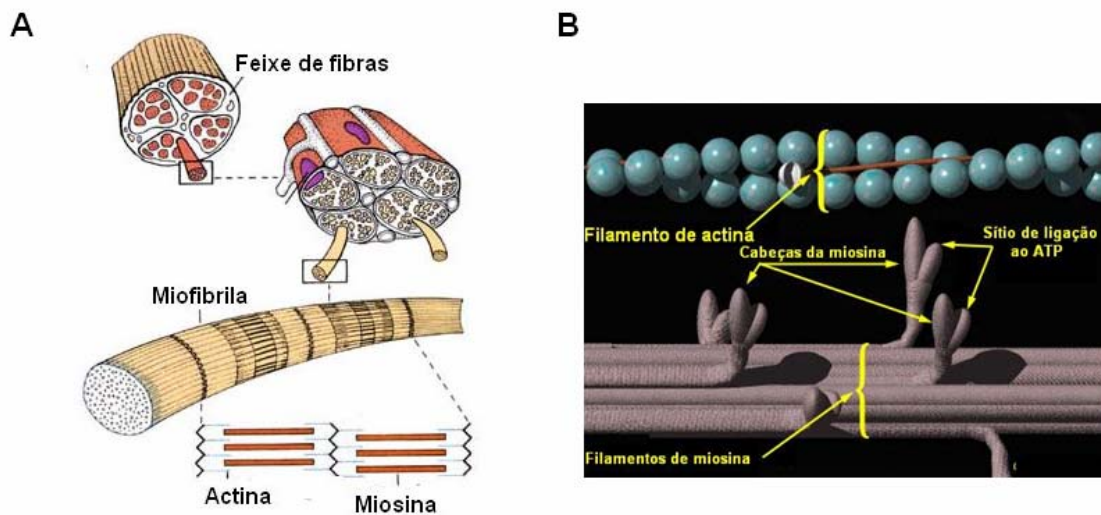


Figura 1. Esquema da anatomia do músculo esquelético. (A) Organização estrutural do músculo estriado esquelético em feixes de fibras contráteis. (B) Representação da interação entre filamentos de actina e miosina. Figuras adaptadas a partir dos seguintes *websites*:

www.science-art.com/image.asp?id=1235&search=1 (painel A)

http://www.bgsu.edu/departments/chem/midden/chem308/MCO_Files/molecule.jpeg (painel B)

Em vertebrados, o tecido muscular é essencialmente originado a partir de uma estrutura mesodérmica embrionária transitória chamada somito, formado lateralmente ao tubo neural (Tajbakhsh & Buckingham, 2000). Inicialmente os somitos possuem uma característica epitelial que vai sendo modificada em função do processo de compartimentalização (figura 2). A porção ventral dessa estrutura passa a então ser denominada como esclerótomo, enquanto que a porção dorsal passa a ser chamada de dermatomiótomo. O esclerótomo torna-se responsável pela formação dos tecidos ósseo, conjuntivo e cartilaginoso que circundam estruturas neurais, enquanto que o dermatomiótomo contém precursores de linhagens miogênicas, dermatogênicas e angiogênicas (Revisto em Brand-saberi, 1996, Yusuf & Brand-Saberi, 2006).

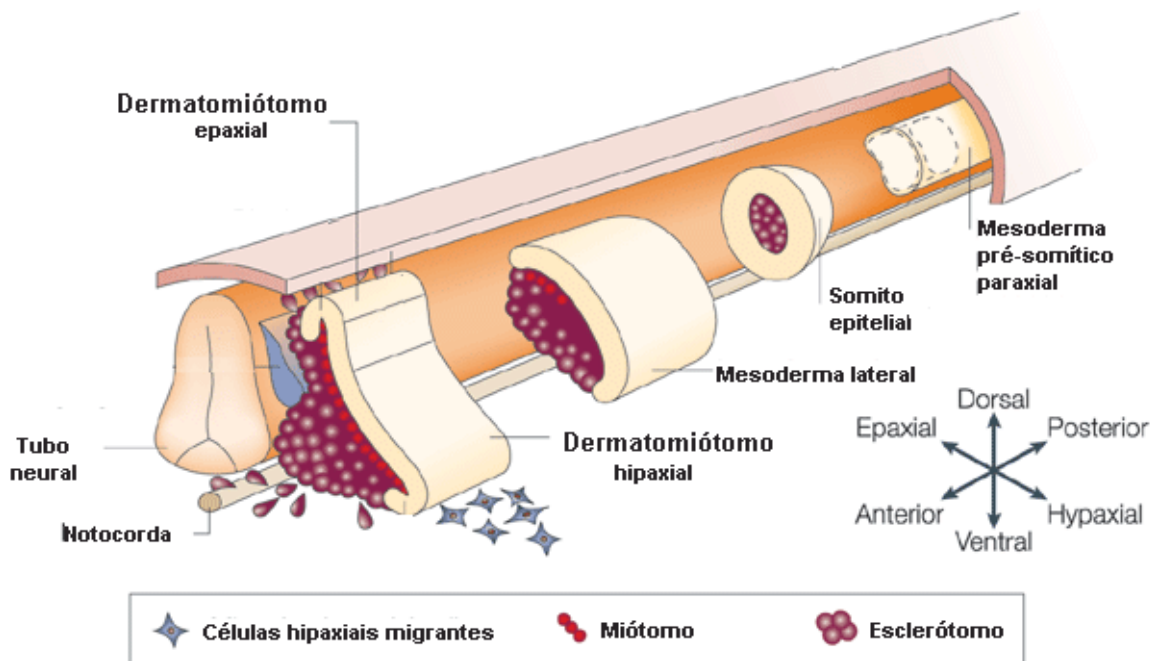


Figura 2. Representação esquemática da somitogênese. (Retirado de Parker *et al*, 2003).

No curso do desenvolvimento as estruturas axiais do embrião como tubo neural e notocorda, assim como as regiões laterais, mesoderma, e ectoderma dorsal produzem uma série de fatores necessários à formação de somitos e determinantes na diferenciação miogênica, tais como: SHH - *sonic hedgehog*, membros das famílias Wnt, moléculas da família do TGF- β - *transforming growth factor*, e as BMP – *bone morphogenic proteins* (revisto por Borycki & Emerson, 2000).

Por outro lado, a especificação de precursores mesodérmicos do somito na via miogênica é controlada pela interação de diferentes famílias de fatores de transcrição, e por sinais ativadores ou inibitórios, que são secretados no microambiente onde se encontram essas células. Durante a miogênese tais precursores passam seu ciclo passando a expressar genes específicos de célula muscular. Em função disso, alteram a morfologia e se fusionam formando sincícios (Tapscott, 2005).

Dentre os fatores importantes na determinação de quais células teriam a capacidade de migrar para formar conjuntos específicos de estruturas musculares maduras estão: Pax3, HGF e Ibx1. Tais moléculas são utilizadas como marcadores de precursores miogênicos localizados nos dermatomiôtomos laterais, responsáveis pela formação dos músculos dos membros e músculos hipaxiais (Mennerich *et al*, 1998; Brohmann *et al*, 2000; Haines *et al*, 2004).

O Pax3 é membro de uma família de fatores de transcrição regulados ao longo do desenvolvimento, sendo crítico na formação apropriada do embrião. Além da sua expressão no sistema nervoso central, Pax-3 é expresso precocemente nos somitos condensados, tornando-se, em torno do dia 11.5 da embriogênese murina, restrito à porção lateral.

A função de Pax3 na miogênese foi evidenciada através da análise de camundongos *Spotch*, que apresentam mutação espontânea para Pax3. Nesses animais os somitos são reduzidos, não sendo detectados os músculos dos membros (Goulding *et al*, 1994; Bober *et al*, 1994; Williams & Ordahl, 1994). Em humanos a deficiência em Pax-3 também causa distúrbios na formação do tecido muscular, acarretando em uma hipoplasia severa conhecida como síndrome de Waardenburg tipo 1 (Chalepakakis *et al*, 1994). Mais recentemente foi visto que na ausência de expressão de Pax-3, assim como de Pax-7 (Gros *et al*, 2005), progenitores musculares não entram na via de diferenciação do tecido muscular, adotando outros destinos (Relaix *et al*, 2005).

Outra molécula importante no desenvolvimento muscular é o fator de crescimento para hepatócitos (HGF). Inicialmente produzido pelas regiões primitivas dos membros em desenvolvimento, o HGF, através da interação com seu receptor do tipo tirosina quinase c-met, fornece sinais necessários para a transição epitélio-mesenquimal dos dermatomiôtomos, permitindo a sua delaminação e a migração de progenitores em favor de um gradiente de concentração (Sonnenberg *et al*, 1993; Bladt *et al*, 1995; Yang *et al*, 1996). A importância da interação entre essas moléculas na miogênese foi determinada através da análise em camundongos deficientes tanto para c-met quanto para

HGF (figura 3), os quais não apresentam músculos que são desenvolvidos a partir de precursores derivados dos dermatomiótomos (Bladt *et al*, 1995). A análise de camundongos *Spotch* mostra uma diminuição de c-met em somitos e membros em desenvolvimento, sugerindo que a expressão desse receptor seja induzida por Pax-3 (Epstein *et al*, 1996).

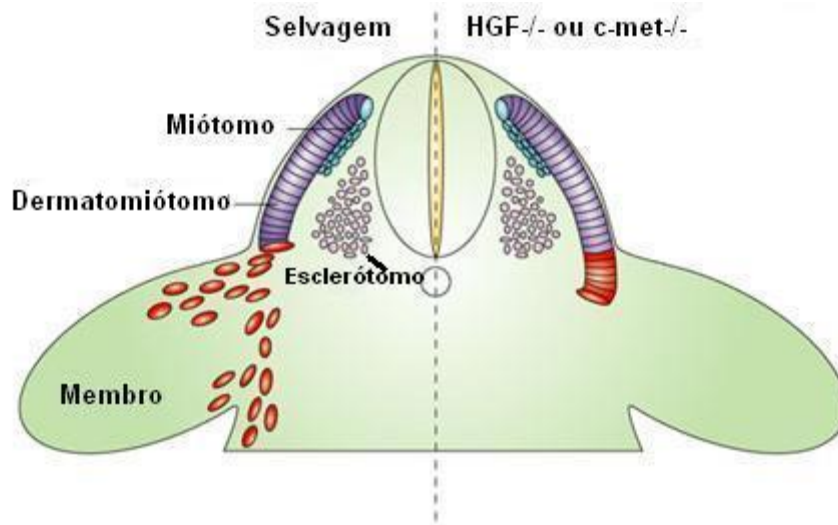


Figura 3. Esquema representando a importância do eixo HGF/ C-met na distribuição de precursores miogênicos durante desenvolvimento. (Extraído de Birchmeier *et al*, 2003)

Além desses fatores, vem sendo descrito que produtos de genes *homeoboxes* regulam diversos eventos como: segmentação, identidade celular e proliferação durante a miogênese. *Lbx1*, por exemplo, pertence a esta família de genes, sendo importante no processo de migração dos progenitores de somitos até os membros. Animais deficientes em *lbx1* apresentam delaminação dos progenitores musculares dos dermatomiótomos, e migração deficiente, permanecendo nos arredores dos somitos onde vão assumir destinos diferentes de células musculares. Em função disto ocorre o comprometimento da formação de músculos dorsais e dos membros, enquanto que a formação dos músculos ventrais apresenta-se inalterada (Schäfer & Braun, 1999).

O processo de diferenciação celular ocorre uma vez que progenitores migrantes alcançam os sítios de formação dos membros, ocorrendo uma mudança na expressão de alguns fatores de transcrição. Por exemplo, tais células deixam de expressar Pax3 e Lbx1, e passam a expressar uma família de fatores de transcrição regulatórios da miogênese – Myf5, MyoD, MRF4 e miogenina, expressos sequencialmente durante a diferenciação. Dessa forma podemos traçar os estágios iniciais da miogênese analisando a expressão de Myf-5/MyoD (Rudnicki, 1993) e estágios mais tardios por MRF4/miogenina (Borycki *et al.*, 1997). A importância de tais fatores foi evidenciada inicialmente em camundongos duplo-nocautes para Myf-5/MyoD, nos quais não foi detectada a formação de músculo (Rudnicki *et al.*, 1993; Tajbakhsh *et al.*, 1996). Nesse mesmo contexto, a inativação dos genes da miogenina e Mrf4 induziu sérios defeitos musculares, enfatizando o envolvimento desses fatores na diferenciação de precursores miogênicos. Além disso, foi demonstrado que estes últimos estão envolvidos com a fusão de mioblastos e formação de miotubos multinucleados (Wright *et al.*, 1989). Camundongos que não expressam miogenina apresentam número normal de mioblastos e fibras primárias, embora apresentem defeito na formação de fibras secundárias o que leva a uma deficiência severa na musculatura e morte logo após o nascimento (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993; Venuti *et al.*, 1995).

Além dos fatores citados acima, as moléculas de matriz extracelular, como fibronectina e laminina, e seus receptores são expressos ao longo do processo da miogênese participando em eventos de migração, proliferação e diferenciação. A expressão das cadeias $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$ foram detectadas nos miótomos de embriões no estágio E11.5, bem como a presença de laminina e fibronectina. As células que migram a partir dos dermomiótomos em direção às regiões de formação dos músculos dos membros expressam as cadeias $\alpha 5$, do receptor de fibronectina VLA-5, e $\alpha 1$, do receptor de laminina/colágeno VLA-1, mas não de $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$. Dessa forma essas células possuem a capacidade de interagir com essas proteínas de matriz participando assim do processo inicial de recrutamento de células miogênicas. No entanto foi notado que existe um

acúmulo de fibronectina entre as células precursoras que migraram para a região de pré-massa muscular, mas não de laminina que vai surgir nessa região somente em E12.5 (Cachaço, 2005). Seguindo as etapas do desenvolvimento muscular, a fusão de mioblastos embrionários leva à formação de pequenas fibras musculares, um processo mediado por moléculas de superfície como N-CAM (CD56), N- e M-caderina (Arnold & Braun, 2000). Com a formação dos miotubos primários em E13.5, foi possível notar a expressão dos receptores de laminina VLA-6 e VLA-7 e da organização de laminina-211 ao redor dos miotubos formados. A fibronectina e seus receptores permaneceram expressos durante essa fase (Cachaço, 2005).

Durante sua diferenciação, as fibras musculares podem diferir umas das outras, quanto à expressão de genes da família da miosina. Tais diferenças são refletidas na função e contração das fibras musculares baseadas nas propriedades enzimáticas dos genes que elas codificam (Reiser, 1988). Em modelo murino foi demonstrado que os tipos de fibras são definidos ao longo do desenvolvimento (Pin & Merrifield, 1993).

O músculo esquelético adulto é um tecido estável, composto de fibras musculares pós-mitóticas multinucleadas, e por uma pequena população de células mononucleares (Clegg & Hauschka, 1987). Após o nascimento, a reparação e crescimento desse tecido ocorrem através da ativação dessa população mononuclear mantida como uma população de reserva, e que se mantém quiescente no músculo maduro (Schultz *et al*, 1978). São as chamadas células satélites (Mauro, 1961). Mais recentemente outras populações, que também guardam características de células-tronco, vêm sendo caracterizadas, estando possivelmente envolvidas no processo de regeneração do tecido muscular (Sambasivan & Tajbakhsh, 2007).

Anatomicamente, as células satélites estão dispostas adjacentes à fibra muscular (Figura 4), ocupando um espaço entre a lâmina basal e membrana plasmática (Hawke & Garry, 2001). Após ativadas, em função de uma lesão traumática, ou uma patologia, parte desta população sai do estado de

quiescência, seguindo então as etapas de proliferação, diferenciação em mioblastos, fusão e formação de fibra muscular madura

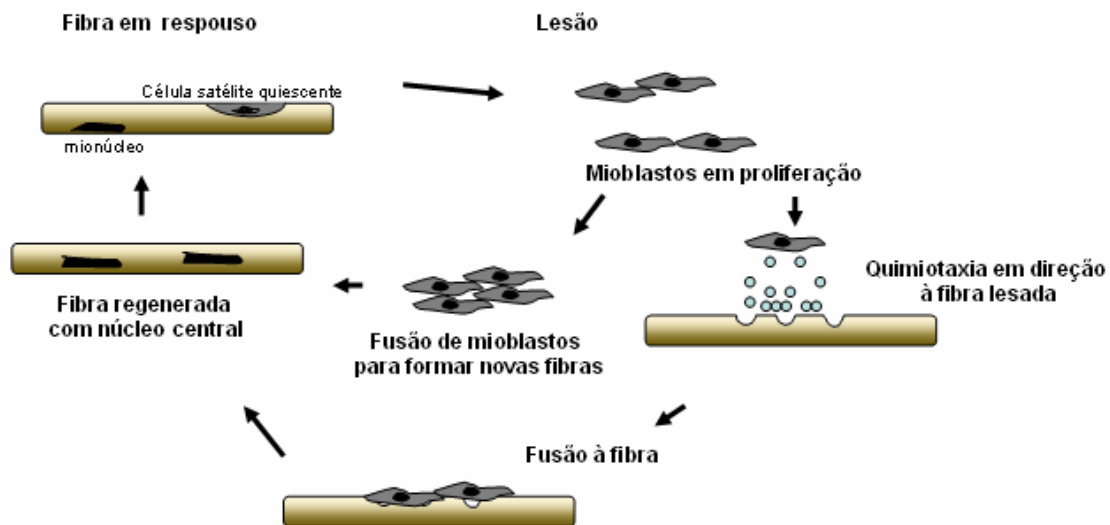


Figura 4. Esquema mostrando a localização de células satélites, sua ativação e formação de fibra muscular. (Adaptado de www.yorku.ca/thawke/images/sat.jpg).

Outra parte destas células satélites não se diferencia no decorrer de um processo de regeneração, e são mantidas como células quiescentes, o que permite a manutenção de um *pool* de células de “reserva” (revisto por Kitzman & Fernandez, 2001).

A ativação e a proliferação de células satélites são reguladas por fatores secretados por elas próprias, por fibroblastos, ou ainda por células inflamatórias infiltradas no músculo lesado (Sheehan & Allen, 1999; Tsivitse *et al*, 2003).

A molécula HGF vem sendo apontada como importante fator de crescimento envolvido nos processos de regeneração muscular. A expressão do receptor c-met foi detectada em células satélites (Anastasi *et al*, 1997). Foi demonstrado que HGF é capaz de estimular a proliferação dessas células, e por outro lado, inibir sua diferenciação (Miller *et al*, 2000).

Além do HGF, diferentes membros da família FGF -- *fibroblast growth factor* -- são descritos como fatores capazes de ativar e inibir a diferenciação de células satélites (Allen & Boxhorn, 1989).

Outros fatores são ainda responsáveis por regular os sinais que vão controlar a massa muscular no período pós-natal. IGF-I -- *insulin-like growth factor* -- é um fator de crescimento produzido pelas próprias fibras musculares e está intimamente ligado a processos de hipertrofia muscular, visto que em camundongos transgênicos para esse fator ocorre um aumento da massa muscular, enquanto que os deficientes em IGF-I apresentam hipoplasia muscular (Coleman *et al*, 1995; Fournier & Lewis, 2000). A miostatina também está envolvida nesse controle, visto que animais deficientes nesse fator possuem aumento no tamanho de fibras musculares (Zhu *et al*, 2000).

Em conjunto esses dados mostram que, a formação do tecido muscular depende da expressão seqüencial de diversos fatores de transcrição, bem como de fatores solúveis secretados no microambiente e seus respectivos receptores celulares. Nesse contexto, doenças como distrofias musculares podem surgir por defeitos de expressão de um ou mais destes fatores ou receptores.

1.2 - Distrofias musculares

1.2.1- Descrição geral.

As distrofias musculares constituem um grupo de doenças neuromusculares genéticas caracterizadas por atrofia e fraqueza muscular, alterações neuromusculares degenerativas, e aumento dos níveis séricos de enzimas neuromusculares. Foram descritas pelo menos 30 formas de distrofias musculares, sendo a causa principal um defeito na produção de proteínas importantes no funcionamento e integridade da fibra muscular (revisado em Vainzof & Zatz, 2003).

Diversos tipos de proteínas estão envolvidos nesse processo dentre elas: moléculas de matriz extracelular, proteínas formadoras de complexos transmembranares, proteínas citosólicas e nucleares (figura 5).

Tradicionalmente, de acordo com as manifestações clínicas e patológicas, as distrofias são agrupadas em: Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), distrofia de Becker (BMD), distrofia de Emery-Dreifuss (EDMD); distrofia distal fascioescapular, distrofia oculofaríngea (OPMD), distrofia da cintura (LGMD, limb-girdle muscular dystrophy), e distrofias musculares congênitas.

Os achados mais comuns em músculos distróficos são a presença de pequenas fibras em regeneração, localização dos núcleos celulares, e acúmulo de tecido conjuntivo e adiposo.

Um número crescente de genes vem sendo associado a essas diferentes distrofias, sendo que a mutação em um único gene pode vir a gerar fenótipo de distrofias distintas, assim como mutações em genes distintos podem estar associadas a um mesmo fenótipo (Nigro, 2003; Bione *et al*, 1994).

Dentre as mutações relacionadas a defeitos na expressão de proteínas de matriz extracelular, a mutação no gene LAMA2 (Allamand & Campbell, 2002), vem sendo descrita como a principal causa da distrofia muscular congênita (CMD) em estudo realizado com pacientes brasileiros (Ferreira *et al*, 2005).

A laminina-211, ou Merosina, é uma das principais isoformas de laminina presente no músculo esquelético, sendo detectada na região em torno de fibras musculares, as quais se ligam a esse substrato através de proteínas do tipo integrina, ou por intermédio da interação com o α -distroglicana presente no complexo sarcodistroglicano (Wewer & Engvall, 1996; Belkin & Stepp, 2000). A mutação no gene LAMA2 tem como consequência uma deficiência na produção dessa isoforma de laminina gerando um quadro clínico de fragilidade muscular, além de complicações no sistema nervoso central (Pegoraro *et al*, 1998). Alterações na glicosilação da proteína alfa-distroglicana também podem acarretar este tipo severo de distrofia muscular (Endo & Manya, 2006).

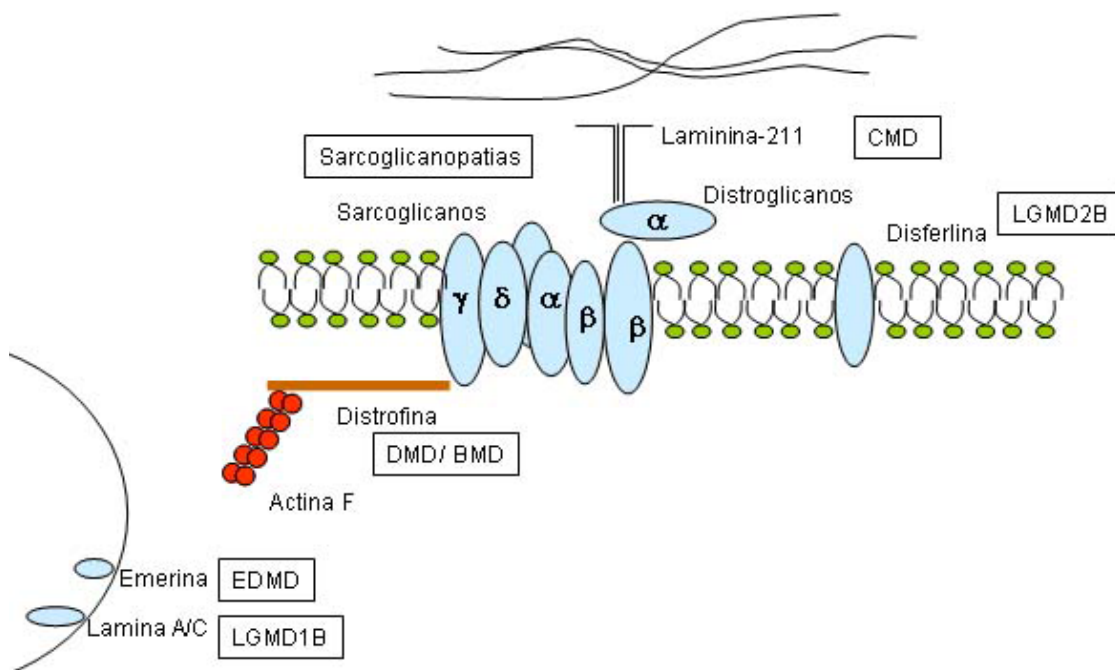


Figura 5. Esquema de algumas proteínas envolvidas nos diferentes tipos de distrofia muscular. CMD – Distrofia muscular congênita, DMD/BMD – Distrofia muscular de Duchenne e de Becker, LGMD – Distrofia muscular do tipo cintura, EDMD – Distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Adaptado de Vainzof e Zatz, 2003.

Defeitos na síntese da cadeia 6A do colágeno, proteína abundante na lâmina basal das fibras musculares, estão associados a outras formas de CMDs. Mutações recessivas no gene responsável pela formação dessa cadeia geram um quadro de distrofia chamado CMD de Ulrich, doença que causa fraqueza muscular severa, associada a múltiplas contraturas das juntas e deficiência de colágeno VI. Por outro lado, mutações nesse mesmo gene podem levar à miopatia de Belém, uma doença muscular com grande variabilidade clínica também caracterizada pela formação de contraturas, diferente da anterior. Esses dados nos mostram que dependendo do tipo de mutação ocorrida num mesmo gene pode levar a uma variabilidade na gravidade da doença (Reed *et al*, 2005; Pepe *et al*, 2006).

As distrofias musculares do tipo cintura são caracterizadas por disfunções heterogêneas que acometem principalmente os músculos da pelve e cintura. As sarcoglicanopatias são as formas mais severas desse tipo de distrofia muscular (revisto por Anastasi *et al*, 2007). A deficiência nas subunidades alfa, beta, gama, e delta-sarcoglicano causam as distrofias de cintura do tipo 2D, 2E, 2C e 2F, respectivamente (Pogue *et al*, 2001). A perda primária da expressão de um desses componentes pode levar a uma deficiência secundária na expressão de outras proteínas que formam esse complexo protéico. Uma exceção, no entanto, é a mutação que causa a distrofia do tipo cintura 2D, em que a deficiência parcial da subunidade alfa, não está associada a modulações na expressão de outras proteínas do complexo sarcoglicano (Vainzof *et al*, 2000).

Além das distrofias já descritas, existem aquelas relacionadas a mutações em componentes citosólicos. A mutação no gene da distrofina, localizado no cromossoma X, locusXp21 leva ao quadro de distrofia mais comum, com frequência de acometimento de 1 entre 3500 meninos nascidos.

A distrofina é uma molécula de alto peso molecular, possuindo uma forma em haste cuja porção N-terminal interage com filamentos de F-actina, e a porção C-terminal com o complexo sarcoglicano, tal como ilustrado na figura 5.

Diversas mutações no gene da distrofina foram descritas e, dependendo da região modificada, o quadro apresentado pode ser característico de doença mais branda ou mais grave. Os casos mais graves levam, em geral, ao óbito por volta da segunda década de vida (Carsana *et al*, 2005).

A gravidade do fenótipo da doença parece estar associada à preservação ou não do quadro de leitura do gene (Monaco, 1988). Assim, o fenótipo de distrofia muscular de Duchenne (DMD), mais grave, está associado, na maioria dos casos, a formação de um códon de parada (*stop codon*), que leva à parada prematura da tradução e formação de uma proteína não-funcional. Nos casos mais brandos, relacionados à distrofia muscular de Becker, pode haver a conservação do quadro de leitura do gene, levando à geração uma proteína truncada, mas funcional, ou ainda, a mutação pode estar localizada numa região do gene não implicado na formação de regiões de interação com proteínas do complexo sarcoglicano (Monaco *et al*, 1987; Arikawa *et al*, 1995; Carsana *et al*, 2005).

O diagnóstico atualmente é realizado através da técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia), que permite a verificação de qual região do gene estaria comprometida (Prior & Bridgeman, 2005).

Clinicamente os pacientes com DMD apresentam atraso no processo de locomoção, que evolui progressivamente para perda completa da marcha. Com o processo de enfraquecimento muscular severo, os pacientes evoluem para um quadro de insuficiência respiratória e cardíaca, devido ao comprometimento do diafragma e miocárdio, respectivamente.

Foram descritos alguns modelos experimentais para estudo de distrofias, alguns dos quais obtidos espontaneamente, outros em laboratório (revisto por Allamand & Campbell, 2000).

O camundongo mdx é um mutante natural de uma colônia de animais C57Bl/10ScSn, onde uma mutação pontual espontânea no éxon 23 do gene da distrofina causa a interrupção da leitura da fita de RNAm gerando uma proteína

não-funcional (Sicinski *et al*, 1989). Esses animais são bastante utilizados como modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne, embora o curso da doença nesses animais difira daquele que ocorre em humanos. Neste modelo, as primeiras manifestações de degeneração muscular ocorrem em torno da 3ª e 5ª semanas de vida. Após esta fase de degeneração aguda, segue-se um período de regeneração e hipertrofia muscular transitória, depois do qual pode ser observado um processo de degeneração/regeneração em níveis baixos e relativamente constantes durante praticamente toda a vida do animal. Entretanto, por motivos ainda não esclarecidos, a regeneração muscular nestes camundongos deixa de ocorrer em idade mais avançada (em torno do 15º. mês de vida) o que acarreta em fraqueza muscular e morte (Coulton *et al*, 1988; Tanabe *et al*, 1986).

Outros tipos de distrofias estão relacionados à ausência de proteínas nucleares (Frock *et al*, 2006). Na Distrofia muscular de Emery-Dreifuss, por exemplo, são detectadas mutações no gene da emerina, uma proteína de 34kDa presente na membrana nuclear e importante componente na estabilização da cariomembrana. Pacientes com este tipo de distrofia apresentam quadro com disfunções cardíacas, bem como alterações nas juntas pélvicas e nos tendões de Aquiles (Helbling-Leclerc *et al*, 2002). Ainda dentro desse grupo, outro tipo de distrofia está associada a anormalidades no gene da Lamina A, que leva a geração de uma doença autossômica dominante clinicamente semelhante à de Emery-Dreifuss, sendo classificada, no entanto, como distrofia do tipo cintura 1B (Mittelbronn *et al*, 2006).

1.2.2. Alternativas de correção

Ao longo das últimas quatro décadas alguns modelos envolvendo terapia celular e terapia gênica foram testados a fim de estabelecer uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de distrofias. Embora nesse período um grande avanço tenha sido alcançado, o sucesso de ambas as alternativas tem se mostrado bastante limitado. Tal limitação estaria relacionada a uma série de

fatores, tais como: a dificuldade de inserção de genes de alto peso molecular (como o da distrofina), a intensa morte celular verificada logo nas primeiras horas de transplante (no caso de terapia celular através de transferência de precursores miogênicos), e a migração limitada das células transferidas no músculo enxertado.

1.2.2.1. Terapia celular

A utilização da terapia celular no reparo de distrofias musculares, tem por base o fato de que a célula a ser transferida, como célula normal, seria a carreadora do gene (ou seu produto) defeituoso.

As primeiras tentativas de reparação, entretanto, foram feitas utilizando fragmentos de músculo esquelético normal, e não células isoladas, que eram transplantados no tecido muscular distrófico do receptor. Os trabalhos de Ignat'eva e Zhenevskaja no início da década de 60 utilizaram este tipo de ferramenta na recuperação de distrofias em modelo canino. A técnica, entretanto, se mostrou pouco eficaz, com capacidade regenerativa limitada, inclusive quando utilizada em outros modelos (Law, 1978). No ano seguinte esse mesmo grupo surgiu com uma técnica inovadora, e que apresentou resultados preliminares satisfatórios. Nesse trabalho, o músculo solear de camundongos recém-natos foi implantado em animais de 20 dias. Cinco meses após o transplante foram detectadas alterações significativas no peso do músculo receptor, na expressão de distrofina, e o restabelecimento da contração muscular ao nível normal (Law & Yap, 1979).

O grupo de T. Partridge (1978) foi um dos primeiros a evidenciar que mioblastos injetados poderiam participar da regeneração do músculo receptor, sendo este dado confirmado por vários outros grupos (Lipton & Schultz, 1979; Watt *et al*, 1984; Morgan 1988). Foi então introduzido o uso de precursores de tecido muscular como alternativa para o restabelecimento de fibras distróficas.

Posteriormente foram utilizadas células mononucleares extraídas enzimaticamente de músculos de animais recém-natos, que foram inseridas diretamente na área de regeneração de um músculo receptor. Dos 60 enxertos realizados neste estudo 43 apresentaram fibras com perfil híbrido, indicando que as células do animal doador se fundiam às fibras do receptor, levando a um mosaicismo de fenótipo (Watt, 1982 e 1984). Mais tarde foi descrito que a injeção intramuscular de mioblastos obtidos a partir de cultivos celulares primários levava ao aparecimento de células distrofina-positivas no músculo de um receptor distrófico (mdx) (Partridge *et al*, 1989). No ano seguinte um dos primeiros trabalhos utilizando a transferência de mioblastos entre espécies diferentes mostrou resultados satisfatórios. Mioblastos humanos cultivados com timidina radioativa foram injetados no músculo quadríceps de camundongos mdx na fase pré-necrótica. A partir do primeiro mês pós-transplante foram detectadas fibras híbridas no músculo receptor, além de fibras distrofina-positivas não necróticas, o que sugeria que a produção de distrofina levava a um bloqueio de sua degeneração (Karpati, 1989).

Por outro lado, os ensaios clínicos, utilizando a transferência de mioblastos como alternativa terapêutica para pacientes DMD, não foram encorajadores. O primeiro transplante realizado recebeu várias críticas (Law, 1990). A avaliação de biópsia de paciente tratado mostrou que as fibras detectadas como positivas para distrofina nada mais eram do que fibras revertidas apresentando uma forma truncada da proteína (Fanin, 1992). O insucesso dessa alternativa em humanos levou ao retorno das etapas de delineamento experimental e re-avaliação de protocolos usando imunossuppressores (Gussoni *et al*, 1992; Karpati *et al*, 1993; Tremblay *et al*, 1993).

Na busca de outros candidatos, fibras musculares isoladas e células satélites (progenitores miogênicos endógenos) vêm ganhando atenção como alternativas para correção de distrofias (Sim, 2003). Foi demonstrado que fibras isoladas de músculo esquelético retêm células satélites abaixo da membrana basal (Wozniak, 2005). Utilizando modelo experimental de infarto do miocárdio, foi visto que o transplante de fibras isoladas de músculo esquelético leva à

ativação e migração de células satélites em direção à área afetada. Com base nesses dados surgiu a hipótese de que as fibras musculares seriam um bom veículo natural de células satélites (Suzuki, 2002). Nesse mesmo contexto, foram testadas células-tronco endógenas, obtidas diretamente do tecido muscular, e que, como as células satélites possuíam a característica de auto-renovação, embora não fossem monopotentes (Seale, 2000; Qu-Petersen, 2000). O isolamento desses precursores endógenos foi baseado na identificação, no tecido muscular esquelético, de uma população celular denominada de “*side population*” (SP). Tais células compartilham com células-tronco derivadas de medula óssea, a capacidade de extrusão do corante Hoechst, sendo essa característica utilizada como ferramenta para seu isolamento (Goodell *et al*, 1996). Foi demonstrado que células SP, após isoladas e injetadas por via endovenosa em camundongos mdx irradiados, eram capazes de restaurar parcialmente a expressão de distrofina no músculo dos camundongos receptores (Gussoni *et al*, 1999).

Mais recentemente vem sendo testado o uso de células-tronco hematopoiéticas humanas na regeneração de tecido muscular distrófico. Tais experimentos se baseiam em estudos anteriores mostrando que células originadas da medula óssea seriam capazes de se converter em células miogênicas (Ferrari *et al*, 1998, LaBarge & Blau, 2002). No que diz respeito à utilização dessas células na correção de distrofias musculares, vem sendo mostrado que células purificadas num estágio mais indiferenciado são mais eficientes na recuperação de fibras musculares, quando comparadas a populações celulares não purificadas ou cultivadas (Mueller *et al*, 2002; Qu-Petersen *et al*, 2000). Existem evidências de que, células de fenótipo CD45⁺/Sca1⁺ isoladas de medula óssea são capazes de gerar tanto células da linhagem hematopoiética, quanto de músculo esquelético, embora a eficácia de diferenciação na via miogênica seja muito menor (Camargo *et al*, 2003). Por outro lado, utilizando o modelo de camundongos mdx imunodeficientes (mdx/nu/nu), foi visto que, a transferência de células Pax3⁺CD34⁺CD45⁻Sca-1⁻ leva à formação de fibras distrofina-positivas no músculo desses animais

(Montarras *et al*, 2005). Mais recentemente vem sendo demonstrado que a utilização de células-tronco, presentes no sangue periférico, positivas para o marcador AC133+, é capaz de recuperar o tecido muscular de camundongos mdx imunodeficientes, através da produção de fibras expressando distrofina (Torrente *et al*, 2004). Além disso, também foi visto que, a utilização de anticorpo anti-VCAM, molécula envolvida no processo de migração transendotelial, é capaz de alterar a migração de células de fenótipo AC133⁺ para dentro do músculo, evidenciando a participação de VCAM no endereçamento dessas células para o tecido muscular, e, por outro lado, sugerindo que em função de um trauma, tais células circulantes poderiam vir a ser incorporadas no tecido muscular (Gavina *et al*, 2006).

Embora os resultados apresentados sejam promissores, em muitos desses trabalhos fica claro que o comprometimento com a diferenciação miogênica é apenas parcial, tendo em vista que, após estes procedimentos, muitas das células transplantadas não chegam a expressar marcadores miogênicos mais tardios. Esse fato, somado à baixa eficiência da regeneração do tecido muscular distrófico (Lapidos *et al*, 2004; Cossu *et al*, 2004), reforça a idéia de que, a célula “ideal” para recuperação do músculo, residiria dentro do próprio músculo (Sherwood *et al*, 2004)

Além da distrofia muscular de Duchenne, existe a expectativa de que outros tipos de doenças musculares possam vir a ser corrigidas através da terapia celular. No modelo murino dy/dy de distrofia muscular congênita, por exemplo, a expressão da cadeia alfa2 da laminina-211 está ausente ou sensivelmente reduzida, provocando um quadro de deficiência muscular precoce e severo (Sunada *et al*, 1994). Foi demonstrado que, o transplante de mioblastos humanos não imortalizados obtidos de cultura primária, assim como precursores miogênicos de linhagens permanentes levam à expressão da cadeia alfa2 da lamina humana e murina respectivamente, nos receptores dy/dy (Vilquin *et al*, 1999).

1.2.2.2 - Modulação gênica

Com a evolução das técnicas de biologia molecular nas últimas décadas, a intervenção gênica surgiu como alternativa promissora no tratamento de pacientes com distrofias musculares (Hoffman, 2003). A facilidade em manipular alguns mecanismos moleculares vem permitindo que sejam estabelecidos protocolos onde seqüências de DNA, RNA e outras moléculas sintetizadas possam ser administradas por diferentes vias, alcançando, com diferentes graus de eficácia, fibras deficientes Goyenvallé *et al*, 2004; Wong *et al*, 2005; Welch *et al*, 2007). Assim, métodos utilizando vetores não virais, vetores virais integradores e não integradores de DNA, e até mesmo drogas que interfiram no processo de tradução, vêm sendo amplamente utilizados. No entanto, a utilização desses métodos apresenta vantagens e desvantagens; como por exemplo: a eficiência da inserção da amostra de material genético, a indução de resposta imune, a dependência do estado proliferativo da célula-alvo carreadora, e ainda, a limitação do tamanho da seqüência a ser aplicada (Revisto por Flotte, 2007).

Vetores retrovirais foram inicialmente utilizados na tentativa de restabelecer a expressão de distrofina em culturas de fibras musculares obtidas a partir da diferenciação de cultivos de mioblastos de camundongos mdx (Dunckley *et al*, 1992). Através dessa técnica somente células em divisão podem ser infectadas com um limite em torno de 10-12kb de tamanho de seqüência a ser empacotada. Tendo em vista que o gene da distrofina possui um alto peso molecular (14kb), excedendo esse limite, a alternativa encontrada foi a inserção de um minigene semelhante ao encontrado em indivíduos que apresentam distrofia muscular de Becker, onde a proteína perde grande parte de seu domínio central mas continua sendo parcialmente funcional (England *et al*, 1990; Phelps *et al*, 1995). Através de imunohistoquímica, Dunckley e colaboradores (1992) demonstraram que após o processo de diferenciação houve uma intensa imuno-reatividade contra distrofina nos miotubos provenientes de mioblastos infectados, quando comparados aos respectivos controles. Mais tarde, utilizando

a mesma alternativa em vetores adenovirais foi detectada imunorreatividade em aproximadamente 50% das fibras do músculo injetado (Ragot *et al*, 1993).

Vetores virais adeno-associados recombinantes (rAAV) surgiram como alternativa promissora para o tratamento de sarcoglicanopatias (Fougerousse *et al*, 2007). Como os genes responsáveis pela codificação das proteínas do complexo sarcoglicano apresentam tamanho em torno de 2kb, eles se adaptam perfeitamente a esses vetores. As vantagens na utilização desses vetores dizem respeito à sua persistência por mais tempo pós-infecção, e o fato de ativarem menos a resposta imune inata em camundongos (Flotte, 2007).

Hamsters Bio14.6 apresentam uma mutação espontânea no promotor do gene da subunidade gamma-sarcoglicano sendo utilizado desde então como modelo animal para a distrofia do tipo cintura 2C. Embora a mutação seja restrita a esse gene, como descrito anteriormente, as outras subunidades estão ausentes devido à desestabilização do complexo sarcoglicano. Após a administração do vetor contendo o gene-alvo foi verificado o restabelecimento da expressão da subunidade gamma-sarcoglicano, bem como das subunidades alfa e beta (Li *et al*, 1999).

Visto que tanto o gene como o minigene da distrofina excedem o tamanho máximo para a utilização dos vetores rAAV (até 5kb) foi usada, como alternativa para dispor dos benefícios desses vetores, a técnica de *exon-skipping* (salto de éxon). Essa técnica, que tem por base os eventos que ocorrem naturalmente durante o *splicing* alternativo dos pré-RNAm e que geram variantes a partir do mesmo gene, permite que exons contendo mutações *nonsense* e que levam à finalização da leitura da fita de RNAm em proteína sejam pulados, gerando dessa forma um RNAm modificado que vai produzir uma distrofina funcional. No caso de camundongos mdx, uma mutação pontual no exon 23 do gene da distrofina é responsável pela finalização precoce da tradução de seu RNAm (Sicinski *et al*, 1989). Através da técnica de *exon-skipping*, uma sequência de oligonucleotídeo complementar ao RNAm da distrofina murina foi inserida num vetor AAV-1. Tal oligonucleotídeo foi desenhado para reconhecer regiões

específicas dos exons 22 e 23 e, dessa forma, durante o processamento do RNAm, foram gerados transcritos sem o exon que sofreu mutação, fato este confirmado pelo seqüenciamento das bandas amplificadas por RT-PCR. Os camundongos analisados nesse trabalho apresentaram recuperação da expressão de distrofina na ordem de 67% no primeiro mês pós-infecção com pico de 77% na oitava semana e persistência de expressão até a 13ª semana. Além disso, foi observado que nestes animais, a expressão de componentes do complexo sarcodistroglicano voltou aos níveis normais (Goyenvallé *et al*, 2004).

O uso de métodos não-virais, principalmente os que utilizam somente o DNA, sem o auxílio de vetores (*Naked DNA*), surgiu como alternativa bastante vantajosa. Entretanto após a eletroporação e transferência dessas construções no músculo *tibialis anterior* de camundongos mdx, foi verificado que existe uma “preferência” de inserção do DNA em fibras musculares maduras, quando comparadas às células satélites. Assim, como o componente que supostamente vai realizar a renovação do tecido muscular não possui o gene-alvo, o procedimento deveria ser repetido periodicamente a fim de que os níveis protéicos sejam mantidos e o método seja realmente eficaz (Wong *et al*, 2005).

Embora os resultados obtidos com tais metodologias sejam promissores, sabe-se que o resultado da inserção de seqüências selvagens do gene da distrofina através de plasmídeos pode persistir durante meses nas fibras musculares; no entanto, ocorre uma perda progressiva desse material. Uma alternativa seria a co-transfecção dessas construções com um plasmídeo que codifica uma integrase, que catalisaria a integração do gene da distrofina ao genoma, promovendo assim uma maior persistência do material inserido (Bertonit *et al*, 2006).

Por outro lado alguns tipos de mutação podem levar à formação de um códon de terminação prematuro (PTC), impedindo a tradução completa do RNAm e conseqüentemente formando uma proteína de menor peso molecular. Nesse tipo de alteração genética a administração de determinadas drogas forçaria a leitura desses códons de terminação possibilitando então a produção

normal da proteína. O PTC124 é um composto sintético capaz de ler esses PTC sem interferir com os códons de terminação normais. A administração dessa droga promoveu a produção de distrofina em cultivos de fibras musculares humanas e em camundongos mdx, resgatando a função dos músculos estriados dentro de 2-8 semanas de administração (Welch *et al*, 2007).

1.2.2. 3 - Limitações das terapias celular e gênica.

Conforme já comentado anteriormente, o sucesso esperado da terapia celular e terapia gênica dependerá da resolução de diversos fatores que atualmente limitam a recuperação dos indivíduos tratados. Particularmente no tocante à transferência de células, sejam elas modificadas ou não através de terapia gênica, os principais fatores limitantes dizem respeito: à permanência das células transferidas no ponto de inoculação, o que denota uma baixa capacitação migratória, e a morte celular logo a seguir o processo de transplante que, de acordo com o que vem sendo descrito na literatura, pode ou não estar associada à resposta imune do organismo receptor contra as células injetadas.

Vários estudos mostram que a maior parte de células morre logo nos primeiros dias pós-transplante, antes mesmo que uma resposta imune específica seja montada (Fan *et al*, 1996; Guerette *et al*, 1997; Beauchamp *et al*, 1999).

No que diz respeito ao papel da resposta imune inata nesse processo, uma hipótese seria de que a ativação do sistema complemento, após a injeção de precursores de músculo esquelético, poderia ser um dos fatores responsáveis. De fato a depleção do fator C3 da cascata do complemento parece estar relacionada à sobrevivência inicial de mioblastos; no entanto, pouco benefício foi observado após 3 semanas de transplante, mostrando que o complemento pode estar envolvido na morte celular prematura, mas a depleção por si só não seria suficiente para uma melhora a longo prazo (Hodgetts *et al*, 2001). Além disso, foi sugerido que fatores associados ao complemento poderiam agir no recrutamento de neutrófilos e macrófagos infiltrados no sítio de rejeição (Skuk &

Tremblay, 1998). Outros estudos sugerem a participação de células NK (*natural killer*) nessa rápida rejeição (Hodgetts *et al*, 2003a). Entretanto, em modelo de transplante singênico, a depleção de células NK em fêmeas mdx não gerou diferenças significativas em relação à permanência de células transplantadas entre os receptores distróficos depletados, e os não-depletados em células NK. Foi demonstrado que mesmo a retirada de macrófagos e neutrófilos não afetava o estabelecimento das células transplantadas nesses animais (Sammels *et al*, 2004).

No que diz respeito à interferência da resposta imune adaptativa de base celular do organismo receptor, foi visto que, em camundongos mdx, a eliminação de leucócitos circulantes, através da irradiação corpórea, leva a uma alta taxa de sobrevida dos mioblastos transplantados. Quando os animais irradiados foram submetidos à reconstituição da medula óssea o sucesso na sobrevivência das células diminuiu, girando em torno de 25%. Já a irradiação local da pata rendeu uma melhora de até quase 4 vezes mais no número de mioblastos, quando comparados aos músculos controles não irradiados (Hodgetts *et al*, 2003b).

A utilização de animais imunodeficientes mostrou ser uma ferramenta eficaz no estabelecimento de protocolos utilizando células humanas em modelos de xenotransplante.

O papel de linfócitos T, B e células NK na rejeição de mioblastos humanos foi avaliado através da utilização de animais imunoficientes RAG2^{-/-}/γC-/C5-. Estes animais apresentam deleção simultânea do gene Rag-2 (gene ativador de recombinase), do gene da cadeia gama comum a vários receptores de citocinas (γC⁻), além da ausência do fator C5 do sistema complemento. São animais alinfóides, não apresentando células T, B, NK ou seus precursores. A injeção de mioblastos em músculos lesados por miotoxina ou criolesão, mostrou um aumento na eficiência do transplante de mioblastos humanos, sendo detectadas fibras diferenciadas até 6 meses após a transferência (Cooper *et al*, 2001; Silva-Barbosa *et al*, 2005). Estes dados evidenciam claramente o papel dessas

células e de fatores do complemento no processo reacional contra células transplantadas.

As alternativas para ultrapassar a barreira de rejeição de células transplantadas, seriam: a aplicação de agentes imunossupressores (Skuk & Trambly 2003), e a utilização de transplante autólogo associado à “correção gênica”, antes da implantação no receptor. Assim, mioblastos isolados de camundongos mdx foram transfectados com a seqüência completa do gene da distrofina e sequencialmente transplantados em novos animais mdx. Após um mês numerosas fibras expressando distrofina foram encontradas ao longo dos cortes (Bujoldt *et al* , 2002).

Com relação à utilização da terapia gênica dos maiores obstáculos enfrentados é a resposta imune gerada contra as proteínas da cápsula viral ou do transgene. Os vetores AAV não possuem qualquer gene viral, mas o seu capsídeo é capaz de gerar resposta imune de base humoral no organismo receptor (Chimule *et al*, 1999). Nesse sentido a procura de cepas com menor capacidade imunogênica facilitaria a utilização de menores doses desses vetores. A utilização do sorotipo AAV2 em camundongos mostrou grande eficiência na transdução do material genético, visto que esse sorotipo não é capaz induzir resposta imune nesses animais; entretanto, a utilização desses mesmos vetores no modelo canino induziu uma potente resposta imune (Wang *et al*, 2007).

Além dos fatores já descritos, e que devem ser considerados no delineamento de protocolos experimentais, um outro fator limitante diz respeito à permanência de células injetadas no ponto de inoculação. Um dos parâmetros a ser analisado como determinante na correção de um músculo distrófico seria a capacidade de dispersão do precursor miogênico sadio transferido ao longo do tecido transplantado. É simples de se imaginar que, de um ponto de vista de eficácia terapêutica, quanto maior a capacidade de dispersão de precursores injetados, maior a chance de fusão com precursores endógenos ativados, com maior formação de fibras normais.

Em modelos experimentais foi verificada que a migração *in vivo* de mioblastos transplantados é muito limitada (Lipton & Schultz, 1979; Rando & Blau, 1994), mas pode ser aumentada em função da aplicação de fatores indutores de morte/ativação de células no músculo receptor. Dentre esses fatores estão incluídos: drogas miotóxicas, irradiação, criolesão (Morgan *et al*, 1990; 1993). Neste particular, foi visto que a criolesão, ou lesão a frio, promove a destruição da fibras maduras, e ativação de células satélites residentes promovendo um ambiente propício para que as células a serem injetadas formem fibras híbridas no músculo receptor. A pré-irradiação também induz lesão do músculos receptores promovendo a proliferação e migração dos precursores injetados não irradiados, embora os mecanismos pelos quais isso ocorra ainda não estejam esclarecidos (Beauchamp *et al*, 1999; Morgan *et al* 2002; Silva-Barbosa *et al*, 2005). Além disso, para aumentar a dispersão de células injetadas vem sendo adotada como alternativa a injeção simultânea do material a ser transplantado em vários pontos ao longo do músculo aceptor (Skuk *et al*, 2000; 2002). Recentemente, utilizando este protocolo foi detectado, após o transplante, cerca 30% de fibras expressando distrofina em músculo de paciente apresentando DMD (Skuk, 2006, 2007).

A análise da migração/dispersão das células transplantadas no músculo receptor pode ser realizada através da marcação prévia de precursores com traçadores moleculares fluorescentes como o PKH26; radioativos, como a timidina tritiada ou ainda, pela inserção de genes repórteres (Karpati *et al*, 1989; Torrente *et al*, 2000), ou através da utilização de sondas específicas (Smithe *et al*, 2000). A utilização de tais marcadores vem permitindo a detecção do material transferido no músculo transplantado, e uma avaliação da eficácia do processo de transplante.

1.3 - Fatores que influenciam a migração celular

Diversos trabalhos vêm descrevendo os diferentes fatores que regulam etapas da migração durante a miogênese (Odemis *et al*, 2007; Bandow *et al*,

2004). Mais recentemente vem sendo mostrada a importância da migração de precursores de tecido muscular no crescimento e desenvolvimento de miofibras (Kamochi *et al*, 2006).

A regulação desse processo envolve uma série de moléculas de superfície, incluindo caderinas, integrinas e membros da superfamília de imunoglobulinas (Schawander *et al*, 2003), além de fatores ditos estimuladores e inibitórios desse processo. Dentre esses fatores são destacados como estimuladores: FGF, TGF- β , IGF-1, HGF, a quimiocina CXCL12, e metaloproteases de matriz extracelular (MMPs). Os fatores inibitórios de migração, por outro lado, são pouco conhecidos, sendo a molécula esfingosina 1-fosfato recentemente descrita por exercer essa função (Becciolini *et al*, 2006).

O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) vem sendo considerado um dos mais importantes fatores de crescimento envolvidos no processo de regeneração de fibra muscular. A ligação do HGF ao receptor c-met induz sua auto-fosforilação e ativação de uma cascata de proteínas intracelulares (Rodrigues & Park, 1994). Neste sentido foi visto que, a interação HGF/c-met induz a fosforilação de FAK (quinase de adesão focal), componente importante no processo de migração (Hildebrand *et al*, 1993). Esse dado remete a um ponto de convergência entre as vias de sinalização de fatores de crescimento e integrinas, que também ativam FAK durante sua ligação a um dado substrato de matriz extracelular (Beviglia *et al*, 1999).

Durante o desenvolvimento do tecido muscular esquelético a função do HGF está ligada à migração de precursores provenientes do somito (Yang *et al*, 1996). Foi visto que essa mesma molécula é capaz de potencializar a migração *in vitro* de mioblastos embrionários murinos. Dados vêm mostrando que o tratamento prévio dessas células com o HGF é capaz de induzir a quimiotaxise dos precursores após o transplante nos membros anteriores de um embrião no estágio 11.5 de desenvolvimento fetal (Lee *et al*, 1999). No que diz respeito à função dessa molécula na migração pós-natal de precursores miogênicos, foi visto que células satélites isoladas de animais adultos mostraram sensibilidade

ao estímulo quimiotático do HGF *in vitro* (Bischoff *et al*, 1997; Corti *et al*, 2001). Outros dados vêm mostrando que a inserção subcutânea de mioblastos de camundongos (a linhagem celular C2C12) numa matriz tridimensional de matrigel, impregnada com HGF ou FGFb, induz a formação ectópica de músculo em camundongos imunodeficientes *nude* (Barbero *et al*, 2001).

Por outro lado, precursores oriundos da medula óssea podem ser atraídos por fatores produzidos pelas fibras musculares. Foi demonstrado que o bloqueio da sinalização da via HGF/c-met através de anticorpos neutralizantes reduziu a migração *in vitro* de uma população de células-tronco, de fenótipo CD45⁺, isoladas da medula óssea, em direção a culturas de miotubos (Rosu-myles *et al*, 2005).

A quimiocina CXCL12 (SDF-1 α) possui papel importante na miogênese, visto que os animais deficientes no seu receptor, a molécula CXCR4, apresentam defeitos no desenvolvimento de músculos dos membros (Odemis *et al*, 2005). Dados mais recentes mostram que essa quimiocina também é capaz de induzir a proliferação e migração de mioblastos C2C12 e de inibir a diferenciação dessas células *in vitro* (Odemis *et al*, 2007).

O fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) é classicamente descrito por sua função na resposta angiogênica a isquemias (Breen *et al*, 2007). A expressão de VEGF e de seus receptores no músculo normal encontra-se restrita às células satélites quiescentes. No entanto, três dias após a indução do processo de isquemia é possível visualizar presença dessas moléculas também nas fibras musculares, devido à inserção de mioblastos em proliferação. Foi visto, por exemplo, que VEGF é capaz de potencializar a capacidade migratória da linhagem de mioblastos murino C2C12 em até cinco vezes em relação ao controle (Germani *et al*, 2003).

Além desses fatores, dados recentes sugerem que citocinas exercem papel importante durante o processo de regeneração do músculo estriado esquelético (Authier *et al*, 1997; Chen *et al*, 2005). A interleucina-4 (IL-4), por exemplo, que também pode ser produzida por miotubos, tem a capacidade de induzir a

migração de precursores miogênicos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Lafreniere *et al*, 2005). Além dessa citocina, foi demonstrado que o TNF- α , fator de necrose tumoral do tipo alfa, produzido por miotubos e células inflamatórias que infiltram o músculo lesado, atua como fator quimiotático de precursores durante o reparo tecidual. Experimentos *in vitro* mostraram que esta citocina aumenta significativamente a migração de precursores miogênicos. Foi também visto que a administração contínua *in vivo* de TNF- α no músculo *tibialis anterior* aumentou a migração de células injetadas no epimísio desses músculos (Torrente *et al*, 2003).

Além disso, o papel de enzimas proteolíticas tais como as metaloproteinases de matriz, capazes de degradar a matriz extracelular, também tem sido avaliado. Tais enzimas têm em comum a presença de zinco em seu sítio ativo, a dependência de íons cálcio para a sua atividade, e a capacidade de reagir com inibidores teciduais específicos de metaloproteinases (TIMPs) formando complexos enzimáticos inativos. A família de MMPs agrupa aproximadamente 20 enzimas dentre as quais existem aquelas com função de degradação de proteínas de matriz extracelular e que também pode agir sobre quimiocinas, clivando e inativando essas moléculas, como por exemplo CXCL12. (McQuibban *et al*, 2001; Sheu *et al*, 2001).

O tipo de substrato que degradam pode servir para a divisão desta família de endopeptidases em vários subgrupos, dentre eles: as collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), que são ativadas contra as fibrilas colágenas; as gelatinases (MMP-2, MMP-9), que têm intensa atividade sobre colágenos desnaturados; as estromelisinases (MMP-3, MMP-10, MMP-11), que degradam os componentes não-colágenos da matriz; as MMPs de membrana (MT1-MMP a MT4-MMP), que são moléculas transmembrana; as metaloelastases (MMP-12) e outras (MMP-19, MMP-20, MMP-26) (Vu & Werb 2000; Goffin *et al*, 2003).

Em tecidos lesados, estas gelatinases atuam de modo importante no processo de migração celular em tecidos lesados, através da degradação de substratos no microambiente, tais como colágeno IV, e fragmentos de

colágenos, laminina, fibronectina (Aimes & Quigley 1995; Seltzer *et al*, 1989; Wilhelm *et al*, 1989; Giannelli *et al*, 1997, Nagase *et al*, 1991; Karelina *et al*, 2000).

Atualmente 24 tipos de MMPs foram descritas em mamíferos, sendo as MMP-2 e MMP-9 as mais expressas no músculo esquelético em condições normais. Tais enzimas têm, entretanto, sua expressão aumentada após lesão tecidual, passando a regular a migração de células e sua localização tecidual (Parks *et al*, 2004; Zimowska *et al*, 2008). Foi visto que o TNF- α estimula a produção de MMP-2/9 no tecido muscular, sugerindo que o efeito quimiotático desta citocina possa resultar de sua ação direta sobre as células, ou indireta, através do aumento da atividade de MMPs (Torrente *et al*, 2003). Além disso, foi visto que a injeção simultânea de IGF-I ou de FGF com mioblastos humanos foi capaz de aumentar a migração dessas células ao longo do músculo receptor. Nesse sistema foi também detectado um aumento da expressão de MMP-9, sugerindo mais uma vez que a interação entre essas enzimas e fatores de crescimento contribuam no controle do processo migratório (Allen *et al*, 2003).

Além dos sinais estimuladores, existem ainda os sinais inibitórios de migração de precursores miogênicos. No tecido muscular foram poucos os sinais identificados e, aqueles que foram, estão relacionados com a inibição da proliferação, favorecendo assim a diferenciação da célula muscular. Dentre os fatores identificados está a esfingosina 1-fostato (S1P), um mediador lipídico previamente conhecido por inibir a proliferação de mioblastos e estimular a miogênese (Meacci *et al*, 2008). Foi verificado que S1P é capaz de inibir a migração de células C2C12 em resposta a IGF-1. Nesse trabalho o efeito anti-migratório da molécula foi atribuído à sua ligação a receptores ligados à proteína G, levando ao aumento nos níveis de cálcio intracelular (Becciolini *et al*, 2006). Mais recentemente, uma outra molécula, a prostaciclina (PGI₂), agente vasodilatador e anti-coagulante liberado pelo tecido muscular lesado (Rodemann *et al*, 1982; Nowak *et al*, 1983), vem sendo implicado simultaneamente na inibição da migração e como agente facilitador da fusão de mioblastos (Bondesen *et al*, 2007).

2- Justificativa e Objetivos

O transplante de células precursoras de músculo esquelético (mioblastos) tem sido visto como estratégia potencial no tratamento de distrofias. Embora este tipo de estratégia, ou seja, a substituição de um gene defeituoso utilizando células normais, já tenha sido demonstrada em diferentes modelos, a eficácia da transferência de mioblastos e de sua manutenção ainda permanece sob análise. Tais dados nos levaram a desenvolver esta tese, com o objetivo de identificar fatores que possam intervir na sobrevivência das células transplantadas, e sua dispersão nos músculos receptores. Tendo por base a identificação desses fatores, será possível delinear estratégias terapêuticas de maneira a favorecer o processo de regeneração do tecido muscular.

Tendo em vista os dados discutidos, foram definidos como objetivos específicos:

1. Avaliar a eficiência do transplante de mioblastos humanos em camundongos imunodeficientes previamente irradiados e/ou criolesados,
2. Analisar o efeito da laminina sobre a proliferação, sobrevivência e migração de mioblastos humanos.
3. Estudar o papel do HGF na migração *in vitro* de mioblastos através de laminina e fibronectina.
4. Verificar o efeito do HGF sobre a liberação de metaloproteases de matriz extracelular por mioblastos.

3- RESULTADOS

3.1- Artigo 1

Human Myoblast Engraftment Is Improved in Laminin-Enriched Microenvironment

Suse D. Silva-Barbosa,^{1,2,3,4,5,7} Gillian S. Butler-Browne,^{1,2,3} Wallace de Mello,⁴ Ingo Riederer,^{1,2,3,4} James P. Di Santo,⁶ Wilson Savino,⁴ and Vincent Mouly^{1,2,3}

Transplantation. 2008 Feb 27;85(4):566-575.

Seguindo uma linha visando à otimização de modelos experimentais para terapia celular, neste trabalho procuramos avaliar o efeito da molécula de laminina sobre a eficácia de transplante de precursores miogênicos humanos.

O trabalho surge a partir de um modelo xenogênico de transplante em que, precursores músculo esquelético (mioblastos), obtidos a partir de explantes de tecido normal, foram injetados diretamente no músculo *tibialis anterior* de camundongos imunodeficientes ($RAG^{-/-}\gamma C^{-/-}/C5^{-/-}$). Nesses animais, os músculos receptores foram previamente irradiados e/ou criolesados. Constatamos um aumento da eficácia do transplante quando utilizamos o modelo de irradiação associado à criolesão: vimos um maior número de mioblastos humanos incorporados, quando comparados aos grupos controles. A análise do tecido muscular mostrou aumento da deposição de laminina, com um grande número de células humanas intimamente associadas a áreas onde a molécula era mais expressa. A estreita associação entre essa molécula e os mioblastos transplantados nos levou sugerir que essa proteína estivesse favorecendo os eventos de proliferação, inibição de morte e dispersão de mioblastos transplantados no músculo receptor. Nesse sentido estabelecemos protocolos experimentais onde demonstramos que de fato a molécula poderia estar regulando tais eventos.

Os dados apresentados nesse trabalho apontam para a utilização da molécula de laminina no delineamento de estratégias experimentais visando ao desenvolvimento de terapia celular para a correção de doenças musculares.

Human Myoblast Engraftment Is Improved in Laminin-Enriched Microenvironment

Suse D. Silva-Barbosa,^{1,2,3,4,5,7} Gillian S. Butler-Browne,^{1,2,3} Wallace de Mello,⁴ Ingo Riederer,^{1,2,3,4} James P. Di Santo,⁶ Wilson Savino,⁴ and Vincent Mouly^{1,2,3}

Background. One major challenge in developing cell therapy for muscle diseases is to define the best condition for the recipient's muscle to niche donor cells. We have examined the efficiency of human myoblast transplantation in an immunodeficient animal model, after local irradiation, as well as the potential impact of laminin on myoblast behavior.

Methods. Human myoblasts were injected into preirradiated tibialis anterior muscles from immunodeficient mice. The donor cell engraftment, proliferation, and laminin content within the transplanted muscles were evaluated by immunocytochemistry. Additionally, the effect of laminin upon myoblast proliferation, migration, and survival was ascertained in vitro.

Results. Engraftment of human myoblasts into the skeletal muscle of immunodeficient Rag2^{-/-}/γc^{-/-}/C5^{-/-} mice presubjected to local irradiation provided the best niche for myoblast engraftment, as demonstrated by the number of viable and proliferating donor cells found in the host muscle. Local irradiation significantly enhanced laminin deposition within the recipient's muscle and donor cells were preferentially located in laminin-enriched areas. The same batch of myoblasts used for in vivo injections also responded to laminin in vitro with increased proliferation and cell survival, as well as an improved migratory response.

Conclusions. We show that local irradiation enhances the laminin content in the host muscle microenvironment and provides a better engraftment of human myoblasts. In addition, laminin increases myoblast proliferation, survival, and migration in vitro. These data provide combined in vivo and in vitro evidence that laminin status should be taken into account when designing experimental and clinical cell therapy strategies for muscle disease.

Keywords: Skeletal muscle, Laminin, Human myoblast transplantation, Irradiation.

(*Transplantation* 2008;85: 566–575)

Cumulating evidence indicates that myoblast transplant therapy can be envisioned as a potential treatment for certain muscle diseases, in particular those with a selective effect on a restricted number of small muscles. How to im-

prove donor myoblast survival and migration within the recipient muscle remains a major problem (1).

Host irradiation has been extensively used to improve cell engraftment within mouse skeletal muscle. Local irradiation acts directly upon the host skeletal muscle and, depending on the dose applied, a long-term deficit in muscle growth may occur because of the destruction of the majority of the resident muscle progenitors and even postmitotic fully differentiated fibers (2–4).

The effect of local host muscle irradiation to prevent endogenous regeneration has been used to increase the incorporation of donor cells after myoblast transplantation (4–8). In addition, it is accepted that irradiation has a mitogenic effect on the transplanted myogenic precursors (5, 8, 9), suggesting that this procedure enhances the production and the bioavailability of soluble growth factors within the graft site. However, at present these factors have not been identified. It is also conceivable that insoluble moieties could be involved in this general process, providing not only cell guidance and growth, but also presenting growth factors to the cells. In this context, extracellular matrix (ECM) components directly influence cell growth and migration and favor the action of cytokines, chemokines, and growth factors (10).

ECM ligands and receptors have been incriminated as key players in muscle differentiation (11–13) and particular

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (G.B.B., V.M., J.P.D.S.), Myores EU Network of Excellence (contract 511978), INSERM/Université Paris VI (G.B.B., V.M.), Pasteur Institute (J.P.D.S.), Fiocruz (S.D.S.-B., I.R. and W.S.), Capes (S.D.S.-B., I.R.), CNPq (W.S.), and the Capes/Cofecub and Fiocruz/Inserm Brazilian/French conjoint programs.

¹ UMR S 787 INSERM, Paris, France.

² Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

³ Institut de Myologie, Paris, France.

⁴ Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵ Center for Bone Marrow Transplantation, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

⁶ Unité des Cytokines et Développement Lymphoïde, Institut Pasteur, Paris, France.

⁷ Address correspondence to: Suse Dayse Silva-Barbosa, M.D., Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail: suse@fiocruz.br

Received 16 August 2007.

Accepted 26 September 2007.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8504-566

DOI: 10.1097/TP.0b013e31815fee50

attention has been addressed to the laminin family, a basement membrane component onto which skeletal muscle fibers adhere and stabilize through a critical connection between this glycoprotein and the plasma membrane dystrophin-dystroglycan complex (14). Laminin is a polypeptidic heterotrimer formed by one heavy (α) chain and two light chains (β and γ), each being encoded by a specific gene (15). The different combinations of the several α , β , and γ subunits, and their variants resulting from RNA splicing, generate isoforms that can be expressed more or less specifically according to the tissue or to the developmental stage of a given tissue. Classical laminin, or laminin-1 (the heterotrimer $\alpha1\beta1\gamma1$, recently renamed laminin-111), as well as the variant laminin-2 ($\alpha2\beta1\gamma1$ or laminin-211) (16), have been extensively studied during myogenesis (11). Although laminin-211 is the predominant variant present in the basement membrane of developing and mature mammalian muscle fibers (15), laminin-111 expression precedes the onset of myogenesis (17, 18). Laminin-211 is upregulated during myogenic differentiation (19), whereas laminin-111, which has also been suggested as being involved in myoblast fusion and myotube formation (20, 21), acts primarily as a promoter of myoblast proliferation (22, 23).

Because of the involvement of the laminins in the process of cell migration and differentiation, their potential as relevant players in the interactions between grafted myoblasts and the recipient's microenvironmental niches should be taken into consideration.

In the present study, we have devised a combined evaluation of the engraftment efficiency of human myoblasts into immunodeficient recipients, together with the impact on the in situ laminin content, as well as the responsiveness of human myoblasts to this ECM protein.

We found that local irradiation plus cryolesion resulted in efficient myoblast engraftment in immunodeficient mice. The largest number of viable and proliferating donor cells was correlated with an increased laminin deposition within the recipient's muscle, with donor cells being preferentially localized in the laminin-enriched areas. By using an in vitro approach, we showed that human myoblast proliferation, survival, and migration was enhanced by laminin-111. Taken together, our findings clearly point to a role for this molecule as a coadjuvant for improving myoblast transfer therapy.

MATERIALS AND METHODS

Mice and Irradiation Procedure

Rag2^{-/-}/ γ c^{-/-}/C57 immunodeficient mice, aged 8–12 weeks, were raised under *spf* conditions in Pasteur Institute (Paris, France). Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of 0.4 mg/kg ketamin and 0.2 mg/kg xylasin (Sigma Co., St. Louis, MO) and submitted to a single local dose of 18-Gy gamma rays at the surface of the lower hind limbs. This dose of irradiation had been shown to be efficient in inducing a mitogenic effect upon the transplanted myogenic mouse cell line C2C12 (8). Three days later, 5×10^5 human myoblasts were injected in a single midpoint site along the longitudinal axis of the recipient's tibialis anterior (TA) muscle in a volume of 15 μ L.

In another experimental group, mice were anesthetized and recipient muscles were irradiated and submitted to cryodamage (freeze-thawing injury) immediately prior to

cell engraftment, as previously described (24). A third group consisted of nonirradiated animals submitted to cryolesion prior to myoblast injection. Each experimental group consisted of at least seven animals. Among these, in at least two animals per group, we applied the counterlateral leg of the same mouse as untreated control.

It should be noted that, in all experiments, animals were handled according to the rules precluded by the European Union ethical guidelines for animal research.

Human Myoblast Isolation and Culture

Cells were isolated from a biopsy of the quadriceps from a 5-day-old infant who died from cardiac malformations, with no other signs of neuromuscular disease. The biopsy was performed with consent of the family, and after approval of the local ethical committee, in accordance with the French legislation.

Cells were grown in Ham's F10 medium (Invitrogen, Boussens, France) supplemented with 50 μ g/ml of gentamycin and 20% fetal calf serum (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) and maintained at 37°C in 5% CO₂ atmosphere (25). Cells were detached from the culture dishes after incubation in a solution containing 0.05% trypsin and 0.02% ethylenediamine tetraacetic acid. For all experiments, the culture purity was above 85% as determined by immunocytochemistry using an antihuman desmin antibody (Dako Co., Carpinteria, CA) that identifies myogenic cells.

For transplantation and in vitro experiments, human myoblasts were used between 28–37 population doublings (26).

Antibodies and Immunohistochemistry

Four weeks after transplantation, recipient muscles were dissected, mounted in 6% gum taragacanth (Sigma Co., Saint Louis, MO), frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stocked at -80°C . The number of human myoblasts present in each muscle was determined by immunohistochemistry on cryostat sections, as described previously (27), using monoclonal antibodies which react specifically with human lamin A/C and spectrin. In further experiments, we used antibodies against dystrophin and slow myosin heavy chain (MyHC; Novacastra, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom). In double immunofluorescence experiments, rabbit polyclonal antibodies to laminin (Chemicon, Temecula, CA) or desmin were used. The antidesmin antibody was also applied to acetone-fixed cell cultures in order to confirm their myogenic purity. Appropriate secondary reagents, such as biotinylated antimouse immunoglobulin (Ig) G, were purchased from Vector and revealed using streptavidin-coupled Alexa-Fluor 488 or Alexa-Fluor 597 (Molecular Probes, Montluçon, France). Samples were visualized using an Olympus (BX60) microscope and the images were digitalized using the Meta View image analysis system.

In two separate experiments, 10 mice per group received intraperitoneal injections of bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma), 100 μ g per gram of body weight, in 200 μ L of saline 36, 24, and 1 hr before the human myoblasts were transplanted. Additional injections of BrdU were made every 24 hr until the end of the experiment. Cycling donor-derived myoblasts were then assayed for BrdU uptake using an anti-BrdU antibody, purchased from Dako. Proliferating cells

were also detected by their expression of the Ki-67 protein, using a specific anti-Ki-67 antibody (Dako). In these experiments, 10 animals were evaluated in each group.

For all immunohistochemical analyses, serial 5- μ m thick transverse cryosections were made and the entire muscle was sectioned and immunostained to detect all donor-derived cells until 1 month after transplantation. We then chose, for each muscle, the section that presented the highest number of muscle profiles that were positive for human lamin A/C and spectrin.

Quantitative evaluation of in situ laminin deposition in the muscle was done by computational analysis of immunostained sections of the TA muscles. Images were scanned using the Metamorph software (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Quantitative fluorescence analyses were performed by transforming specific staining in pixels and dividing the total pixel numbers by the area analyzed, obtaining the numbers of pixels per micrometer squared. Additionally, thickness of laminin containing fibers, intermingled with adjacent myoblasts, was calculated and expressed in micrometers. For these quantitations, at least ten regions from 3–5 sections from each experimental group were studied.

In Vitro Proliferation and Survival of Human Myoblasts

Commercial laminin-111 obtained from mouse EHS cell line (Sigma) and laminin-211 from human placenta (Gibco-BRL) were used in these experiments. Twenty-four well culture plates (Nunc, Denmark) were coated with 10 μ g/ml laminin or bovine serum albumin (BSA) diluted in F10 culture medium supplemented with 20% fetal calf serum. Coating was carried out in 5% CO₂ atmosphere at 37°C during 1 hour. Two thousand cells were added and left to grow for 3, 6, or 9 days. When the cultures were stopped, viable cells (defined by Trypan blue exclusion) were counted using a Neubauer chamber. This experiment was repeated three times, with triplicates in each experiment.

In two independent experiments, designed to evaluate the number of cycling cells, we added 10 or 20 μ M BrdU solution for 1 hr before stopping a given culture. Cells were then fixed and subjected to immunocytochemistry, using the anti-BrdU monoclonal antibody revealed by a peroxidase conjugated goat-antimouse IgG. The number of BrdU⁺ (cycling) cells was determined by counting under the optical microscope. Cells were counted in at least 10 microscopic fields per group.

To assess cell viability on laminin substratum, human myoblasts were serum-starved overnight, detached with trypsin, washed, and kept in F-10 containing medium with or without 1% BSA for 1 hr. Ten million cells were resuspended in serum-free medium and allowed to adhere on the pre-coated dishes. Four and 24 hours later, the cells were harvested and stained by trypan blue. The proportions of viable and nonviable cells were determined by trypan blue exclusion and by flow cytometry analysis using propidium iodide staining. Samples were acquired using a FACScalibur (Becton Dickinson) and analyzed with the CELLQuest software. Three independent experiments of this kind were done, each one in triplicates for each experimental group.

Cell Migration Assay

Myoblast migratory activity was assessed using 8- μ m pore size transwell plates (Corning Costar, Cambridge, MA). In this assay, membranes were coated on both sides with distinct concentrations of laminin-111, laminin-211, or BSA (from 0.1 to 10 μ g/ml) for 1 h at 37°C, followed by 1 h of blocking with BSA 1%. Myoblasts (10⁵) were then added to the upper chamber in 100 μ l of BSA 0.5%/Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, and 600 μ l BSA 0.5%/RPMI were put in the lower chamber. After 4 hr of incubation, the cells in the upper chamber were gently removed using a rubber policeman, and those that crossed the insert or were at the lower side were removed by trypsinization and counted under the microscope. At least five experiments of this kind were performed for each laminin isoform.

Statistics

All quantitative data are presented as the mean $\pm$ standard error, and the significance of differences between groups were determined using the analysis of variance (ANOVA) test. Differences were considered significant when *P* values were ≤ 0.05 .

RESULTS

Muscle Irradiation Favors the Long-Term Survival of Engrafted Human Myoblasts

To examine the effect of host muscle irradiation on the fate of transplanted human myoblasts, we performed immunohistochemical analyses in sectioned muscles from recipient mice. The total number of human nuclei labeled by lamin A/C, a component of nuclear envelope, was counted 4 weeks after myoblast transplantation. The number of transplanted cells was significantly higher in irradiated-host muscle, as compared to the cryodamaged non irradiated recipient's tissue (Fig. 1A and B).

When irradiation plus cryodamage treatments were applied, the total number of donor cells was even higher, as compared to each treatment alone. The group treated by irradiation alone revealed a 12-fold increase in the number of human cells, whereas muscles in the irradiation plus cryodamage group contained around 30-fold more human cells than in muscles subjected only to cryodamage (Fig. 1A).

To confirm that the transplanted mononucleated human cells were still myogenic, we evaluated the expression of desmin after cell injection into irradiated muscles. Although the antibody applied was not specific for human cells, by double immunostaining we observed that at 4 weeks posttransplantation, the majority of the mononucleated human lamin A/C positive cells also expressed desmin, thus confirming their myogenic lineage (Fig. 1C and D).

As expected, when myoblasts were injected into nonirradiated and noncryolesioned muscles, none or very few engrafted cells were found. Even when detected, these few donor cells were restricted to a small area, compatible with the injection site.

Muscle Irradiation Favors Proliferation of Human Myoblasts

We then evaluated whether human myoblasts retained their ability to proliferate after transplantation into the recipient's irradiated muscle. At 24 hours and 3 days posttransplan-

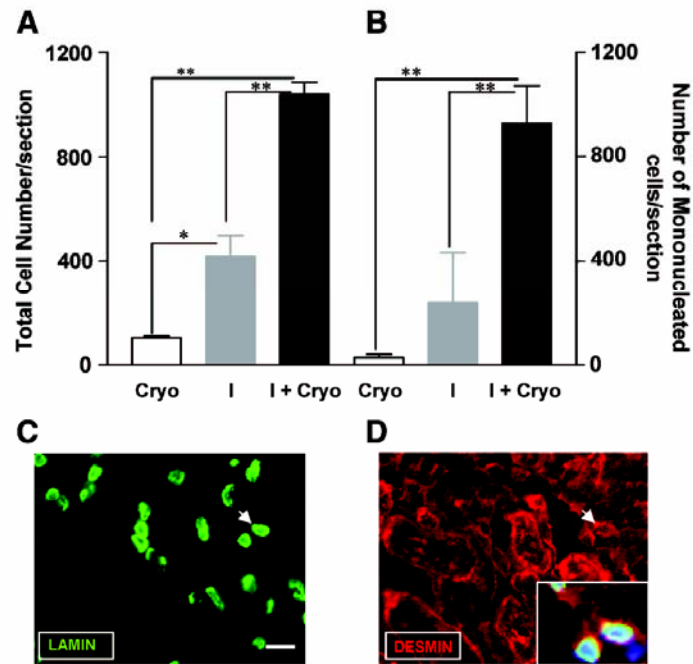


FIGURE 1. Local irradiation plus cryodamage enhances the number of human myoblasts within the immunodeficient mouse recipient. A total of 500,000 human myoblasts were implanted into the tibialis anterior muscle of Rag⁻/γc⁻/C5 mice, previously submitted to one of the following regimens: cryodamage alone (Cryo), local muscle irradiation alone (I), or local muscle irradiation plus cryodamage (I + Cryo). Four weeks later, immunofluorescence labeling was performed on serial cross sections. Bars illustrate the number of lamin A/C and spectrin positive cells within host muscles. Differential analysis of the total number of (A) human myogenic cells (human mononuclear cells plus myofibers) and (B) mononucleated donor cells in host muscle. The numbers presented in these bars are from one single section that presented the highest number of human cells. Note that irradiated muscles contain more positive cells than the cryodamaged muscle. Values are expressed as means ± SEM, n = 4–6 muscles per group. Statistical differences were ascertained by ANOVA. ***p* < 0.005. Double-staining for (C) human lamin A/C and (D) desmin in the irradiated plus cryodamaged Rag⁻/γc⁻/C5⁻ muscle 4 weeks after human myoblast transplantation. The insert in (D) depicts the two cells indicated by the arrow in (C) by the overlay picture, which includes the nuclear blue staining and the laminin A/C (green) in desmin positive cells (red). Bar = 62.5 μm.

tation, large numbers of engrafted human cells had uptaken BrdU. At these time points, the number of proliferating cells in the irradiated and cryolesion nonirradiated groups were very similar (Fig. 2A and B), depicting BrdU⁺ donor-derived myoblasts in an irradiated plus cryolesioned recipient's muscle.

Considering these findings and to determine if the increased number of mononucleated donor cells (Fig. 1B) seen in irradiated muscles 4 weeks after transplantation was due to a continued proliferation of these cells, we examined the expression of the nuclear protein Ki-67, which is only detected in proliferating cells. We observed that, in the case of the irradiated group, 9.7% of donors cells were Ki67-positive, whereas in those recipients submitted to the cryodamage plus irradiation, a total of 26% of the cells remained as cycling donor cells (Fig. 2C–F).

The fact that Ki-67⁺ donor cells were detected, even 4 weeks after injection, suggests that the endogenous mechanisms controlling myoblast proliferation remain functional for a long time within the irradiated muscles.

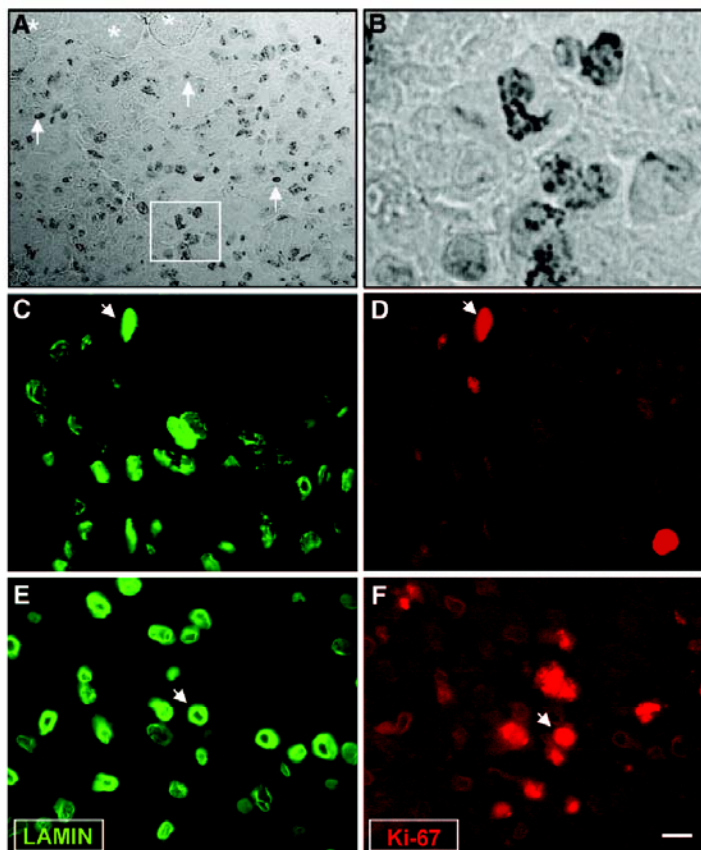
It should be noted that in nonirradiated and noncryolesioned muscles of the few engrafted human cells observed, none were proliferating, as defined by Ki-67⁺ immunostaining.

Does Local Irradiation Favor Donor Cell Maturation Into Muscle Fibers?

We further investigated whether or not irradiation would also favor the differentiation of donor cells into mature myofibers. Surprisingly, in the irradiated muscles, the majority of injected myoblasts remained as mononucleated cells and were not incorporated into muscle fibers (Fig. 1A). Nevertheless, pretreatment with irradiation alone as well as irradiation plus cryodamage did result in the generation of significantly higher numbers of mature fibers, as compared to cryodamage alone (Fig. 3A).

In vivo differentiation and maturation of the engrafted cells was evaluated by slow myosin heavy chain expression (MyHC). Four weeks after transplantation, MyHC⁺ donor-derived cells were detected in transverse sections from different zones of the irradiated muscle, with no quantitative differ-

FIGURE 2. Persistence of cycling human donor cells within the irradiated host muscle. (A) Even at 72 hr postmyoblast delivery, a large number of donor cells were still cycling as revealed by BrdU labeling (herein revealed by anti-BrdU monoclonal antibody plus peroxidase as the second antibody). In this niche, large numbers of cells are cycling. Bar=28.4 μ m. Arrows indicate BrdU⁺, whereas asterisks show cross sections of the recipient's muscle fibers. (B) The white rectangle from (A), in which we can easily see the nuclei labeled and the round profile typical of the injected myoblasts. Bar=28.4 μ m. (C–F) immunofluorescence of cryosections, double stained for human laminin A/C and Ki-67 in Rag^{−/γc}/C5[−] muscles from irradiated (C, D) and irradiated plus cryodamaged muscles (E, F) 4 weeks after human myoblast transplantation. The arrowheads indicate donor-derived cycling cells double-stained by laminin (green) and Ki-67 (red). Bar=28.4 μ m.



ences being apparent among the groups analyzed (Fig. 3B and C). This is interesting because the TA in the mouse does not express slow MyHC and therefore the slow myosin heavy chain expression is driven by the incorporated human nuclei.

Taken together, these results indicate that the *in vivo* differentiation process was similar in the three groups, suggesting that transplanted human myoblasts retained the regulatory mechanisms to undergo terminal muscle differentiation within the irradiated muscular tissue.

Irradiation Alters the Recipient's Laminin-Containing Network: Correlation With Donor Cell Distribution

Since laminin is known to improve myoblast proliferation *in vitro* (19, 26, 27), we evaluated putative changes in the laminin-containing network of the recipient's muscle after the irradiation procedure. Recipient muscle mass was not uniform because the irradiated muscles were more atrophic than the muscle submitted to cryodamage alone. This decrease in muscle mass was accompanied by an irradiation-induced disorganization of the laminin distribution 4 weeks postdonor cell injection, with higher amounts of this molecule being observed in irradiated versus cryodamaged groups

(Fig. 3D and E). Similar profiles to those found in irradiated muscles alone were seen in muscles pretreated with irradiation plus cryodamage. It should be noted that, not only was the total laminin content significantly higher in cryolesioned plus irradiated muscle versus nonirradiated cryolesioned tissue (as ascertained by automated counting of pixels/ μ^2 of muscle tissue), but also the laminin layers between adjacent cells were thicker (Fig. 3F).

Interestingly, such an increase in the laminin content was a rather early event and could be detected at 3 days after irradiation, the time at which human myoblasts were injected. This indicates that an enriched laminin-containing microenvironment was already available for the implanted cells. In this respect, when evaluating the localization of the recently injected human myoblasts within the irradiated recipient's tissue (24 hr after cell injection), we found that there is a preferential distribution of donor cells in laminin-enriched regions (Fig. 3F and G).

In addition, although we did not perform morphometric analysis, it was clear that the surface of the muscle tissue containing donor cells was larger in irradiated as compared with cryodamage treated muscles, indicating that injected cells exhibit an enhanced migratory ability when placed within the

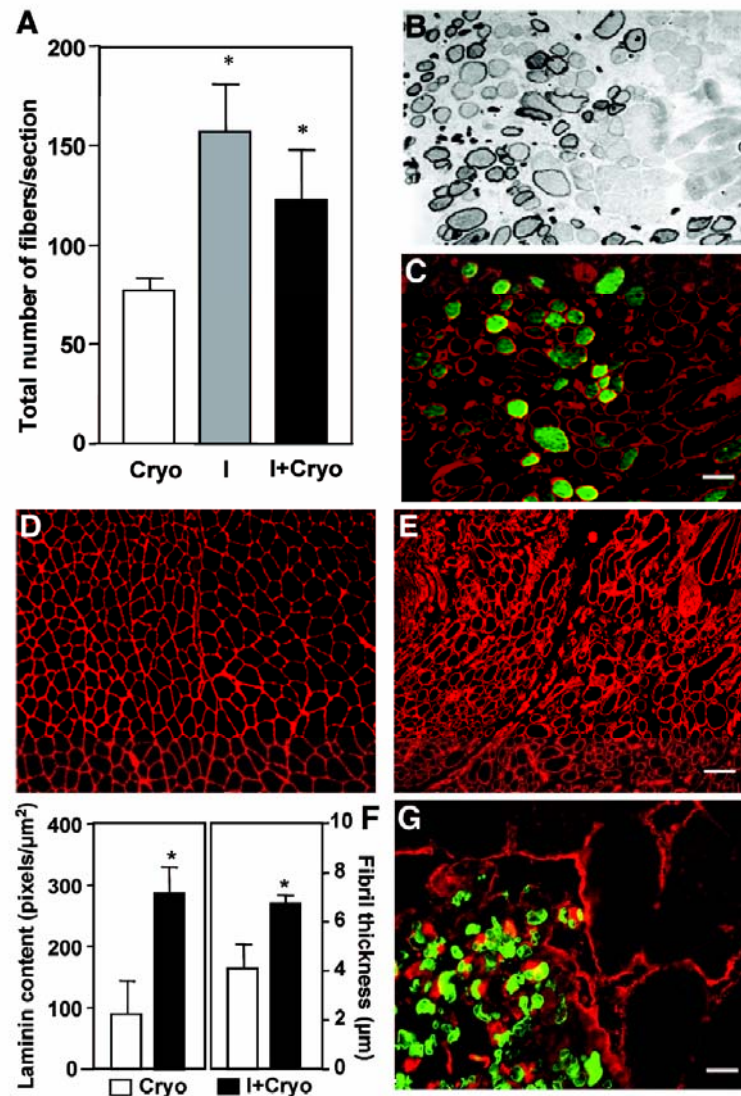


FIGURE 3. Preferential incorporation of human cells within irradiated muscle: correlation with laminin content. Human myoblast transfer was performed and host muscles from Rag^{-/-}/γC^{-/-}/C5 mice were examined 4 weeks later. A differential analysis was made by comparing the total number of positive nuclei labeled by lamin A/C with those incorporated into muscle fibers (lamin A/C plus spectrin positive cells). (A) The frequency of human fibers was significantly higher in irradiated muscles compared to the cryodamage group (cryo). Serial sections stained for laminin A/C, spectrin (B), as well as slow MyHC (green) and laminin (red) antibodies (C), demonstrates the differential pattern of donor fibers in irradiated plus cryodamaged muscles. Bar=125 μm . * $P<0.05$. (D and E) Immunofluorescence staining using a laminin polyclonal antibody, which revealed a differential pattern of laminin expression in the transplanted muscle area according to the treatment used, with an increase in laminin deposition in muscles from irradiated plus cryodamage (E) as compared to cryodamage control (D). This increase in laminin deposition is accompanied by a disorganization of tissue architecture in irradiated mice. Bar=90 μm . (F) The enhancement of laminin, quantified by computer-based analysis, was significantly higher in the irradiated plus cryodamage (I+Cryo) group as compared to the cryodamage control (Cryo). Data were expressed in pixels/ μm^2 and values were expressed as means $\pm$ SEM, $n=3$ muscles per group with at least 10 microscopic fields analyzed. Statistical differences were ascertained by ANOVA. (F) This panel also reveals that the thickness of laminin-containing fibrils located between adjacent cells were statistically bigger in the I+Cryo group, as seen by the mean thickness expressed in micrometers. * $P<0.05$. (G) Injected myoblasts (seen in green by lamin A/C immunostaining) are preferentially located in laminin-enriched areas (red) in a representative cross section from irradiated plus cryodamaged muscle. Bar=45 μm .

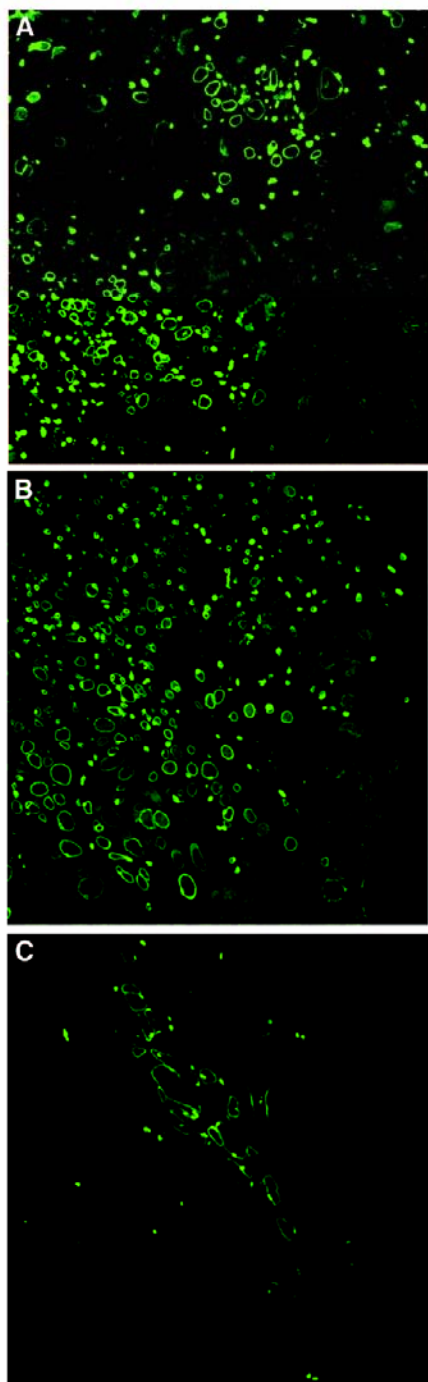


FIGURE 4. Distribution of human myogenic precursors within the irradiated recipient muscle. A total of 800,000 human myoblasts were implanted into the tibialis anterior muscle of Rag^{-/-}/γC^{-/-}/C57 mice, previously submitted to one of the following regimens: irradiated (A) or irradiated plus cryodamage (B). Four weeks later, immunofluorescence la-

irradiated muscle microenvironment (Fig. 4A and B). As mentioned above, in those nonirradiated noncryolesioned muscles the rare donor-derived cells were restricted to a small area, compatible with the injection site (Fig. 4C).

Laminin-111 Enhances Human Myoblast Proliferation, Survival, and Migration

Considering that irradiation resulted in an enhanced proliferation of the human myoblasts *in vivo*, together with a change in the local laminin content and the presence of donor cells within laminin-enriched areas, we studied laminin-driven biological responses *in vitro*, using the same myoblast cell batch used for the *in vivo* experiments. In one set of experiments, we evaluated cell growth on laminin-coated substrate. We found that proliferation was progressively enhanced when the cells were cultured on 10 μg/ml laminin compared to the control with BSA, applied as an unrelated protein. On day 6 posttreatment, the number of laminin-treated cells was higher than BSA (7.13×10^5 versus 6.03×10^5), representing an increase of almost 20% in the total cell number, a difference that was statistically significant ($P=0.024$). Interestingly, the use of laminin alone yielded proliferation values similar to those seen when the cells were grown in complete serum-containing medium.

In a second set of experiments, we studied whether the enhancement of cell engraftment in irradiated muscle could also be associated to the capacity of laminin to rescue cells from apoptosis. For this, we tested the survival capacity of human myoblasts after being placed in conditions of starvation. As ascertained by the trypan blue exclusion test, as well as by cytofluorometry using propidium iodide, we found that laminin-111 was able to protect myoblasts from the cell death triggered by starvation (Fig. 5), whereas at the same concentration laminin-211 was less effective.

In addition to the upregulation of cell proliferation and survival, we examined if laminin was able to alter the migration of human myoblasts. When cells were allowed to migrate through a laminin-containing insert in transwell chambers, the number of migrating cells was significantly higher, as compared to BSA. Under the experimental conditions used here, laminin-111 exhibited a dose-dependent haptotactic effect on human myoblast migration (Fig. 6A). Laminin-211 was again less effective than laminin-111 in promoting myoblast migration (Fig. 6B).

DISCUSSION

During skeletal muscle regeneration, multiple signals derived from degenerated fibers regulate the activation of myogenic cell precursors. As regards to myoblast transplantation therapy, it is conceivable that *in vivo* migration and differentiation of grafted cells are guided by a complex interaction between injected cells and the recipient's tissue microenvironment.

beling using antibodies against human anti-lamin A/C and human antispectrin was performed on serial cross sections. (C) One muscle of a nonirradiated, noncryolesioned muscle, in which very few donor cells were found. After searching for donor cells throughout the muscle, we noticed that the few cells detected were restricted to this site. Bar = 130 μm.

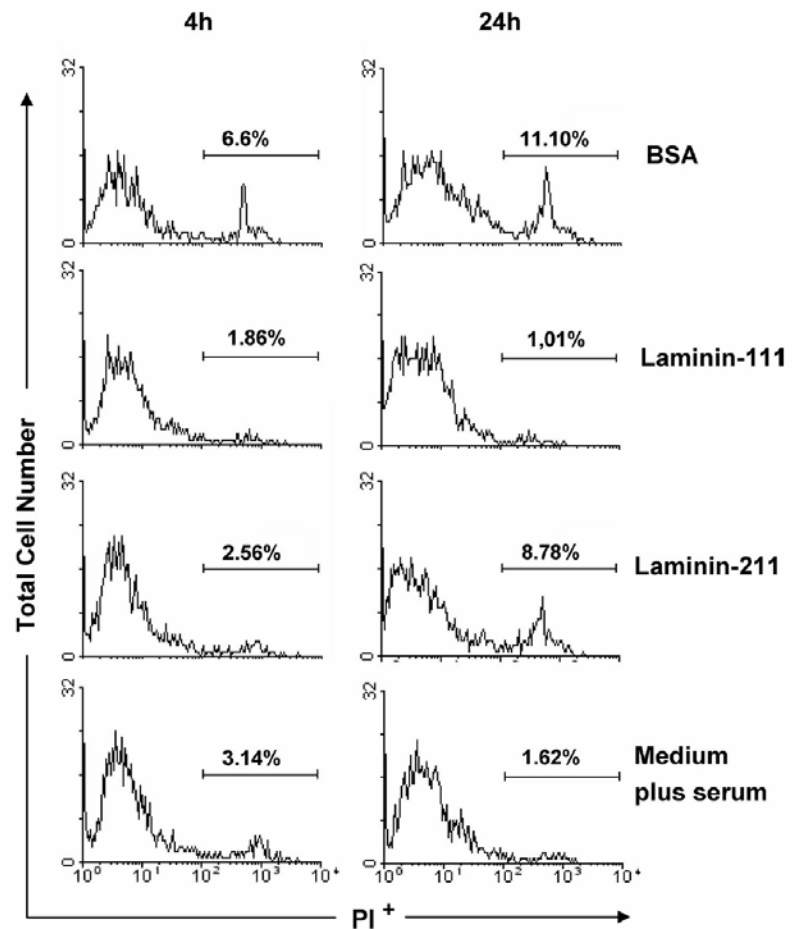


FIGURE 5. Protective effect of laminin on starvation-induced human myoblast death. Representative histograms illustrating the frequency of propidium iodide (PI) positive human myoblasts. Serum-starved cells were detached and maintained in suspension for 1 hr and then replated on dishes pre-coated with laminin for 4 and 24 hr. Note that 24 h after the number of apoptotic cells in laminin coating dishes was lower than in complete medium. Moreover, the frequency of dead myoblasts was always significantly lower in laminin-111 than in laminin-211 plates. This data shows the percentage of apoptotic cells counted at each point and expressed as the mean of three independent experiments.

To study the *in vivo* mechanisms that can potentiate the engraftment of muscle cell precursors, we analyzed human myoblast transplantation in locally irradiated immunodeficient Rag2^{-/-}/γc^{-/-}/C5^{-/-} mice. The combined application of irradiation and cryodamage to the host muscle induced an enhancement of human myoblast engraftment accompanied by a statistically significant increase in the deposition of laminin, as ascertained by the number of pixels per micrometer squared. Moreover, the thickness of laminin fibrils between adjacent cells was enhanced in treated animals. Conjointly, these quantitative data strongly point to a correlation between laminin enrichment and the presence of myoblasts.

It has been previously demonstrated that ECM components have a strong effect upon skeletal muscle development (12, 28–31). In particular, the presence of laminin is essential for normal myogenesis by direct interactions mediated via plasma membrane receptors (13, 19, 32, 33).

Considering the function of laminin during myogenesis and cell migration, it is evident that this molecule could also play an important role in the successful engraftment of myoblasts within regenerating skeletal muscle.

In the present study, using the model of local host muscle irradiation, we detected a high percentage of donor cell engraftment. This was accompanied by a significant increase in the deposition of laminin, particularly in the vicinity of engrafted cells, suggesting that laminin within the recipient's microenvironment favors the engraftment of human myoblasts. We also found that significant numbers of the engrafted cells maintained their proliferative capacity for a long period of time *in vivo*, which was further confirmed by our *in vitro* experiments. One could argue that these donor-derived long-lasting proliferating cells are a mixture of myoblasts and other cell types, such as fibroblasts. Although we cannot formally discard this possibility, it should be noted that the majority of the proliferating cells were round-shaped and never exhibited the typical fibroblastic profile. Moreover, our data are in keeping with previous reports showing a direct correlation between the laminin concentration and the biological effects observed in myoblasts, such as cell proliferation and survival (21, 34–36).

During the process of skeletal muscle regeneration, two mutually exclusive events occur: precursor cell proliferation

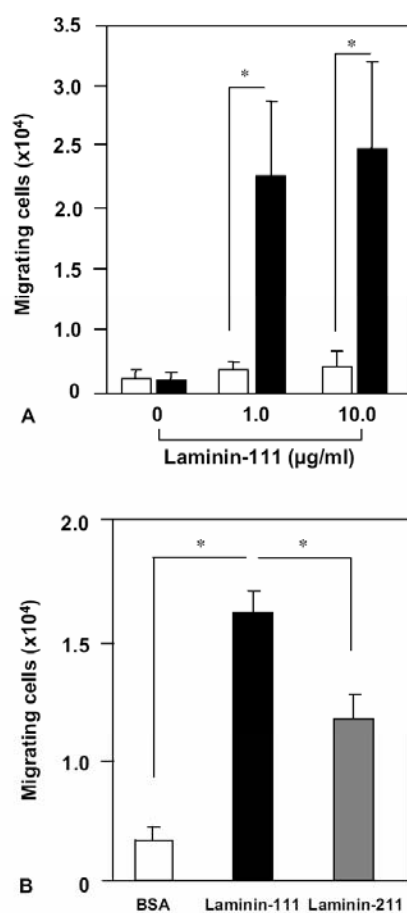


FIGURE 6. Enhancement on myoblast migration induced by laminin. (A) Nonspecific myoblast migration, seen when BSA (white columns) was applied in the transwells, was very similar at all points analyzed. In contrast, laminin-driven migration of myoblasts (black columns) is significantly enhanced according to the concentration applied. (B) Comparative analysis of human myoblast migration when the same dose (10 µg) of laminin-111 or laminin-211 was applied to the transwell chambers. Note that laminin-111 had a much greater effect on cell migration than laminin-211. Results are expressed as the mean of the total number of migrating cells in three independent experiments (mean±SEM). * $P < 0.05$.

and myogenic differentiation. This process is driven by a finely tuned gene program that causes the withdrawal of myoblasts from the cell cycle, leading to terminal differentiation (37). We have shown that irradiation not only enhanced the total number of engrafted cells, but also resulted in the formation of a large number of mature muscle fibers as demonstrated by slow MyHC expression. Conceptually, these data tell us that the laminin-enriched microenvironment remains permissive to a "complete" program of muscle cell regeneration. This notion is supported by previous data showing that

the laminins are involved in both expansion and differentiation of myogenic cell precursors (17–22, 34–36).

Another important point that could be associated with the local enhancement of laminin is the increased migratory capacity of donor-derived grafted myoblasts. Our in vivo observations indicated that human myoblasts are much more dispersed in the recipient's muscle that had been irradiated (or irradiated plus cryodamaged) compared to the nonirradiated groups.

Laminins are known to play a well-defined role in the migration process of different cell types (38–40), with the effect upon muscle progenitors being detected very early during skeletal muscle morphogenesis (13, 41). In this respect, the differences observed in irradiated versus nonirradiated muscles seem to be consistent with the in vitro experiments.

According to our results, laminin-111 is better than laminin-211 in inducing myoblast migration, with the migratory capacity of these cells being increased as a function of the dose of laminin-111 applied. These differences reinforce the notion that, although these isoforms share many properties, they may be involved in distinct pathways during muscle regeneration (19, 34). Moreover, our results are in keeping with the findings showing that transgenically introduced laminin-α1 chain partially prevents muscular dystrophy in mice deficient for laminin-α2 chain (42, 43).

Overall, our data highlight the important role of laminin on human myogenic precursors. Even though the experimental model used here cannot be envisioned as a therapeutic alternative, our results clearly indicate that in irradiated muscles 4 weeks after cell transplantation, factors controlling cell cycle and differentiation continue to be produced, placing this procedure as a valuable tool to evaluate and define the molecular interactions implicated in muscle regeneration during myoblast transplantation therapy. Theoretically, the effectiveness of these factors may be favored by the reduced competition between donor and host myoblasts in the irradiated muscle (5–9). Nevertheless, part of these effects may be driven by the enhancement of laminin production within host's muscle, which in turn provides a powerful tool to test the function of this molecule in vivo. A better understanding of the mechanisms by which different isoforms of this molecule control myoblast proliferation and migration may provide new insights on how to improve cell therapy in muscular diseases.

REFERENCES

- Skuk D, Caron NJ, Goulet M, et al. Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: Detection, dynamics and mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 951.
- Gulati AK. The effect of X-irradiation on skeletal muscle regeneration in the adult rat. *J Neurol Sci* 1987; 78: 111.
- Gross JG, Bou-Gharios G, Morgan JE. Potentiation of myoblast transplantation by host muscle irradiation is dependent on the rate of radiation delivery. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 371.
- Pagel CN, Partridge TA. Covert persistence of mdx mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. *J Neurol Sci* 1999; 164: 103.
- Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem-cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999; 144: 113.
- Gross JG, Morgan GE. Muscle precursor cells injected into irradiated mdx mouse muscle persist after serial injury. *Muscle Nerve* 1999; 22: 174.

7. Wernig A, Zweyer M, Irinchev A. Function of skeletal muscle tissue formed after myoblast transplantation into irradiated mouse muscles. *J Physiol* 2000; 522: 333.
8. Morgan JE, Gross JG, Pagel CN, et al. Myogenic cell proliferation and generation of a reversible tumorigenic phenotype are triggered by preirradiation of the recipient site. *J Cell Biol* 2002; 157: 693.
9. Hodgetts SI, Grounds MD. Irradiation of dystrophic host tissue prior to myoblast transfer therapy enhances initial (but not long term) survival of donor myoblast. *J Cell Sci* 2003; 116: 4131.
10. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200: 448.
11. Gullberg D, Tiger CF, Velling T. Laminins during muscle development and in muscular dystrophies. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 442.
12. Osses N, Brandan E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C383.
13. Bajanca F, Luz M, Raymond K, et al. Integrin-laminin interactions regulate early myotome formation in the mouse embryo. *Development* 2006; 133: 1635.
14. Michele DE, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: Post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem* 2003; 278: 15457.
15. Miner JH, Yurchenko PD. Laminin function in tissue morphogenesis. *Annu Rev Dev Cell Biol* 2004; 20: 255.
16. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 2005; 24: 326.
17. Kuhl U, Timpl R, von der Mark K. Synthesis of type IV collagen and laminin in cultures of skeletal muscle cells and their assembly on the surface of myotubes. *Dev Biol* 1982; 93: 344.
18. Kroll TG, Peters BP, Hustad CM, et al. Expression of laminin chains during myogenic differentiation. *J Biol Chem* 1994; 269: 9270.
19. Vachon PH, Loechel F, Xu H, et al. Merosin and laminin in myogenesis: Specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol* 1996; 134: 1483.
20. Kroll TG, Peters BP, Hustad CM, et al. Expression of laminin chains during myogenic differentiation. *J Biol Chem* 1994; 269: 9270.
21. Foster RF, Thompson JM, Kaufman SJ. A laminin substrate promotes myogenesis in rat skeletal muscle cultures: Analysis of replication and development using antidesmin and anti-BrdUrd monoclonal antibodies. *Dev Biol* 1987; 122: 11.
22. von der Mark, Ocalan M. Antagonistic effects of laminin and fibronectin on the expression of the myogenic phenotype. *Differentiation* 1989; 40: 150.
23. Yao CC, Ziober BL, Sutherland AE, et al. Laminins promote the locomotion of skeletal myoblasts via the alpha 7 integrin receptor. *J Cell Sci* 1996; 109: 3139.
24. Irinchev A, Langer M, Zweyer M, et al. Functional improvement of damage adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *J Physiol* 1997; 500: 775.
25. Edom F, Mouly V, Barbet JP, et al. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. *Dev Biol* 1994; 164: 219.
26. Di Donna S, Mamchaoui K, Cooper RN, et al. Telomerase can extend the proliferative capacity of human myoblasts, but does not lead to their immortalization. 2003. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 643.
27. Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, Di Santo JP, Mouly V. Comparative analysis of genetically engineered immunodeficient mouse strains as recipients for human myoblast transplantation. *Cell Transplant* 2005; 14: 457.
28. Owin BB, Hall ZW. Developmental regulation of laminin accumulation in the extracellular matrix of a mouse muscle cell line. *Dev Biol* 1985; 112: 359.
29. MacCalman CD, Bardeesy N, Holland PC, Blaschuk OW. Noncoordinate developmental regulation of N-cadherin, N-CAM, integrin and fibronectin mRNA levels during myoblast terminal differentiation. *Dev Dyn* 1992; 195: 127.
30. Brandan E, Carey DJ, Larrain J, et al. Synthesis and processing of glypican during differentiation of skeletal muscle. *Eur J Cell Biol* 1996; 71: 170.
31. Melo F, Carey DJ, Brandan E. Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression. *J Cell Biochem* 1996; 62: 227.
32. Mayer U, Saher G, Fassler R, et al. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Gen* 1997; 17: 318.
33. Burkin DJ, Kaufman SJ. The alpha 7 beta 1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res* 1999; 296: 183.
34. Goodman SL, Risse G, von der Mark K. The E8 subfragment of laminin promotes locomotion of myoblasts over extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989; 109: 799.
35. Ocalan M, Goodman SL, Kuhl U, et al. Laminin alters cell shape and stimulates motility and proliferation of murine skeletal myoblasts. *Dev Biol* 1988; 125: 158.
36. Li J, Rao H, Burkin D, Kaufman SJ, Wu C. The muscle integrin binding protein (MIBP) interacts with alpha7beta1 integrin and regulates cell adhesion and laminin matrix deposition. *Dev Biol* 2003; 261: 209.
37. Lassar AB, Skapek SX, Novitch B. Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 788.
38. Vande Broek I, Vanderkerken K, De Greef C, et al. Laminin-1-induced migration of multiple myeloma cells involves the high-affinity 67 kD laminin receptor. *Br J Cancer* 2001; 85: 1387.
39. Gu YC, Kortessmaa J, Tryggvason K, et al. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood* 2003; 101: 877.
40. Kariya Y, Miyazaki K. The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. *Exp Cell Res* 2004; 297: 508.
41. Tosney KW, Dehnbostel DB, Erickson CA. Neural crest cells prefer the myotome's basal lamina over the sclerotome as a substratum. *Dev Biol* 1994; 163: 389.
42. Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Eklom P, et al. Laminin alpha1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha2 chain deficient mice. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1775.
43. Gawlik K, Mayer U, Blomberg K, et al. Laminin alpha1 chain mediated reduction of laminin alpha2 chain deficient muscular dystrophy involves integrin alpha7beta1 and dystroglycan. *FEBS Lett* 2006; 580: 1759.

3.2 - Artigo 2:

HGF ENHANCES EXTRACELLULAR MATRIX-DRIVEN MIGRATION OF HUMAN MYOBLASTS: INVOLVEMENT OF MATRIX METALLOPROTEASES

Wallace de Mello, Gillian S. Butler-Browne, Vincent Mouly,
Wilson Savino, Suse Dayse Silva-Barbosa

Procuramos nesse estudo avaliar o papel de HGF, fator envolvido na migração de progenitores durante a miogênese, sobre a migração de mioblastos humanos obtidos a partir de tecido muscular esquelético normal.

Esse manuscrito representa um seguimento ao trabalho anterior, do ponto de vista de estabelecimento de protocolos visando aumento da eficácia do processo de transplante. Com esse objetivo avaliamos o efeito de HGF exógeno, assim como de proteínas de matriz extracelular (laminina e fibronectina) e metaloproteases de matriz extracelular, na migração de mioblastos humanos, células a serem potencialmente escolhidas como precursores a serem utilizados em protocolos de terapia celular com vistas à correção de distrofias.

Através de técnicas de biologia celular e molecular verificamos que a molécula de HGF potencializa a função haptotática de proteínas de matriz extracelular sobre precursores miogênicos humanos. Além disso, demonstramos que o tal efeito potencializador depende da produção da metaloprotease de matriz MMP-2, a qual tem sua atividade aumentada em função da presença de HGF.

De acordo com nossos resultados, e dos resultados já descritos na literatura, a molécula de HGF seria assim um ativador potencial a ser utilizado adicionalmente no transplante envolvendo precursores musculares humanos.

HGF ENHANCES EXTRACELLULAR MATRIX-DRIVEN MIGRATION OF HUMAN MYOBLASTS: INVOLVEMENT OF MATRIX METALLOPROTEASES

Wallace de Mello¹, Gillian S. Butler-Browne², Vincent Mouly²,
Wilson Savino¹, Suse Dayse Silva-Barbosa^{1,2}.

¹Laboratory on thymus research, Oswaldo Cruz Institute,
Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.; ²UMR S 787 INSERM,
Université Pierre et Marie Curie, Institut de Myologie, Paris, France.

Keywords: Myoblast transplantation, HGF, migration, laminin, fibronectin, matrix metalloproteinases.

Address for Correspondence:

Suse Dayse Silva-Barbosa

Laboratory on Thymus Research,

Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation,

Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.

Phone: (55)(21)3865-8116 -- Fax: (55)(21)3865-8101

e-mail: suse@fiocruz.br - susebarbosa@hotmail.com

Abstract

Although myogenic precursors have been used to correct muscle injury, this cell therapy approach still faces critical limitations, including the poor cell survival and cell spreading in the recipient's muscle. Previous evidence indicates that HGF (hepatocyte growth factor) is involved in guiding embryonic myogenic precursors from somite to muscle developing areas. Herein we determined whether HGF is able to modulate human myoblast migration on extracellular matrix (ECM) proteins. We demonstrated that human myoblasts (derived from a normal infant muscle) express the HGF receptor (c-met), β 1-integrins, CD56, and desmin. In order to check whether HGF modulates migration of human myogenic precursors, we tested the migratory potential towards this growth factor *in vitro*, in the presence or absence of laminin and fibronectin. Although HGF alone did not enhance myogenic precursor cell migration, when it was combined with laminin or fibronectin, the resulting migratory response significantly was higher than the values elicited by a given ECM molecule alone. Next, we searched whether HGF could be modulating matrix metalloproteases (MMP) production by myogenic precursors, thus favoring ECM-driven migration. After treating myoblasts with HGF, we detected an increase in MMP-2 activity, as revealed by zymography. Conversely, MMP-2 inhibition decreased HGF-associated enhancement of cell migration triggered by fibronectin or laminin. Taken together, these data unravel the complexity of the control mechanisms involved in the appropriate migration of human myogenic cell precursors, simultaneously comprising soluble and insoluble moieties. This notion should be taken into account for a better design of

therapeutic strategies for ameliorating the spreading of these cells following transplantation.

INTRODUCTION

Muscular dystrophies are a group of genetic neuromuscular disorders characterized by progressive muscle weakness, leading in most severe forms to death. Diverses approaches have been developing in order to recovery deficient target proteins using gene therapy (Goyenvallé *et al*, 2004; Fougérousse *et al*, 2007) and transplantation of normal or modified cells (Vilquin *et al*, 1999; Montarras *et al*, 2005; Ikemoto *et al*, 2007).

Cell transplantation therapy, as a promising strategy to treat muscle dystrophy, has been intensively investigated in the last few years. However, attempts to repair muscle damage by transplanting myogenic progenitors still faces the problem of cell surviving and the limited migration of transplanted cells in recipient's muscle (Urish *et al*, 2005). In order to overcome this limitation, the effect of several growth factors, such as insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II), basic fibroblast growth factor (b-FGF), transforming growth factor (TGF- β), IL-6 and hepatocyte growth factor (HGF) have been tested (Jacquemin, *et al* 2004; Lafrenière *et al*, 2004).

Myoblast migration is a multistep event that depends on some types of interactions. Extracellular matrix (ECM) binding, soluble factors as cytokines, chemokines and proteolytic enzymes are closely related with successful migration (Mielenz *et al*, 2001; Torrente *et al*, 2003; Yusuf *et al*, 2006). Soluble factors produced by different microenvironmental conditions may bind to the microenvironmental ECM-containing network, performing a gradient that may attract cells. Moreover, ECM remodeling promoted by proteolytic enzymes may

release growth factors sequestered by this network, increasing their chemoattractant potential by enzymatic cleavage (Matsouka *et al*, 2006).

It has been demonstrated that HGF is a potent satellite cell activator having an important mitogenic role in muscle development, promoting in the developing embryo the recruitment of myogenic precursors from somite to early muscle areas (Sonnenberg *et al*, 1993). HGF is able to activate quiescent satellite cells to enter into the cell cycle (Miller *et al*, 2000). This factor is secreted as a 92 kDa biologically inactive single polypeptide chain precursor referred to as pro-HGF, which binds to ECM through heparin-like glycosaminoglycans (Catlow *et al*, 2008). Some extracellular proteolytic enzymes, as urokinase plasminogen activator, thrombin, matrilysin, may cleave pro-HGF, into a bioactive disulfide-linked heterodimer consisting of a 60 kDa α -chain and a 32 kDa β -chain (Nakamura *et al*, 1989), now able to convey intracellular signaling mediated by c-met, a transmembrane tyrosine kinase encoded by MET proto-oncogene (Shimomura *et al*, 1993; Schuppan *et al*, 1998; Lee *et al*, 2000). The role of matrix metalloproteases (MMPs) in pro-HGF cleavage and activation is not well studied. Nevertheless, MMP upregulation following HGF treatment has been reported in different models (Hanzawa *et al*, 2000; Wang & Keiser, 2000; Gong *et al*, 2003)

Despite the identification of HGF secretion and expression of HGF receptor in quiescent cultured myogenic satellite cells (Sheehan *et al*, 2000), it remains unclear whether HGF-mediated interaction actually plays a role in postnatal myogenic precursor cells.

It has been demonstrated *in vitro* that various chemotactic factors, including HGF, can modulate the process of myoblast migration across an endothelial barrier (Corti *et al*, 2001). Furthermore, a correlation between HGF and invasive cell growth has been documented during development and regeneration of different tissues (Bladt *et al*, 1995) as well as in tumor cells, in which the increase in invasiveness is accompanied by upregulation of β 1-integrin avidity for corresponding ECM ligands (Trusolino *et al*, 2000). Moreover, it has been demonstrated that the association between HGF and an ECM-containing network (matrigel) can improve myogenicity in a system of ectopic skeletal muscle transplantation (Barbero *et al*, 2001). Although in this study the graft improvement was not related to adhesiveness to ECM, it is plausible that optimal interactions between cells and molecules in the extracellular microenvironment, such as ECM proteins, chemokines and growth factors, convey a survival message, protecting cells from apoptosis, which in turn would significantly improve migration capacity.

Herein, we examined the combined effect of HGF upon ECM-driven migration of human myogenic precursors. Our data show that HGF *per se* essentially do not trigger significantly migratory response, but it significantly potentiates migration only conjointly driven by fibronectin and laminin. Such an effect can be abrogated by MMP inhibitors, thus providing evidence that the enhancement of ECM-driven migratory response provided by HGF is likely associated to the production of metalloproteinases. Taken together, these data may be an important tool to design *in vivo* protocols for cell transplantation.

MATERIAL AND METHODS

Myoblast preparation and cell culture conditions

Cells were isolated from a biopsy of the quadriceps from a 5-day-old infant who died from cardiac malformation, with no signs of neuromuscular disease. The biopsy was performed with consent of the family and in accordance with French legislation on ethical rules. Microfragments of the muscle tissue were plated onto Petri dishes and filled in growing medium composed by Ham's F-10 medium (Invitrogen/Molecular Probes, Carlsbad, CA) supplemented with 50µg/ml of gentamycine and 20% of fetal calf serum at 37°C in 5% CO₂ atmosphere (Edom *et al*, 1994). Mononucleated cells migrating out of explants were deattached from the culture dishes after incubation in a solution containing Trypsin 0.25%/EDTA 0.02 %. Cells were maintained *in vitro*, being applied between 28-37 population doublings (Di Donna *et al*, 2003). The purity of human myoblasts used here was confirmed monitoring the expression of CD56 (N-CAM, neural-cell adhesion molecule). Furthermore, the myogenic capacity of these myoblasts cultures was tested by immunocytochemistry using antibody specific for desmin, as illustrated in figure 1A-B.

For the experiments aiming to detect c-met expression in myoblasts, we applied, as positive control for c-met expression, the human hepatoma cell line HEP-G2 (Lee *et al*, 1998). These cells were cultured in DMEM medium supplemented with FCS 10%, at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

Antibodies and chemicals

The following fluorochrome-labeled antibodies were used for cytofluorometry: the anti-CD29/PE-Cy5, anti-CD49d/PE, anti-CD49e/PE, anti-CD49f/PE and anti-CD56/APC were purchased from Pharmingen/Becton-Dickinson (San Diego, USA).

For immunocytochemistry, we used purified antibodies comprising the anti-human desmin mouse monoclonal antibody (DAKO Co., Carpinteria, USA), as well as the rabbit anti-CD49g (alpha7-integrin) and anti-c-met polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology. Co., Santa Cruz, USA). The anti-desmin reagent was revealed with biotinylated goat-anti mouse Ig (Sigma Co. Saint Louis, USA) followed by streptavidin-peroxidase (Pharmingen). The anti-CD49g antibody was revealed with a peroxidase-coupled goat anti-rabbit Ig serum. In both cases, enzyme activity was developed with 3-Amino-9-ethylcarbazole from Sigma Co. in the presence of H_2O_2 . For detecting c-met, the corresponding primary antibody was revealed with a mouse anti-rabbit Ig, coupled to alkaline phosphatase. In this case, enzyme activity was revealed with the Sigma kit using NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) plus BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate). In all cases primary antibodies and revealing systems were applied after standardization of appropriate dilutions. For fibrillar actin detection, we applied phalloidin conjugated to alexa-488 (Molecular Probes)

Bovine serum albumin (BSA), mouse Laminin-111, human plasma fibronectin and porc tail-derived gelatin were Sigma products. Recombinant human HGF was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). The

MMP-2/-9 Inhibitor III was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). This compound is a cyclic decapeptide with specific binding for MMP-2 and MMP-9, and is able to block migration of human endothelial cells. (Koivunen *et al*, 1999). Lastly, 1mM p-aminophenylmercuric acetate (APMA, a Sigma product) was applied herein as a MMP activator, originally reported by Nagase and co-workers (1992).

Cytofluorometry and immunocytochemistry

For flow cytometry, 10^5 cells were blocked with normal mouse serum and subsequently stained with the target fluorochrome-coupled primary antibodies for 30 min. Cells were washed and fixed with a 1% phormaldehyde. Samples were acquired in a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson), and histograms were obtained with the free WinMDI 2.8 software.

For immunocytochemistry, cells were fixed on substrates with absolute cold ethanol and washed with PBS. Slides were blocked with 10% normal sheep serum for 30 min at room temperature. Primary antibodies were incubated for 2h in the same conditions, and revealed by using either immunofluorescent or enzyme-coupled secondary antibodies. For F-actin staining, cells were incubated on surfaces coated or not with laminin or fibronectin during 1h and fixed with 4% phormaldehyde during 20min, permeabilized with 0,1% triton X-100 for 5min, blocked with 5% BSA during 30min and stained with phalloidin alexa488 for 30min. Images were acquired with LSM 540 confocal laser microscope (Carl Zeiss, Germany).

Western blotting

Human myoblast extracts were prepared by lysing cells in alkaline lysis solution (Tris-HCl 40mM, 1%SDS) with 2-heat cycles. Proteins obtained by this process were quantified with BCA protein kit (Pierce, UK). Samples (40µg) were resolved on 10% polyacrilamide gel and the proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham, Buckinghamshire, UK). The membrane was blocked with 5% non-fat milk, 0,1% Tween 20 in PBS for 2h, and incubate overnight with anti-c-met antibody diluted in blocking solution. Membranes were washed three times with PBS and incubated with an alkaline phosphatase-coupled secondary antibody. Bands were visualized using BCIP/NBT solution kit and scanned images were analysed with the imageJ software (NIH, Bethesda, USA).

Cell Migration Assay

Human myoblast migratory activity was assessed using 8-µm por size inserts (Nunc, Roskilde, Denmark). Membrane inserts were coated on the both sides with 10 µg/mL BSA, Laminin-111, or fibronectin (for 1h at 37°C, followed by 1h of blocking with 0.5% BSA). Myoblasts (10^5 cells) were plated in the upper chamber in 100 µl of 0.5% BSA/F10 medium, and 600 µl of 0.5% BSA/F10 containing HGF at different concentrations were plated in the lower chamber.

After 4h of incubation the cells in the upper chamber were gently removed using a rubber policeman, and those that crossed the insert or were in the lower side were detached with trypsinization and counted under the microscope.

In some experiments, to examine the role of metalloproteinase production on myoblast migration, the MMP-2/-9 Inhibitor III was added in both chambers.

Cell Adhesion assay

To assess the role of HGF in adhesive capacity on ECM substrate, 96-well plates (Nunc) were coated for 1 hour at room temperature with 10µg/ml laminin, fibronectin or BSA as a control. In this assay 10^4 myoblasts resuspended in F-10 medium containing 10ng/ml of HGF were allowed to adhere on pre-coated wells. After 1 hour, the wells were washed, fixed with methanol, stained along 20min with toluidine blue 0.05% solution and destained with 1% SDS (Sigma). The amounts of cells bound to the substrates were detected using a spectrophotometer under 620nm filter.

Zymography

Detection of matrix metalloprotease (MMP)/collagenase activity was performed by gelatin zymography assay. In this assay 2×10^5 human myoblasts were treated with different concentrations of HGF and analysed 4h later. The supernatants (10µg) were then collected, mixed with sample buffer in non-reducing conditions and run in 7.5% polyacrilamide gels co-polymerized with 0,1% gelatin under 40mA until the dye tracker reached the bottom. After

electrophoresis, gels were washed for 1h in renaturing buffer (2.5% Triton X-100, Tris-HCl 50mM pH=7,6) at room temperature and subsequently revealed by incubation in developing buffer (5mM CaCl_2 , 150mM NaCl, Tris-HCl 50mM pH=7,6) for at least 16h. Gels were stained with coomassie blue for 1h and destained with acetic acid-methanol-water. MMPs were identified by comparison with the molecular weight standards (BioRad, Hercules, CA, USA). Metalloprotease activity was visualized as clear bands that were inverted using the photoshop package. Quantification was performed by densitometry using the ImageJ software.

Statistical Analysis

All results are presented as the mean $\pm$ standard error, and the significance of differences between groups were analysed using the ANOVA test and Newman-Keuls post test, using the GraphPad Prism 3.0 software. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Satellite cells form a side myogenic population along muscle fibers that can be dissociated from the muscle tissue by enzyme digestion. Along this isolation some fibroblasts may contaminate the preparation and may interfere on myoblast growth. In order to evaluate whether HGF can elicit a functional response on human myogenic precursors; we further characterized the CHQ myoblast preparations. As seen by CD56 staining, a marker presented on myoblasts, our

culture has almost 100% of purity when checked by flow cytometry. Moreover, these cells retain their myogenic capacity as seen with desmin staining (Fig.1A-B). We also examined the expression of c-met by these cells. As show in figure 1C, the expression of c-met in human myoblasts is comparable to that seen on the hepatoma cell line used herein as a positive control.

HGF does not affect human myoblast adhesion onto extracellular matrix

It was previously demonstrated that interaction between HGF and this receptor c-met regulate muscle cell migration during embryonic development (Sonnenberg *et al*, 1993). Given that cell migration requires the regulation of cell spreading/motility and the disruption of cell-matrix or cell-cell contact, we tested the ability of human myoblasts to adhere on substrate of laminin and fibronectin, in the absence or presence of HGF.

We first showed that our myogenic precursors constitutively express $\beta 1$ -integrins on their surface, as revealed by positive immunolabeling for CD29 ($\beta 1$ -integrin chain) as well as CD49d, CD49e, CD49f and CD49g (the integrin- α chains for the fibronectin receptors VLA-4, VLA-5, as well as the laminin receptors VLA-6 and VLA-7, respectively). These receptors are apparently functional, since myoblasts are able do adhere onto fibronectin as well as laminin substrates. (see figure 2A-B), although adhesion onto fibronectin was higher than that seen when laminin was applied (Fig. 2B). Of note, HGF alone did not yield any specific adhesion (different from the values obtained with BSA), and did not enhance the adhesion degree elicited by laminin or fibronectin (Fig. 2B).

HGF enhances human myoblast migration driven by extracellular matrix proteins

To investigate whether human myoblasts were capable to migrate in a HGF-dependent manner, CHQ cells were placed in the upper chamber of transwells that contained HGF in the lower chamber or, as in some cases the *in vitro* migration experiments were performed using cells previously treated with HGF (see “material and methods”). No differences in migration rate were observed between human myoblasts treated by HGF, or when HGF was used as a chemoattractant factor (data not shown).

Considering our recent data demonstrating that laminin can drive myoblast migration (Silva-Barbosa *et al*, 2008), we examined if HGF was capable to alter migration of human myoblasts triggered by ECM proteins. For that, *in vitro* migration assay was carried out by coating both sides of transwell porous membrane with ECM substrates (see “material and methods”). As expected, laminin and fibronectin induced myoblast haptotaxis. As compared to the BSA negative control, myoblast migration towards ECM moieties was clearly higher. (Fig. 3). In contrast, no effect was detected when the cells were stimulated with HGF in the absence of ECM.

Nevertheless, when HGF was applied in combination with either laminin-111 or fibronectin, the resulting migration values were always superior to those

seen when each stimulus was applied alone. The ECM-associated co-migratory response to HGF was dose dependent, with a maximal response observed at a concentration of 10ng/ml (data not show). Since HGF did not affect ECM-associated adhesion of myoblasts, the differences in magnitude of the migration in the presence of these proteins was unlikely related to variable degrees of cell adhesion upon the transwell filters.

HGF induces actin-related cytoesqueletal rearrangement in human myogenic precursors.

Polimerization of F-actin and the formation of stress fibres are crucial for cell migration. To determine the role of HGF in promoting polymerization of F-actin, the relative content of this actin form was assessed by staining using alexa-488 coupled phalloidin for F-actin (reviewed by Papakonstanti and Stournaras, 2008). Myoblasts cultured onto laminin-111 and fibronectin-coated surfaces were exposed to HGF (10 ng/ml) for short period of time (15min). Reinforcing our previous results, we verified that treatment with HGF *per se* (10ng/ml) caused only a slight increase in stress fiber formation compared with the culture medium alone. In the presence of laminin or fibronectin this effect was increased, with denser F-actin stress fibers bundles being detected (Fig. 4), ensuring that HGF promotes structural cytoesqueletal changes that may be related to the enhancement of ECM-mediated cell migration

HGF enhances MMP secretion by human myogenic precursor cells: relationship with the ECM-driven migratory response

Since soluble HGF was able to regulate human myoblast polarization and ECM-driven migration, it seemed conceivable to hypothesize that HGF could induce the production of MMP-type enzymes by these cells. To test this hypothesis human myoblasts were incubated with HGF for 4 hours and the levels of MMP-2 and MMP-9 secreted in the culture medium were assayed by zymography. We found that treatment with HGF increased the activated MMP-2 levels, while having no-effect on MMP-9 secretion. That the enhanced band was actually MMP-2 was further demonstrated by its activation with the MMP activator, APMA, which generated a further band, with the molecular weight typical of MMP-2 (data not shown).

In order to ascertain whether HGF-dependent increase in MMP-2 secretion could interfere with the migration of myogenic cells, we tested the effect of the selective MMP9/2 inhibitor decapeptide. When myoblasts were led to migrate through laminin or fibronectin alone, no significant differences in the numbers of migrating cells were seen, in the absence or in the presence of the MMP2/9 inhibitor, applied at various doses. However, when HGF was added in the culture medium, the enhanced ECM-driven migration was significantly reduced ($p < 0.05$) in all concentrations of the inhibitor applied, when compared to those wells without inhibitor (Fig. 5).

Taken together, these data point to a multistep process where HGF may induce MMP release, promoting HGF activation that would enhance cell migrations by downstream effects.

Discussion

Myoblast migration into transplanted muscle is a key event to be improved so that to better exploiting myoblast transplant therapy as an alternative for the treatment for muscular dystrophies. In the present study we attempted to further define the role of exogenous HGF on myoblast migration.

It is well known that progenitor cell migration is an important step on early myogenesis, using diverse factors to guide these cells to early premuscle masses formation. During development, HGF and its receptor, the met tyrosine kinase, regulate muscle precursor cell migration (Bladt F *et al*, 1995; Maina *et al*, 1996). Muscle progenitors migrated toward these areas in response mainly to activation of c-met/HGF axis where HGF is released in the extracellular milieu, representing a chemotatic factor to induce the recruitment of c-met/Pax-3 progenitors (Sonnenberg *et al*, 1993). More recently, it was demonstrated that HGF is also involved with the migration of murine CD45⁺-derived bone marrow cells to the skeletal muscle (Rosu-Miles *et al*, 2005). In this work we applied human myoblasts obtained from postnatal muscle. This cell preparation has a greater proliferative capacity, as compared to adult myoblast populations (Mouly *et al*, 2005), and shows a high purity degree, further confirmed by CD56 immunostaining. Its myogenic potential to differentiate into muscle fibers has

already been defined *in vivo*; after injection into immunodeficient mice these cells can fuse to the recipient's muscle fibers (Silva-Barbosa *et al*, 2005, 2008). Accordingly, desmin expression was strongly detected in these cells after a short period of culture in differentiation medium, further showing their commitment to the muscle lineage and thus confirming the validity of this cell preparation as a model for studies regarding human myogenic precursor cell migration and differentiation. Importantly, as we defined herein, these cells constitutively express the HGF receptor, c-met.

We have previously demonstrated that the ECM protein laminin enhances myoblast migration *in vitro*, and that *in vivo* changes of laminin contents are associated with the engraftment of human myoblasts into the muscle from immunodeficient mice (Silva-Barbosa *et al*, 2008). Of note, we demonstrated herein that these human myogenic precursors express in their membranes high amounts of integrin-type receptors, not only for laminin (VLA-6 and VLA-7) but also for fibronectin (VLA-4 and VLA-5). Accordingly, our *in vitro* experiments show that both laminin and fibronectin elicit a significant haptotactic migration response upon these cells, thus indicating that the oriented movement of human myoblasts may follow a complex responsiveness pattern to distinct simultaneous and/or sequential stimuli. In this respect, it would be predictable that growth factors and matrix metalloproteases would also be involved in such migration.

We first tested the ability of HGF *per se*, in promoting migration of human myogenic precursors. Although this growth factor was reported to play a role in the recruitment of embryonic precursors from somites to sites of early muscle

tissue morphogenesis (Sonnenberg *et al*, 1993), we could not see any significant migratory response of human myoblasts to HGF alone, despite the obvious c-met expression by these cells.

Nevertheless, when HFG was applied as a co-factor in the induction of migration mediated by ECM proteins (laminin-111 and fibronectin) there was a clearcut statistically significant pontentialization of the ECM-driven migration. It was thus plausible to think of a cross-talk between c-met and β 1-integrins. It has been shown that the response of human skin fibroblasts to epidermal growth factor (EGF) and the response of human endothelial cells to VEGF (vascular endothelial growth factor) are potentiated by integrin binding to specific extracellular matrix molecules (Miyamoto *et al*, 1996; Soldi *et al*, 1999). Furthermore, HGF can enhance human endothelial cell migration by a mechanism involving association between c-met and integrins with the Ras-activation pathway (Rahman *et al*, 2005).

Interestingly however, the HGF effect reported herein was restricted to the migratory response of human myoblasts, since the adhesion degree of these cells to laminin or fibronectin was not altered by the presence of this growth factor. This rather argues against a cross-talk between c-met and β 1-integrins in this particular condition, and indicates that other mechanism(s) might be involved. In this respect we searched for a putative modulation of matrix metaloproteases by HGF, and the consequences upon ECM-mediated biological responses. Actually, previous studies showed that other growth factors are able to induce migration of engrafted myoblasts, by modulating MMP expression: *in*

vitro, the presence of IGF-1 or bFGF significantly enhanced the expression of the matrix gelatinase MMP-9, but not MMP-2 (Lafreniere *et al*, 2004). Herein, we showed that human myoblasts cultured with different doses of HGF increase MMP-2 gelatinolytic activity, leading to the hypothesis that this effect might be directly related to improvement of *in vitro* ECM-driven migration. It should be noted that, in the absence of HGF, MMP-2 blockade with a specific MMP-2/9 inhibitor did not result in any significant changes on cell migration driven by laminin or fibronectin. However, when we tested this compound in a system with HGF plus extracellular matrix, we noticed a partial but significant decrease in the numbers of migrating cells.

The actual mechanisms through which MMPs modulate myoblast migration remain to be defined. Substrate proteolysis with consequent exposure of cryptic adhesion sites might be involved. Nevertheless, it does not appear to be the case, since in our model the use of MMP inhibitor had no significantly effect on migration driven by laminin or fibronectin alone. For this same reason, a putative involvement of MMPs in β 1-integrin ECM receptor modulation can be discarded. In a second vein, it has been shown that a variety of proteolytic enzymes, as trombin and matriptases, have been incriminated to be able to convert HGF into its biological activate form (Shimomura *et al*, 1993; Schuppan *et al*, 1998; Lee *et al*, 2000). A similar mechanism may exist in human myoblasts: HGF/c-met ligand/receptor engagement may increase MMP-2 secretion, which in turn will further favor migration through ECM lattices.

In conclusion, by using human myogenic precursors we demonstrate for the first time that, although HGF alone may not improve human myoblast migration, it does exhibit a co-migratory role when associated to extracellular matrix proteins, and such a role is likely related to MMP-2 secretion by these cells. Taken together, these data provide new clues for understanding the complexity of the control mechanisms involved in the appropriate migration of human myogenic cell precursors, simultaneously comprising soluble and insoluble moieties. This notion should be taken into account for better designing future therapeutic strategies for ameliorating the spreading of these cells following transplantation

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fiocruz, CNPq (Brazil); the Capes/Cofecub and Fiocruz/Inserm Brazilian/French conjoint programs, and the Association Française contre les Myopathies (France).

REFERENCES

- Allen DL, Teitelbaum DH, Kurachi K. Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion *in vitro*. Am J Physiol Cell Physiol. 2003;284(4):C805-15.
- Anastasi G, Cutroneo G, Rizzo G, Favaloro A. Sarcoglycan subcomplex in normal and pathological human muscle fibers. Eur J Histochem. 2007;51 Suppl 1:29-33.

Barbero A, Benelli R, Minghelli S, Tosetti F, Dorcaratto A, Ponzetto C, Wernig A, Cullen MJ, Albini A, Noonan DM. Growth factor supplemented matrigel improves ectopic skeletal muscle formation--a cell therapy approach. *J Cell Physiol.* 2001;186(2):183-92.

Bertolotto A, Palmucci L, Doriguzzi C, Mongini T, Gagnor E, Del Rosso M *et al.* Laminin and fibronectin distribution in normal and pathological human muscle. *J Neurol Sci.* 1983;60(3):377-382.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-Met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; 376: 768-771.

Catlow KR, Deakin JA, Wei Z, Delehedde M, Fernig DG, Gherardi E, Gallagher JT, Pavão MS, Lyon M. Interactions of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor with Various Glycosaminoglycans Reveal an Important Interplay between the Presence of Iduronate and Sulfate Density. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5235-5248.

Corti S, Salani S, Del Bo R, Sironi M, Strazzer S, D'Angelo MG, Comi GP, Bresolin N, Scarlato G. Chemotactic factors enhance myogenic cell migration across an endothelial monolayer. *Exp Cell Res.* 2001;268(1):36-44.

Desiderio MA, Pogliaghi G, Dansi P. Hepatocyte growth factor-induced expression of ornithine decarboxylase, c-met, and c-myc is differently affected by protein kinase inhibitors in human hepatoma cells HepG2. *Exp Cell Res.* 1998;242(2):401-9.

Di Donna S, Mamchaoui K, Cooper RN *et al.* Telomerase can extend the proliferative capacity of human myoblasts, but does not lead to their immortalization. 2003. Mol Cancer Res 2003; 1:643.

Edom F, Mouly V, Barbet JP, Fiszman MY, Butler-Browne GS. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. Dev Biol. 1994;164(1):219-29.

Fougerousse F, Bartoli M, Poupiot J, Arandel L, Durand M, Guerchet N *et al.* Phenotypic Correction of alpha-Sarcoglycan Deficiency by Intra-arterial Injection of a Muscle-specific Serotype 1 rAAV Vector. Mol Ther. 2007;15(1):53-61

Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, Straino S, Giacinti C, Turrini P *et al.* Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. 2003;163(4):1417-28.

Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Centracchio JN, Dworkin LD. Hepatocyte growth factor modulates matrix metalloproteinases and plasminogen activator/plasmin proteolytic pathways in progressive renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2003;14(12):3047-60.

Goyenvallé A, Vulin A, Fougerousse F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L *et al.* Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. Science. 2004;306(5702):1796-9.

Jacquemin V, Furling D, Bigot A, Butler-Browne GS, Mouly V. IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment. Exp Cell Res. 2004;299(1):148-158.

Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdière-Sahuqué M *et al*. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol.* 1999;205(1):158-170

[Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina OP, Heikkilä P, Kantor C, Gahmberg CG, Salo T, Kontinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E, Pasqualini R.](#) Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol.* 1999 17(8):768-774.

Ikemoto M, Fukada S, Uezumi A, Masuda S, Miyoshi H, Yamamoto H *et al*. Autologous transplantation of SM/C-2.6(+) satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice. *Mol Ther.* 2007;15(12):2178-85.

Lafreniere JF, Mills P, Tremblay JP, El Fahime E. Growth factors improve the *in vivo* migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation.* 2004;77(11):1741-7.

Laprise P, Poirier EM, Vézina A, Rivard N, Vachon PH. Merosin-integrin promotion of skeletal myofiber cell survival: Differentiation state-distinct involvement of p60Fyn tyrosine kinase and p38alpha stress-activated MAP kinase. *J Cell Physiol.* 2002;191(1):69-81.

Lee SL, Dickson RB, Lin CY. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem.* 2000 275(47):36720-5

Lee HS, Huang AM, Huang GT, Yang PM, Chen PJ, Sheu JC, Lai MY, Lee SC, Chou CK, Chen DS. Hepatocyte growth factor stimulates the growth and activates mitogen-activated protein kinase in human hepatoma cells. J Biomed Sci. 1998;5(3):180-4.

Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Front Biosci. 2006;11:1696-1701.

Matsuoka H, Sisson TH, Nishiuma T, Simon RH. Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006;35(6):705-713.

Mielenz D, Hapke S, Pöschl E, von Der Mark H, von Der Mark K. The integrin alpha 7 cytoplasmic domain regulates cell migration, lamellipodia formation, and p130CAS/Crk coupling. J Biol Chem. 2001;276(16):13417-13426.

Mittelbronn M, Hanisch F, Gleichmann M, Stötter M, Korinthenberg R, Wehnert M, *et al.* Myofiber degeneration in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (AD-EDMD) (LGMD1B). Brain Pathol. 2006;16(4):266-272.

[Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM.](#) Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. J Cell Biol. 1996 135(6 Pt 1):1633-1642.

Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A *et al.* Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. Science. 2005;309(5743):2064-2067.

Mouly V, Aamiri A, Périé S, Mamchaoui K, Barani A, Bigot A *et al*. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol.* 2005;24(2):128-133.

Nagase H, Suzuki K, Morodomi T, Enghild JJ, Salvesen G. Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. *Matrix Biol. Suppl.* 1992;1:237-244.

Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* 1989;342(6248):444-443.

Papakonstanti EA, Stournaras C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2008. doi:10.1016/j.febslet.2008.02.064

Pegoraro E, Marks H, Garcia CA, Crawford T, Mancias P, Connolly AM *et al*. Laminin alpha2 muscular dystrophy: genotype/phenotype studies of 22 patients. *Neurology.* 1998;51(1):101-110.

[Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M, Wijelath ES.](#) Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 2005 17;6(1):8

[Rosu-Myles M, Stewart E, Trowbridge J, Ito CY, Zandstra P, Bhatia M.](#) A unique population of bone marrow cells migrates to skeletal muscle via hepatocyte growth factor/c-met axis. [J. Cell Sci.](#) 2005;118(Pt 19):4343-4352.

Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, Ackermann R, Ruehl M, Nakamura T *et al*. Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor. *Gastroenterology*. 1998;114(1):139-152.

Sheehan SM, Tatsumi R, Temm-Grove CJ, Allen RE. HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve*. 2000;23(2):239-245.

Shimomura T, Kondo J, Ochiai M, Naka D, Miyazawa K, Morimoto Y *et al*. Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J Biol Chem*. 1993;268(30):22927-22932.

Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, Di Santo JP, Mouly V. Comparative analysis of genetically engineered immunodeficient mouse strains as recipients for human myoblast transplantation. *Cell Transplant* 2005;14: 457-486.

Silva-Barbosa SD, Butler-Bowne GS, Mello W, Riederer I, Di-Santo JP, Savino W *et al*. Human myoblast engraftment is improved in laminin enriched microenvironment. *Transplantation* 2008;85(4):566-575

[Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F.](#) Role of $\alpha v \beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J*. 1999;18(4):882-892.

Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol*. 1993;123(1):223-235.

Torrente Y, El Fahime E, Caron NJ, Del Bo R, Belicchi M, Pisati F *et al*. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates chemotactic response in mouse myogenic cells. *Cell Transplant*. 2003;12(1):91-100.

Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Andó M, Bertotti A, Comoglio PM, Boccaccio C. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. *FASEB J*. 2000;14(11):1629-1640.

Urish K, Kanda Y, Huard J. Initial failure in myoblast transplantation therapy has led the way toward the isolation of muscle stem cells: potential for tissue regeneration. *Curr Top Dev Biol*. 2005;68:263-280.

Vainzof M, Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(5):543-555.

Wang H, Keiser JA. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 16;272(3):900-5.

Yusuf F, Rehim R, Moroşan-Puopolo G, Dai F, Zhang X, Brand-Saberi B. Inhibitors of CXCR4 affect the migration and fate of CXCR4+ progenitors in the developing limb of chick embryos. *Dev Dyn*. 2006;235(11):3007-3015.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Phenotypic features of the CHQ5 human myoblast preparation.

Culture purity was performed by cytofluorometric detection of CD56, a typical myoblast marker (Panel **A**). The myogenic potential of these cells was ascertained by desmin expression seen through immunoperoxidase labeling with anti-desmin monoclonal antibody, as shown in panel **B**. Insert in this panel represents isotype-matched IgG control with similar secondary antibody used for staining of desmin. Panel **C** depicts the immunodetection of c-met by western blotting of whole-cell extracts. As positive control for c-met detection, we used the hepatoma cell line HEP-G2. Data are representative of three independent experiments.

Figure 2: HGF treatment does not affect human myoblast adhesion to extracellular matrix.

The expression of integrin subunits responsible to the cell attachment to extracellular matrix was determined in human myoblasts either by flow cytometry or immunocytochemistry. Panel **A** depicts the flow cytometry profiles showing the surface expression of CD29 (β 1-integrin chain), CD49d, CD49e (α -chain integrin of fibronectin receptors VLA4 and VLA5 respectively), and CD49f (α -chain integrin of laminin receptor VLA6). VLA-57 expression is deduced by the immunostaining obtained with the anti-CD49g antibody, seen at the bottom of this panel. Panel **B** illustrates that these human myogenic precursors adhere onto laminin and fibronectin substrates. Nevertheless such an ECM-dependent adhesion was not enhanced in the presence of HGF.

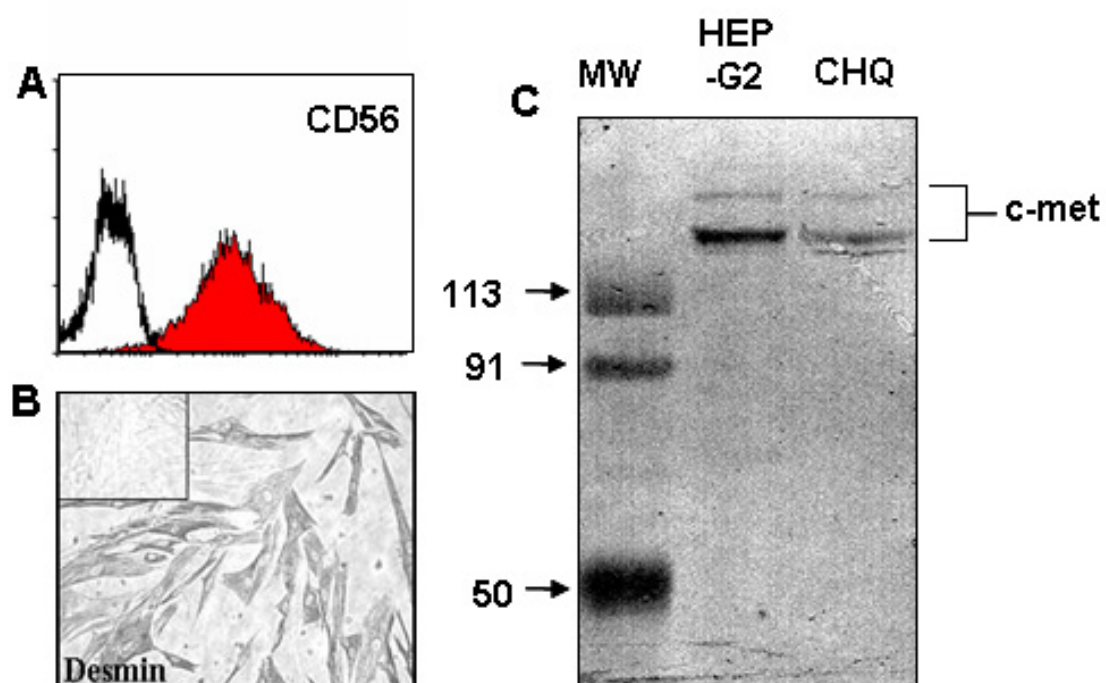
BSA: Bovine serum albumin; **LN:** Laminin; **FN:** Fibronectin. Bars represent the mean $\pm$ standard error. Results correspond to 6 independent experiments.

Figure 3: Effect of HGF treatment on migration of human myoblasts towards extracellular matrix proteins. One hundred thousand human myoblasts were allowed to migrate across transwell chambers, whose inserts were previously coated with 10 μ g/ml of laminin-111 or fibronectin and HGF (10-100ng/ml) was used as a chemoattractant factor. Both laminin (Panel **A**) and fibronectin (panel **B**) alone were able to induce specific cell migration when compared to BSA. The presence of HGF further enhanced the migration driven by laminin and fibronectin. Each bar represents the mean $\pm$ SE of three independent experiments. Statistical analysis was done with ANOVA and Newman-Keuls post test. **p<0.01.

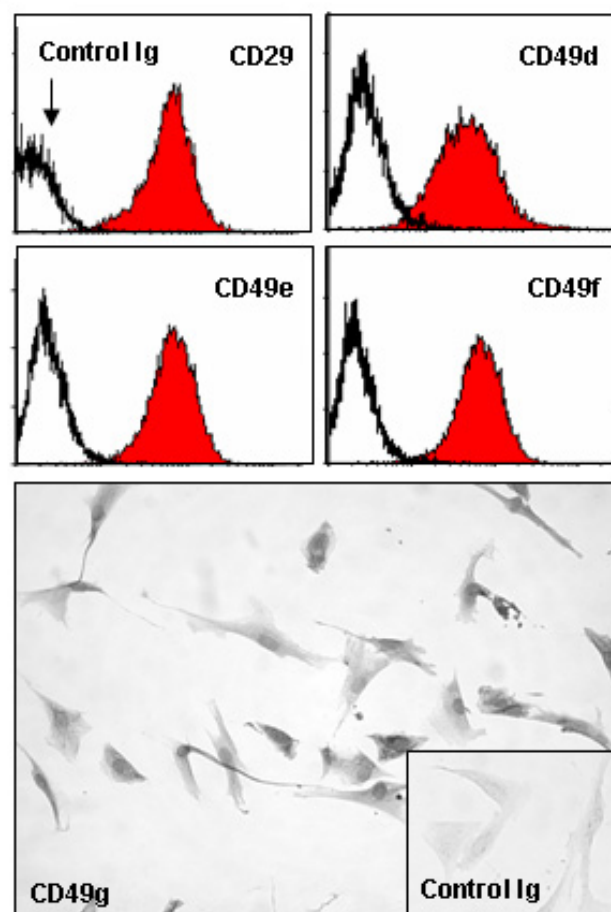
Figure 4: Effect of HGF on actin polymerization in myoblasts cultured onto ECM-coated slides. Cells were cultured in the absence (panels **A** and **B**) or in the presence of Laminin-111(**C**, **D**) or fibronectin (**E**, **F**). Thirty minutes after adhesion HGF (10ng/mL) was added during 15 minutes (panels **B**, **D**, **F**) and compared with cultured maintained in medium F-10 alone (panels **A**, **C**, **E**). Actin polymerization was visualized by phalloidin alexa488 staining and analysed by confocal microscopy. ECM proteins alone yielded actin polymerization, and this was further enhanced in the presence of HGF. Images representative of 3 independent experiments. Scale bars represent 20 μ m.

Figure 5: Matrix metalloprotease production by human myoblasts: modulation of HGF-enhanced ECM-driven migration by MMP inhibition. In the panel **A** the matrix metalloprotease (MMP) activity was evaluated by gelatin zymography. Doses of HGF, 1 to 100ng/mL, were administrated to myoblast cultures and supernatants harvested 4h thereafter, being then submitted to electrophoresis in gels co-polymerized with gelatin. Pro-MMP-2 (72KDa) induced gelatin degradation was visualized as clear bands. Ratio between treated and non-treated cultures was determined by band densitometry using ImageJ software and is shown as the ratio calculated from the untreated culture. In the graphics shown in panel **B** we can see that, in the absence HGF, the MMP2/9 inhibitor does not change the migration degree of the myoblasts towards laminin or fibronectin. However, the MMP-2/MMP9 inhibitor did block the HGF-induced increment of migration driven by both laminin and fibronectin. Bars represent means $\pm$ SE from 3 independent experiments. Statistical analysis was done with ANOVA and Newman-Keuls post test. *** $p < 0.001$.

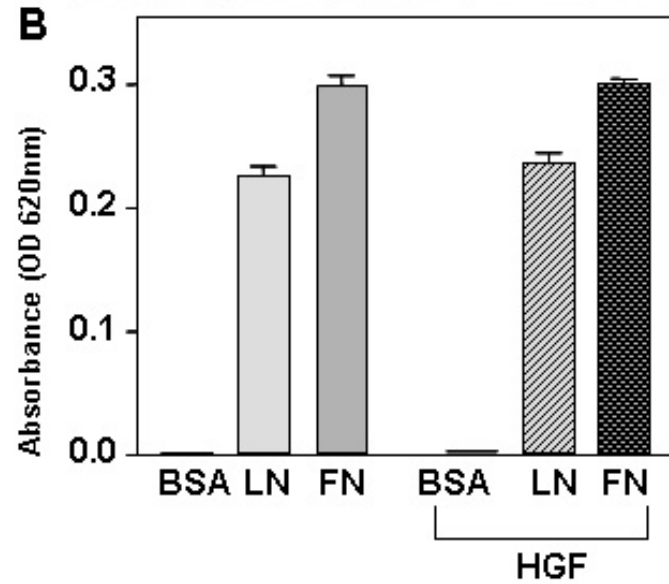
De Mello et al, figure 1



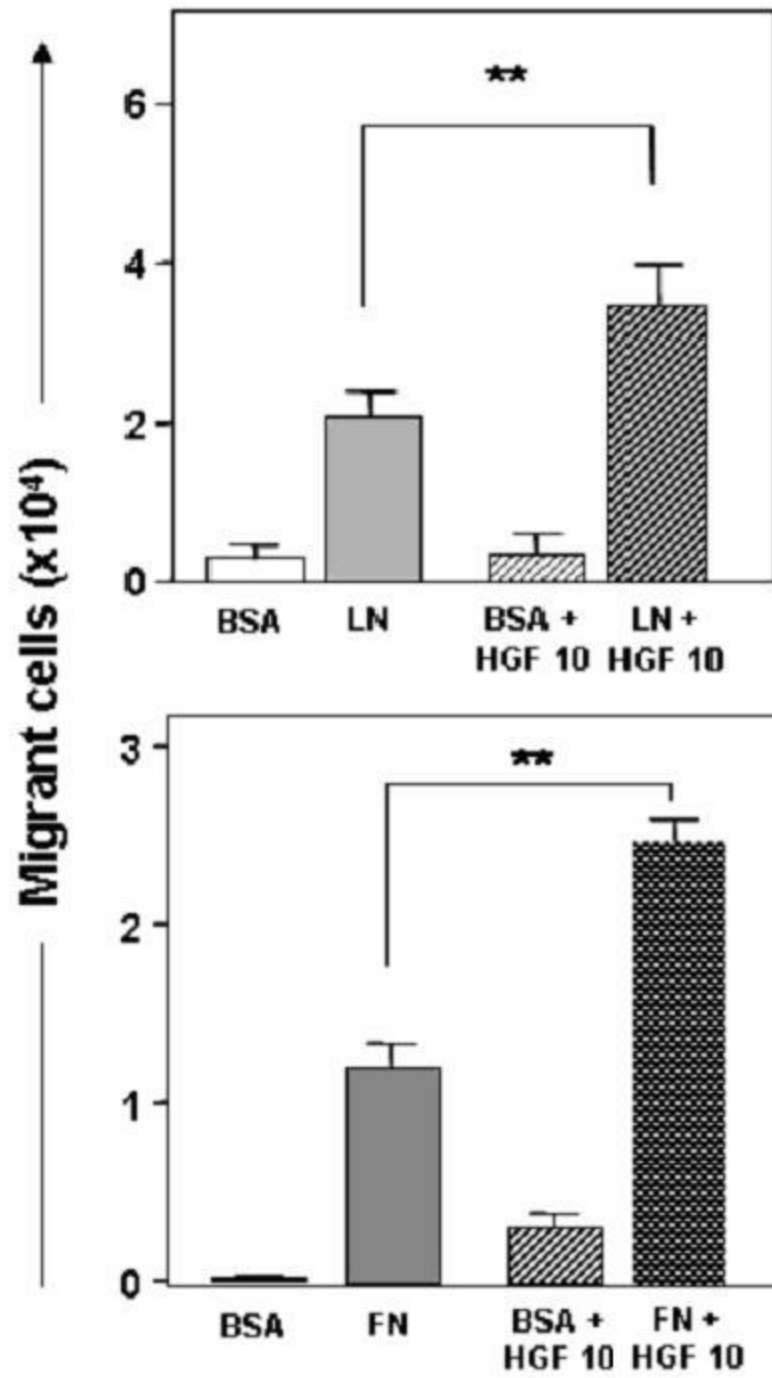
A



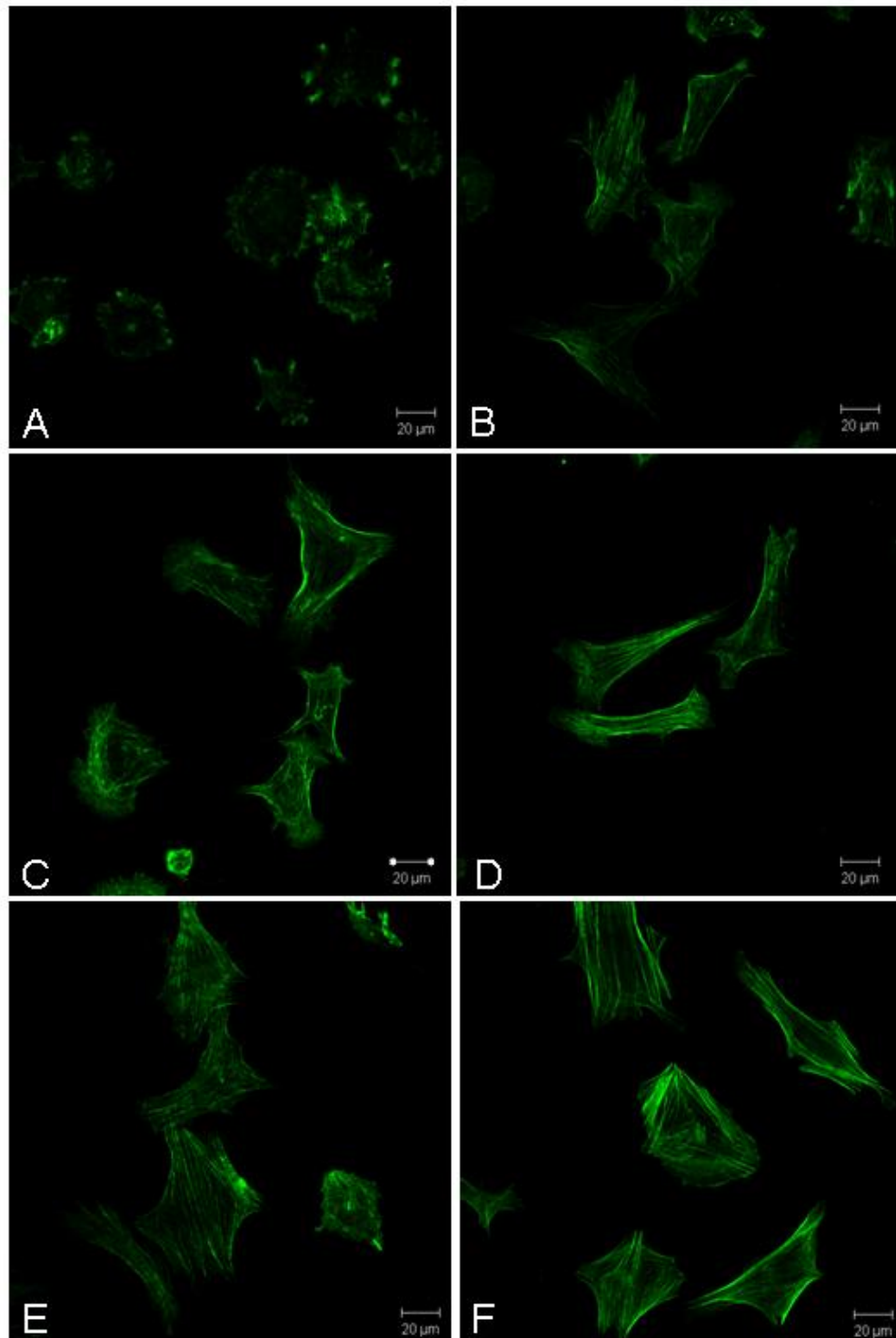
B



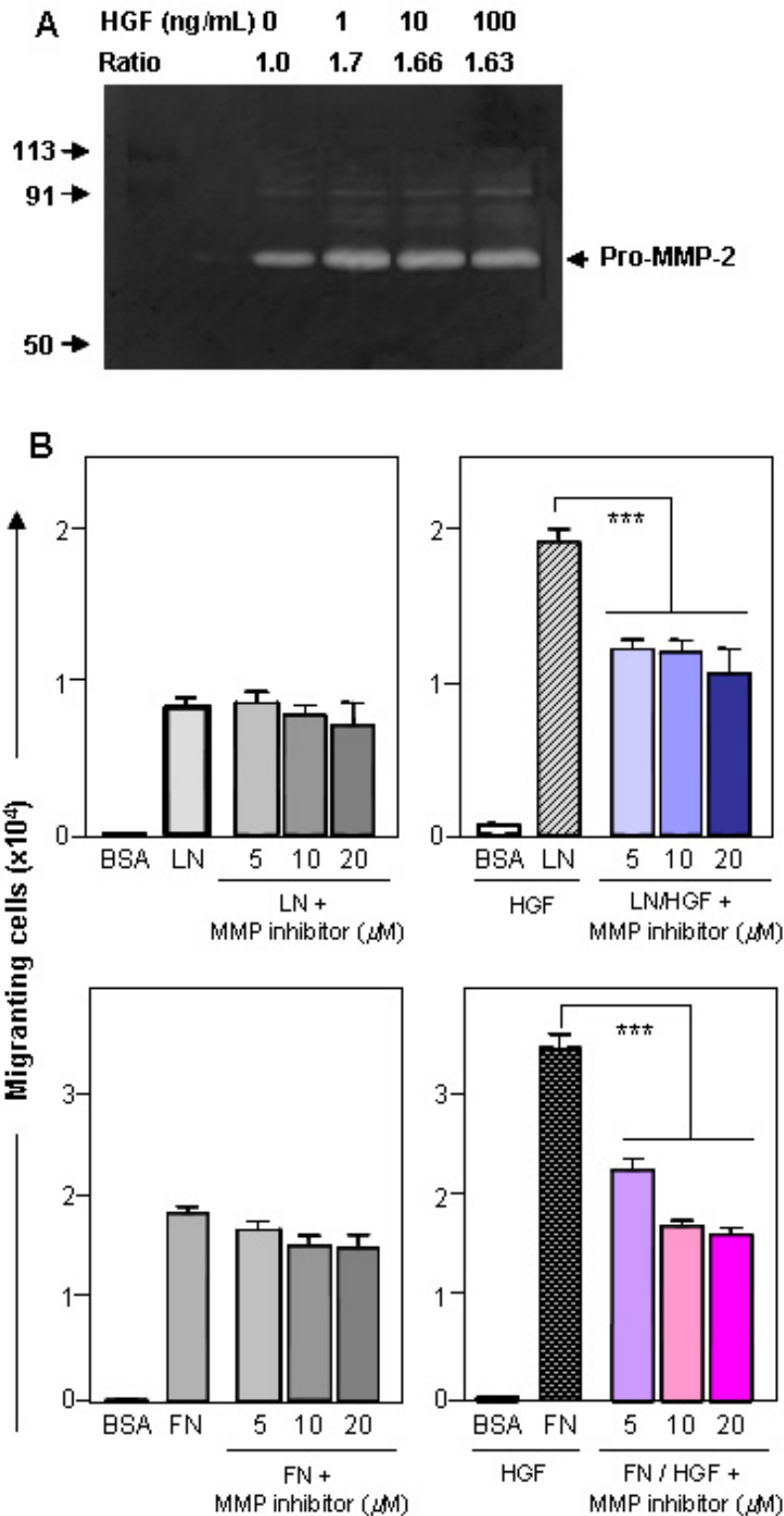
De Mello et al Figure 3



De Mello et al, figure 4



De Mello et al, figure 5



4 - DISCUSSÃO

O músculo esquelético de vertebrados adultos é composto majoritariamente por fibras musculares diferenciadas, e por uma população minoritária de células progenitoras, ainda indiferenciadas, denominadas células satélites. Num músculo adulto e na ausência de estimulação, as células satélites permanecem em estado de repouso. Entretanto, após um trauma muscular, tais células são ativadas, proliferam e passam a se fundir, entre si ou com fibras maduras pré-existentes (Kuang *et al*, 2008).

O fato de tais células “guardarem” a capacidade de serem incorporadas, através de sua fusão ao músculo esquelético em estado de regeneração, tem sido explorado no campo da terapia celular. Vários grupos vêm-se empenhando no transplante de mioblastos normais em músculos deficientes em distrofina, a fim de criar um reservatório normal de mioblastos produtores de distrofina, capazes de fundirem com fibras distróficas. Tal estratégia tem sido utilizada tanto em modelos experimentais, quanto em pacientes com DMD (Partridge *et al*, 1989; Skuk *et al*, 2006).

Embora esses estudos venham demonstrando que o transplante de mioblastos possa ser utilizado como estratégia para o restabelecimento de funções musculares, o que vemos é que, em pacientes distróficos, ou mesmo em modelos experimentais, tal restauração é apenas transitória (Karpati *et al*, 1989; Partridge *et al*, 1989; Gussoni *et al*, 1997).

A limitação do transplante de mioblastos como terapia corretiva está relacionada à rápida morte inicial das células transplantadas, e à baixa dispersão das células injetadas no hospedeiro - o que limita o processo de regeneração à área de inoculação das células saudáveis transplantadas (Skuk, 1998).

Em vista desses dados durante a presente tese nos propusemos a avaliar o papel de moléculas, sabidamente envolvidas em etapas da miogênese, nos processos de migração/morte de precursores de fibra muscular esquelética.

Numa primeira etapa avaliamos o papel da molécula de laminina em modelo já estabelecido de transplante xenogênico.

A análise de um componente da matriz extracelular tem por base o fato de que tais moléculas não só dão o suporte estrutural para a adesão e manutenção da integridade tecidual, mas também porque são utilizadas como reservatórios para vários tipos de mediadores biológicos, incluindo enzimas de degradação, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e de diferenciação celular, como citocinas e quimiocinas (Takeuchi *et al*, 1994; Hutchings *et al*, 2003; Parmo-Cabañas *et al*, 2006).

Dados da literatura sugerem que determinados fatores de crescimento, no momento de sua associação à ECM, podem agir como indutores da migração celular, enquanto outros agem como sinal de parada de migração (Franitza *et al*, 2000). Este tipo de resposta, em particular, implica na expressão ou ativação de vários receptores de ECM, os quais na sua maioria pertencem à família das integrinas. Um dos eventos deflagrados após a ligação de uma dada molécula de ECM a seu receptor correspondente, é uma modificação da organização espacial do citoesqueleto, sugerindo que a migração sobre um substrato de ECM implica em uma função coordenada de integrinas e elementos do citoesqueleto. De fato a análise de tais componentes nos parece importante principalmente no que se refere à migração e diferenciação das células que estão sendo transplantadas (Langen *et al* 2001; Horsley *et al*, 2003).

Células do músculo esquelético expressam vários dos receptores do tipo integrina para ECM, dentre eles $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 7\beta 1$ (receptores de fibronectina e de laminina), ambos implicados na miogênese (Cachaço *et al*, 2005). Nossos dados mostram que os precursores miogênicos utilizados em nosso trabalho expressam as cadeias CD49d, CD49e, CD49f, CD49g e CD29 (cadeias $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ e $\beta 1$, respectivamente) o que facilitaria a adesão de tais células a

substratos contendo proteínas de matriz extracelular, como também demonstrado(Fig-2 artigo 2). A expressão das cadeias $\alpha 6$ e $\alpha 7$ já foi descrita anteriormente em mioblastos murinos MM14 e C2C12, porém no tocante à expressão da subunidade $\alpha 6$, a densidade dessa cadeia foi relativamente menor do que nos mioblastos humanos utilizados nesse trabalho (Yao *et al*, 1996).

Dados anteriores do nosso grupo já vinham mostrando a eficácia da utilização desses mesmos precursores na regeneração de tecido muscular em camundongos receptores imunodeficientes (Silva-Barbosa *et al*, 2005). Nesse trabalho analisamos comparativamente a eficiência do transplante de mioblastos humanos em diferentes modelos imunodeficientes. Utilizando transplante xenogênico em que os mioblastos eram transferidos diretamente no músculo criolesado vimos que, camundongos Rag2⁻/γC⁻/C5⁻ apresentavam-se como uma nova e melhor alternativa para transplantes envolvendo células humanas. Nestes animais os mioblastos, depois de transplantados, eram capazes de se fundir com fibras murinas, formando fibras híbridas, que se diferenciavam em fibra humana madura. Entretanto, mesmo utilizando esses animais, muitas das células injetadas permaneciam no sítio de injeção (Silva-Barbosa *et al*, 2005).

Dando continuidade a esse trabalho, ainda dentro do mesmo objetivo, fomos avaliar a eficiência do transplante de mioblastos humanos no músculo previamente irradiado de camundongos Rag2⁻/γC⁻/C5⁻. Trabalhos anteriores mostravam que a irradiação prévia do tecido muscular receptor levava à morte de fibras maduras e a ativação de progenitores endógenos neste tecido, favorecendo assim o estabelecimento das células transferidas. De acordo com nossos dados, os músculos receptores, depois de irradiados e submetidos ao processo de criolesão apresentavam aumento de deposição de laminina(Fig 3E, artigo 1). Vimos que nesses animais a eficácia do transplante era muito maior com uma maior dispersão de células transplantadas quando comparada aos grupos controles(Fig 4 artigo 1). Além disso, detectamos acúmulo de mioblastos humanos em sítios de maior deposição da molécula de laminina, sugerindo fortemente que a interação entre essa molécula e os precursores poderia

favorecer não só o recrutamento, mas também os sinais de sobrevivência e proliferação (Fig 3G, artigo 1).

De fato, através de ensaios em câmaras de migração vimos que tais células eram capazes de migrar sobre substratos contendo tanto a isoforma de laminina-111 como a laminina-211 (anteriormente denominadas laminina-1 e laminina-2, respectivamente – Fig 6B artigo 1). Além do efeito sobre a migração celular, vimos que a sobrevivência e a proliferação de mioblastos humanos eram aumentadas quando essas células eram cultivadas sobre um substrato de laminina (fig 5 Artigo 1). Tais dados foram corroborados com a demonstração *in vivo* de que parte dos mioblastos transplantados permaneciam em ciclo mesmo após 4 semanas de transplante (Fig 2F artigo 1).

Tendo em vista que além das moléculas envolvidas com a formação da rede de matriz extracelular, outros fatores podem atuar modulando o processo de migração celular pós-transplante, numa etapa posterior passamos então a avaliação do papel da molécula HGF na migração de mioblastos humanos.

Diversos fatores vêm sendo apontados como indutores ou estimuladores da migração *in vitro* e *in vivo* de mioblastos, incluindo a citocina IL-4, e os fatores de crescimento IGF-I, FGF e HGF (Hawke & Garry, 2001; Lafreniere, 2004, 2006). Dentre eles, o HGF é aquele capaz de atuar sobre células satélites quiescentes, ativando ciclo celular (Volonte, 2005).

Este fator é secretado na forma de um precursor polipeptídico biologicamente inativo, de peso molecular de 92 kDa (pro-HGF), capaz de se associar à rede de matriz extracelular através de sua ligação a glicosaminoglicanas do tipo heparina (Comoglio *et al*, 2001). A proteólise extracelular deste precursor vai gerar um heterodímero bioativo, constituído de uma cadeia α de 60 kDa e uma cadeia β de 32 kDa (Miller *et al*, 2000). A sinalização intracelular decorre da ligação deste fator ao seu receptor transmembranar do tipo tirosina-quinase, c-met, codificado pelo proto-oncogene MET (Birchmeier & Gherardi, 1998).

No que diz respeito ao efeito de HGF sobre o processo migratório, alguns resultados mostram uma correlação entre o HGF e o crescimento invasivo de células tumorais. Neste caso em particular, o aumento da capacidade invasiva é acompanhado por um aumento da avidéz de integrinas por seus ligantes de ECM (Trusolino *et al*, 2000).

Por outro lado, no que se refere especificamente ao efeito de HGF sobre células miogênicas, há muito vem sendo descrito o efeito dessa molécula sobre o recrutamento de precursores musculares ao longo da miogênese, e, embora tenham sido detectadas secreção de HGF e expressão de seu receptor por células satélites quiescentes cultivadas *in vitro* (Tatsumi, 1998), pouco se sabe sobre o efeito dessa molécula na migração de precursores endógenos no músculo pós-natal. Foi visto, por exemplo, que o HGF pode modular a migração de mioblastos através de uma barreira endotelial, e que sua associação a matrigel (gel contendo proteínas de matriz extracelular) é capaz de aumentar a miogenicidade, em um sistema de transplante ectópico de tecido muscular esquelético (Barbero *et al*, 2001). Mesmo que neste estudo a sobrevivência do transplante não esteja correlacionada a adesividade à ECM, dados vem sugerindo que a interação entre células e moléculas do microambiente extracelular, incluindo matriz extracelular, quimiocinas e fatores de crescimento, gera uma mensagem de sobrevivência, protegendo tais células da morte por apoptose (Stupack *et al*, 2005).

Embora nossos dados tenham mostrado que o tratamento com HGF não resulta em aumento da adesão de mioblastos sobre laminina e fibronectina(Fig 2B, artigo 2, vimos que, após um curto período de exposição, são detectadas diferenças na organização estrutural de filamentos de actina, proteína importante na migração celular(Fig 4 artigo 2).

Por outro lado os ensaios de migração *in vitro* mostraram que o HGF *per se* não é capaz de agir como fator quimiotático sobre a migração de mioblastos, embora aumente a quimiotaxise dessas células durante a migração induzida por proteínas de matriz extracelular(Fig 3, artigo 2). De fato alguns trabalhos vêm

discutindo o efeito do HGF como quimioatratante na migração de diferentes tipos celulares (Adams *et al*, 1994; Rahman *et al*, 2005; Son *et al*, 2006). Além disso, dados mais recentes vêm mostrando que algumas proteínas de matriz extracelular poderiam potencializar o efeito de dispersão celular induzido por HGF (Clark *et al*, 2004; Rahman *et al*, 2005, de Rooij *et al*, 2005). Uma alternativa não discutida no presente trabalho seria o de avaliar o efeito de HGF sobre a ativação de integrinas, proteínas também expressas por mioblastos, e que poderiam servir de mediadores de sinais derivados do contato entre essas células e a matriz extracelular (revisto por Berrier & Yamada, 2007).

Embora não tenhamos detectado diferenças no processo de adesão dessas células -- etapa que também pode ser mediada por integrinas --, o efeito de HGF sobre a migração pode estar relacionado à maneira como o próprio HGF é apresentado à célula, e ainda à avaliação de seu efeito. Como demonstrado em nossos experimentos, de acordo com a molécula de matriz extracelular aplicada, o resultante de migração de precursores miogênicos pode ser diferente. Os níveis de migração dirigida laminina-111 foram mais altos; entretanto, a razão obtida entre a migração utilizando ou não HGF como fator quimiotático, foi um pouco maior sobre fibronectina (Fig 3, artigo 2). Nesse sentido alguns trabalhos vêm descrevendo aumento do efeito de citocinas e de fatores de crescimento quando aderidos a proteínas de ECM (Takeuchi *et al*, 1994; Hutchings *et al*, 2003). Nesses trabalhos é discutido o aumento da biodisponibilidade desses fatores quando ligados a um substrato de ECM. Poderíamos sugerir então, que, de acordo com o substrato de ECM utilizado, a exposição de sítios ativos do HGF seria diferencial.

Por outro lado, alguns estudos vêm demonstrando a ligação física entre c-met e outros receptores de membrana, muitos dos quais envolvidos com os processos de adesão e migração celular (Trussolino *et al*, 2001; Orian-Rousseau *et al*, 2002; Chung *et al*, 2004). Em alguns desses trabalhos vem sendo discutido o aumento da ativação de c-met através do aumento da concentração de HGF na superfície celular, ou ainda, através da formação de complexos entre

proteínas adesivas e esse ligante, de maneira a também aumentar a ativação de seu receptor.

Outros dados na literatura apontam para o envolvimento de fatores de crescimento na liberação de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), embora pouco se saiba sobre a influência do HGF sobre tais enzimas(Allen *et al*, 2003).

As MMPs são enzimas intimamente envolvidas com os processos de migração celular, modificando componentes de matriz extracelular, clivando quimiocinas e liberando fatores associados à ECM (Clark *et al*, 2007). Em modelo murino de transplante de mioblastos, foi detectado o envolvimento de MMP-2 na migração de células C2C12 (El Fahime *et al*, 2000). Nossos resultados mostram que, embora MMPs sejam constitutivamente expressas, o tratamento de cultivos de mioblastos humanos com HGF, por um período semelhante ao da migração *in vitro*, é capaz de induzir um aumento da secreção de MMP-2 na forma inativa, mas não de MMP-9(Fig 5A artigo 2). Tomados em conjunto, estes dados sugerem uma possível correlação entre a secreção de MMPs e o aumento da migração dos mioblastos.

Para nos certificarmos da importância das MMPs em nosso sistema, utilizamos um bloqueador seletivo capaz de inibir a função de MMP-2 e MMP-9. A partir do uso desse inibidor observamos um bloqueio parcial, mas significativo, na migração de mioblastos mediada por ECM + HGF(Fig 5B, artigo 2). Esse bloqueio é sugestivo de que a interação do par ligante/receptor entre HGF/c-met, sinalizaria para secreção de MMP-2, que por sua vez contribuiria no processo migratório induzido por um gradiente de HGF. Neste sentido seria importante a avaliação de vias comuns de sinalização intracelular ativadas durante esse processo (Wang & Keiser, 2000; Zhou & Wong, 2006).

Por outro lado, embora não tenhamos avaliado a produção de HGF endógeno pelos próprios progenitores miogênicos, dados da literatura sustentam à idéia de que essas enzimas poderiam estar envolvidas na conversão de pro-HGF em sua forma ativa. O HGF é sintetizado como polipeptídeo, numa forma

inativa, que se liga à ECM em condições de remodelamento tecidual (Schuppan *et al*, 1998). Sob a ação de enzimas proteolíticas como a uPA, trombina e matriptase, essa molécula se torna ativa (Shimomura *et al*, 1993; Lee *et al*, 2000). Em função desses dados levantamos a hipótese segundo a qual as MMPs também poderiam contribuir para a ativação de HGF em nosso modelo. Além disso, o fato de o inibidor aplicado não agir sobre a migração media por ECM, mas independente de HGF é um indício de que exista um balanço entre a produção de enzima ativa regulando o processo migratório. Ainda dentro deste contexto existe um estudo mostrando que camundongos deficientes na produção do inibidor tecidual do tipo 1 de metaloprotease de matriz (TIMP-1) apresentavam aumento na ativação de HGF, elevando os níveis de fosforilação de c-met em hepatócitos, possivelmente pela diminuição da inibição de alguns tipos de MMPs (Mohammed *et al*, 2005).

Por outro lado, o bloqueio apenas parcial da migração incrementada por HGF nos mioblastos humanos é indicativo de que outros fatores, além de MMP-2, estejam envolvidos nesse processo.

Os dados apresentados na presente tese abrem uma discussão sobre o papel de proteínas de matriz extracelular (em particular a laminina), do fator de crescimento de hepatócitos e de MMP-2, na migração de mioblastos humanos.

Nossos resultados mostram que a indução da ativação do músculo receptor leva a um aumento local da expressão de laminina, molécula adesiva que regularia os processos de migração, proliferação e morte de mioblastos injetados. Por outro lado demonstramos aqui que essas mesmas células uma vez estimuladas pelo HGF aumentam a secreção de MMP-2, o que provavelmente facilitaria sua migração sobre substratos de laminina e fibronectina. Em conjunto esses resultados apontam para o potencial terapêutico de tais moléculas nos protocolos envolvendo transplante de precursores miogênicos humanos, com vistas à correção de distrofias musculares.

Seguindo esses dados, uma alternativa a ser proposta seria a de co-injeção de HGF e mioblastos em músculos receptores ativados por criolesão.

Somados aos efeitos sobre a migração caracterizados nesse trabalho, os efeitos adicionais da molécula de HGF já descritos na literatura, tais como: estimulador da capacidade proliferativa de precursores miogênicos, inibidor da diferenciação e apoptose de tais precursores (Wang *et al*, 2002), além dos efeitos sobre angiogênese (Matsumoto & Nakamura, 2008), e como molécula imunossupressora (Kuroiwa *et al*, 2001; Yamaura *et al*, 2004; Okunishi *et al*, 2007), sustentam a hipótese que o HGF possa ser usado como alternativa adicional, melhorando a eficácia do transplante de mioblastos, não apenas pelo aumento do grau de dispersão de células transplantadas ao longo do músculo tratado, mas também na manutenção de precursores nesse tecido.

5 - Conclusões

Os dados obtidos nesse trabalho permitiram-nos entender melhor o papel de matriz extracelular ao longo processo de migração de mioblastos relacionando com fatores como HGF e metaloprotease, demonstrando que:

- A Modulação da expressão de laminina gerada pela irradiação mais criolesão gerou um ambiente propício para a migração, proliferação e sobrevivência de mioblastos transplantados.
- O HGF foi capaz de induzir a migração de mioblastos humanos na presença de laminina e fibronectina.
- A indução da secreção de MMP-2 por HGF em mioblastos humanos facilita o processo de migração in vitro possivelmente por um mecanismo de ativação de HGF.

6- Referências bibliográficas

Adams DH, Harvath L, Bottaro DP, Interrante R, Catalano G, Tanaka Y, Strain A, Hubscher SG & Shaw S. Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994), **91**, 7144-8.

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. 1995 Mar 17;270(11):5872-6

Allamand V, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet*. 2000 Oct;9(16):2459-67.

Allamand V, Guicheney P. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy, autosomal recessive (MDC1A, MIM#156225, LAMA2 gene coding for alpha2 chain of laminin). *Eur J Hum Genet*. 2002 Feb;10(2):91-4.

Allen RE, Boxhorn LK. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*. 1989 Feb;138(2):311-5.

Allen DL, Teitelbaum DH, Kurachi K. Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion *in vitro*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Apr;284(4):C805-15.

Anastasi S, Giordano S, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio P, Amati P. A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. *J Cell Biol*. 1997 Jun 2;137(5):1057-68.

Anastasi G, Cutroneo G, Rizzo G, Favaloro A. Sarcoglycan subcomplex in normal and pathological human muscle fibers. *Eur J Histochem*. 2007;51 Suppl 1:29-33.

Arikawa-Hirasawa E, Koga R, Tsukahara T, Nonaka I, Mitsudome A, Goto K *et al*. A severe muscular dystrophy patient with an internally deleted very short (110 kD) dystrophin: presence of the binding site for dystrophin-associated glycoprotein (DAG) may not be enough for physiological function of dystrophin. *Neuromuscul Disord*. 1995 Sep;5(5):429-38.

Arnold HH, Braun T. Genetics of muscle determination and development. *Curr Top Dev Biol.* 2000;48:129-64.

Authier FJ, Mhiri C, Chazaud B, Christov C, Cherin P, Barlovatz-Meimon G *et al.* Interleukin-1 expression in inflammatory myopathies: evidence of marked immunoreactivity in sarcoid granulomas and muscle fibres showing ischaemic and regenerative changes. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997 Apr;23(2):132-40.

Bandow K, Ohnishi T, Tamura M, Semba I, Daikuhara Y. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates migration of muscle precursors in developing mouse tongue. *J Cell Physiol.* 2004 Nov;201(2):236-43.

Barbero A, Benelli R, Minghelli S, Tosetti F, Dorcaratto A, Ponzetto C *et al.* Growth factor supplemented matrigel improves ectopic skeletal muscle formation--a cell therapy approach. *J Cell Physiol.* 2001 Feb;186(2):183-92.

Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol.* 1999 Mar 22;144(6):1113-22.

Belkin AM, Stepp MA. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech.* 2000 Nov 1;51(3):280-301.

Becciolini L, Meacci E, Donati C, Cencetti F, Rapizzi E, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Jan;1761(1):43-51

Bertoni C, Jarrahan S, Wheeler TM, Li Y, Olivares EC, Calos MP *et al.* Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 10;103(2):419-24.

Berrier AL & Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* (2007), **213**, 565-73.

Beviglia L, Kramer RH. HGF induces FAK activation and integrin-mediated adhesion in MTLn3 breast carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1999 Nov 26;83(5):640-9.

Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1994 Dec;8(4):323-7.

Birchmeier C and Gherardi E (1998). Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 8: 404-410.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(12):915-25.

Bischoff R. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn.* 1997 Apr;208(4):505-15.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature.* 1995 Aug 31;376(6543):768-71.

Bober E, Franz T, Arnold HH, Gruss P, Tremblay P. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development.* 1994 Mar;120(3):603-12.

Borycki AG, Emerson CP Jr. Multiple tissue interactions and signal transduction pathways control somite myogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2000;48:165-224.

Borycki AG, Strunk KE, Savary R, Emerson CP Jr. Distinct signal/response mechanisms regulate pax1 and QmyoD activation in sclerotomal and myotomal lineages of quail somites. *Dev Biol.* 1997 May 15;185(2):185-200.

Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem.* 2007 Dec 15;102(6):1358-67.

Brand-Saberi, B., Wilting, J., Ebensperger, C., Christ, B., 1996. The formation of somite compartments in the avian embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 411–420.

Brohmann H, Jagla K, Birchmeier C. The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development.* 2000 Jan;127(2):437-45.

Bujold M, Caron N, Camiran G, Mukherjee S, Allen PD *et al.* Autotransplantation in mdx mice of mdx myoblasts genetically corrected by an HSV-1 amplicon vector. *Cell Transplant.* 2002;11(8):759-67.

Burkin DJ and Kaufman SJ (1999). The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res* 296: 183-190.

Cachão AS, Pereira CS, Pardal RG, Bajanca F, Thorsteinsdóttir S. Integrin repertoire on myogenic cells changes during the course of primary myogenesis in the mouse. *Dev Dyn.* 2005 Apr;232(4):1069-78.

Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. : *Nat Med.* 2003 Dec;9(12):1520-7.

Carsana A, Frisso G, Tremolaterra MR, Lanzillo R, Vitale DF, Santoro L *et al.* Analysis of dystrophin gene deletions indicates that the hinge III region of the protein correlates with disease severity. *Ann Hum Genet.* 2005 May;69(Pt 3):253-9.

Chalepakis G, Goulding M, Read A, Strachan T, Gruss P. Molecular basis of *spot* and *Waardenburg* Pax-3 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Apr 6;91(9):3685-9.

Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS *et al.* Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Nov;289(5):C1179-87.

Chirmule N, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 1999 Sep;6(9):1574-83.

Clark IM, Swingle TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007.

Clark RA, Lin F, Greiling D, An J, Couchman JR. Fibroblast invasive migration into fibronectin/fibrin gels requires a previously uncharacterized dermatan sulfate-CD44 proteoglycan. *J Invest Dermatol.* 2004 Feb;122(2):266-77.

Clegg CH, Hauschka SD. Heterokaryon analysis of muscle differentiation: regulation of the postmitotic state. *J Cell Biol.* 1987 Aug;105(2):937-47.

Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C, Schwartz RJ. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1995 May 19;270(20):12109-16.

Comoglio PM and Boccaccio C (2001). Scatter factors and invasive growth. *Semin Cancer Biol* 11: 153-165.

Cooper RN, Irintchev A, Di Santo JP, Zweyer M, Morgan JE, Partridge TA *et al.* A new immunodeficient mouse model for human myoblast transplantation. *Hum Gene Ther.* 2001 May 1;12(7):823-31.

Corti S, Salani S, Del Bo R, Sironi M, Strazzer S, D'Angelo MG, Comi GP, Bresolin N, Scarlato G. Chemotactic factors enhance myogenic cell migration across an endothelial monolayer. *Exp Cell Res.* 2001;268(1):36-44.

Cossu G. Fusion of bone marrow-derived stem cells with striated muscle may not be sufficient to activate muscle genes. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(11):1540-3.

Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1988 Jan-Feb;14(1):53-70.

Dunckley MG, Love DR, Davies KE, Walsh FS, Morris GE, Dickson G. Retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse myoblasts in vitro. *FEBS Lett.* 1992 Jan 20;296(2):128-34.

El Fahime E, Torrente Y, Caron NJ, Bresolin MD, Tremblay JP. In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res.* 2000 1;258(2):279-87.

Endo T, Manya H. Defect in glycosylation that causes muscular dystrophy. *Methods Enzymol.* 2006;417:137-52.

England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE *et al.* Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature.* 1990 Jan 11;343(6254):180-2.

Epstein JA, Shapiro DN, Cheng J, Lam PY, Maas RL. Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):4213-8.

Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve.* 1996 Jul;19(7):853-60.

Fanin M, Danieli GA, Vitiello L, Senter L, Angelini C. Prevalence of dystrophin-positive fibers in 85 Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord.* 1992;2(1):41-5.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.

Ferreira LG, Marie SK, Liu EC, Resende MB, Carvalho MS, Scaff M, Reed UC. Dystrophin-glycoproteins associated in congenital muscular dystrophy: immunohistochemical analysis of 59 Brazilian cases. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005 Sep;63(3B):791-800.

Flotte TR. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):301-5.

Fougerousse F, Bartoli M, Poupiot J, Arandel L, Durand M, Guerchet N *et al.* Phenotypic Correction of alpha-Sarcoglycan Deficiency by Intra-arterial Injection of a Muscle-specific Serotype 1 rAAV Vector. *Mol Ther.* 2007 Jan;15(1):53-61.

Fournier M, Lewis MI. Influences of IGF-I gene disruption on the cellular profile of the diaphragm. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Apr;278(4):E707-15.

Franitza S, HersHKoviz R, Kam N, Lichtenstein N, Vaday GG, Alon R & Lider O. TNF-alpha associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells. *J Immunol* (2000), **165**, 2738-47.

Frock RL, Kudlow BA, Evans AM, Jameson SA, Hauschka SD, Kennedy BK. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev*. 2006 Feb 15;20(4):486-500.

Gavina M, Belicchi M, Rossi B, Ottoboni L, Colombo F, Meregalli M *et al*. VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2857-66.

Gawlik K, Miyagoe-Suzuki Y, Ekblom P, Takeda S, Durbeej M. Laminin alpha1 chain reduces muscular dystrophy in laminin alpha2 chain deficient mice. *Hum Mol Genet*. 2004 Aug 15;13(16):1775-84.

Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science*. 1997 Jul 11;277(5323):225-8.

Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Lett*. 2005 Jun 1;223(1):1-10.

Goffin F, Munaut C, Frankenne F, Perrier D'Hauterive S, Béliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A, Foidart JM. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. *Biol Reprod*. 2003 Sep;69(3):976-84.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996 Apr 1;183(4):1797-806.

Goulding, M., Lumsden, A., Paquette, A.J.,. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120, 957–971. 1994.

Goyenvallé A, Vulin A, Fougérousse F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L, Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*. 2004 Dec 3;306(5702):1796-9.

Gros J, Manceau M, Thomé V, Marcelle C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*. 2005 Jun 16;435(7044):954-8. Epub 2005 Apr 20.

Guérette B, Asselin I, Skuk D, Entman M, Tremblay JP. Control of inflammatory damage by anti-LFA-1: increase success of myoblast transplantation. *Cell Transplant*. 1997 Mar-Apr;6(2):101-7.

Gunning P, Ferguson V, Brennan K, Hardeman E. Impact of alpha-skeletal actin but not alpha-cardiac actin on myoblast morphology. *Cell Struct Funct*. 1997 Feb;22(1):173-9.

Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM, Sharma KR, Miller RG, Steinman L, Blau HM. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature*. 1992 Apr 2;356(6368):435-8.

Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med*. 1997 Sep;3(9):970-7.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999 Sep 23;401(6751):390-4.

Haines L, Neyt C, Gautier P, Keenan DG, Bryson-Richardson RJ, Hollway GE *et al*. Met and Hgf signaling controls hypaxial muscle and lateral line development in the zebrafish. *Development*. 2004 Oct;131(19):4857-69.

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. 1993 Aug 5;364(6437):501-6.

Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001 Aug;91(2):534-51.

Hayashibara T, Miyanishi T. Binding of the amino-terminal region of myosin alkali 1 light chain to actin and its effect on actin-myosin interaction. *Biochemistry*. 1994 Nov 1;33(43):12821-7.

Helbling-Leclerc A, Bonne G, Schwartz K. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet*. 2002 Mar;10(3):157-61.

Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(4):993-1005.

Hodgetts SI, Spencer MJ, Grounds MD. A role for natural killer cells in the rapid death of cultured donor myoblasts after transplantation. *Transplantation*. 2003a Mar 27;75(6):863-71.

Hodgetts SI, Grounds MD. Irradiation of dystrophic host tissue prior to myoblast transfer therapy enhances initial (but not long-term) survival of donor myoblasts. *J Cell Sci*. 2003b Oct 15;116(Pt 20):4131-46.

Hoffman EP, Brown KJ, Eccleston E. New molecular research technologies in the study of muscle disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2003 Nov;15(6):698-707.

Horsley V, Jansen KM, Mills ST and Pavlath GK (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113: 483-494.

Hutchings H, Ortega N, Plouët J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J*. 2003 Aug;17(11):1520-2

Ignat'eva ZP. Regeneration of defect in skeletal muscle in dogs by the method of transplantation of minced muscle tissue. *Arkh Anat Gistol Embriol*. 1961 Jun;40:31-40.

Kamochi H, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Ueda Y, Masuda C, Takada E, Watanabe K, Sakakibara M, Natuki Y, Kimura K, Beppu M, Aoki H, Suzuki N. Transplantation of myocyte precursors derived from embryonic stem cells transfected with IGFII gene in a mouse model of muscle injury. *Transplantation*. 2006 Aug 27;82(4):516-26.

Karelina TV, Bannikov GA, Eisen AZ. Basement membrane zone remodeling during appendageal development in human fetal skin. The absence of type VII collagen is associated with gelatinase-A (MMP2) activity. *J Invest Dermatol*. 2000 Feb;114(2):371-5.

Karpati G, Pouliot Y, Zubrzycka-Gaarn E, Carpenter S, Ray PN, Worton RG *et al*. Dystrophin is expressed in mdx skeletal muscle fibers after normal myoblast implantation. *Am J Pathol*. 1989 Jul;135(1):27-32.

Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D, Gledhill RB, Guttmann R, Holland P, Koch PA, Shoubridge E, Spence D, Vanasse M, *et al*. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 1993 Jul;34(1):8-17.

Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche Regulation of Muscle Satellite Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2008 Jan 10;2(1):22-31.

Kuroiwa T, Kakishita E, Hamano T, Kataoka Y, Seto Y, Iwata N, Kaneda Y, Matsumoto K, Nakamura T, Ueki T, Fujimoto J & Iwasaki T. Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *J Clin Invest* (2001), **107**, 1365-73.

LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 2002 Nov 15;111(4):589-601.

Lafreniere JF, Mills P, Bouchentouf M, Tremblay JP. Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. 2006 Apr 15;312(7):1127-41.

Lafreniere JF, Mills P, Tremblay JP, El Fahime E. Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation*. 2004 Jun 15;77(11):1741-7.

Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJM, Woulters EFM, Janssen-Heininger YMW (2001). Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- κ B. *FASEB J*, 15: 1169-1180.

Lapidos KA, Chen YE, Earley JU, Heydemann A, Huber JM, Chien M, Ma A, McNally EM. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest*. 2004 Dec;114(11):1577-85.

Law, PK. Beneficial effects of transplanting normal limb-bud mesenchyme into dystrophic mouse muscles. *Muscle Nerve*. 1982 Oct;5(8):619-27.

Law, PK. Reduced regenerative capability of minced dystrophic mouse muscles. *Exp Neurol*. 1978 Jun;60(2):231-43.

Law PK, Goodwin TG, Wang MG. Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve*. 1988 Jun;11(6):525-33.

Law, PK; Yap; JL. New muscle transplant method produces normal twitch tension in dystrophic muscle. *Muscle Nerve*. 1979 Sep-Oct;2(5):356-63.

Lee KK, Wong CC, Webb SE, Tang MK, Leung AK, Kwok PF *et al*. Hepatocyte growth factor stimulates chemotactic response in mouse embryonic limb myogenic cells in vitro. *J Exp Zool*. 1999 Feb 1;283(2):170-80.

Lee SL, Dickson RB, Lin CY. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem*. 2000 Nov 24;275(47):36720-5.

Li J, Dressman D, Tsao YP, Sakamoto A, Hoffman EP, Xiao X. rAAV vector-mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy. *Gene Ther*. 1999 Jan;6(1):74-82.

Lipton BH, Schultz E. Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science*. 1979 Sep 21;205(4412):1292-4.

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961 Feb;9:493-5.

Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R & Ponzetto C. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* (1996), **87**, 531-42.

Matsumoto K & Nakamura T. NK4 gene therapy targeting HGF-Met and angiogenesis. *Front Biosci* (2008), **13**, 1943-51.

Meacci E, Nuti F, Donati C, Cencetti F, Farnararo M, Bruni P. Sphingosine kinase activity is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *J Cell Physiol*. 2008 Jan;214(1):210-20.

Meola G, Scarpini E, Velicogna M, Mottura A, Baron PL, Beretta S, Scarlato G. Analysis of fibronectin expression during human muscle differentiation. *Basic Appl Histochem*. 1986;30(2):153-63.

Mennerich D, Schäfer K, Braun T. Pax-3 is necessary but not sufficient for Ibx1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech Dev*. 1998 May;73(2):147-58.

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43503-8.

Miller KJ, Thaloer D, Matteson S and Pavlath GK (2000). Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C174-C181.

Milligan RA, Whittaker M, Safer D. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature*. 1990 Nov 15;348(6298):217-21.

Mittelbronn M, Hanisch F, Gleichmann M, Stötter M, Korinthenberg R, Wehnert M, *et al*. Myofiber degeneration in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (AD-EDMD) (LGMD1B). *Brain Pathol*. 2006 Oct;16(4):266-72.

Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z, Rubin JS, Soloway PD, Ruther U, Edwards DR, Khokha R. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology*. 2005 Apr;41(4):857-67.

Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus.

Genomics. 1988 Jan;2(1):90-5.

Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A *et al.* Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*. 2005 Sep 23;309(5743):2064-7.

Morgan JE, Watt DJ, Sloper JC, Partridge TA. Partial correction of an inherited biochemical defect of skeletal muscle by grafts of normal muscle precursor cells. *J Neurol Sci*. 1988 Sep;86(2-3):137-47.

Morgan JE, Hoffman EP, Partridge TA. Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *J Cell Biol*. 1990 Dec;111(6 Pt 1):2437-49.

Morgan JE, Pagel CN, Sherratt T, Partridge TA. Long-term persistence and migration of myogenic cells injected into pre-irradiated muscles of mdx mice. *J Neurol Sci*. 1993 Apr;115(2):191-200.

Morgan JE, Gross JG, Pagel CN, Beauchamp JR, Fassati A, Thrasher AJ, Di Santo JP, Fisher IB, Shiwen X, Abraham DJ, Partridge TA. Myogenic cell proliferation and generation of a reversible tumorigenic phenotype are triggered by preirradiation of the recipient site. *J Cell Biol*. 2002 May 13;157(4):693-702.

Mueller GM, O'Day T, Watchko JF, Ontell M. Effect of injecting primary myoblasts versus putative muscle-derived stem cells on mass and force generation in mdx mice. *Hum Gene Ther*. 2002 Jun 10;13(9):1081-90.

Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*. 1993 Aug 5;364(6437):532-5.

Nigro V. Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Acta Myol*. 2003 Sep;22(2):35-42.

Nowak J, Bohman SO, Alster P, Berlin T, Cronstrand R, Sonnenfeld T. Biosynthesis of prostaglandins in microsomes of human skeletal muscle and kidney. *Prostaglandins Leukot Med*. 1983 Jul;11(3):269-79.

Odemis V, Boosmann K, Dieterlen MT, Engele J. The chemokine SDF1 controls multiple steps of myogenesis through atypical PKCzeta. *J Cell Sci*. 2007 Nov 15;120(Pt 22):4050-9.

Odemis V, Lamp E, Pezeshki G, Moepps B, Schilling K, Gierschik P, Littman DR, Engele J. Mice deficient in the chemokine receptor CXCR4 exhibit impaired limb innervation and myogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Dec;30(4):494-505.

Okunishi K, Dohi M, Fujio K, Nakagome K, Tabata Y, Okasora T, Seki M, Shibuya M, Imamura M, Harada H, Tanaka R & Yamamoto K. Hepatocyte growth factor significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* (2007), **179**, 5504-13.

Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P & Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* (2002), **16**, 3074-86.

Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet*. 2003;4(7):497-507.

Parmo-Cabañas M, Molina-Ortiz I, Matías-Román S, García-Bernal D, Carvajal-Vergara X, Valle I, Pandiella A, Arroyo AG, Teixidó J. Role of metalloproteinases MMP-9 and MT1-MMP in CXCL12-promoted myeloma cell invasion across basement membranes. *J Pathol*. 2006 Jan;208(1):108-18.

Partridge TA, Grounds M, Sloper JC. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature*. 1978 May 25;273(5660):306-8.

Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*. 1989 Jan 12;337(6203):176-9.

Pastoret C, Sebillé A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve*. 1995 Oct;18(10):1147-54.

Pegoraro E, Marks H, Garcia CA, Crawford T, Mancias P, Connolly AM *et al*. Laminin alpha2 muscular dystrophy: genotype/phenotype studies of 22 patients. *Neurology*. 1998 Jul;51(1):101-10.

Pepe G, Lucarini L, Zhang RZ, Pan TC, Giusti B, Quijano-Roy S *et al*. COL6A1 genomic deletions in Bethlem myopathy and Ullrich muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2006 Jan;59(1):190-5.

Phelps SF, Hauser MA, Cole NM, Rafael JA, Hinkle RT, Faulkner JA *et al*. Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice. *Hum Mol Genet*. 1995 Aug;4(8):1251-8.

Pin CL, Merrifield PA. Regionalized expression of myosin isoforms in heterotypic myotubes formed from embryonic and fetal rat myoblasts in vitro. *Dev Dyn*. 1997 Mar;208(3):420-31.

Pogue R, Anderson LV, Pyle A, Sewry C, Pollitt C, Johnson MA *et al.* Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.* 2001 Jan;11(1):80-7.

Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn.* 2005 Aug;7(3):317-26.

Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* 2002 May 27;157(5):851-64.

Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M & Wijelath ES. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biol* (2005), **6**, 8.

Rando TA, Blau HM. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol.* 1994 Jun;125(6):1275-87.

Reed UC, Ferreira LG, Liu EC, Resende MB, Carvalho MS, Marie SK *et al.* Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy: clinical and genetic heterogeneity. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005 Sep;63(3B):785-90.

Reiser PJ, Greaser ML, Moss RL. Myosin heavy chain composition of single cells from avian slow skeletal muscle is strongly correlated with velocity of shortening during development.

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

Rodemann HP, Waxman L, Goldberg AL. The stimulation of protein degradation in muscle by Ca^{2+} is mediated by prostaglandin E_2 and does not require the calcium-activated protease.

Rodrigues GA, Park M. Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1994 Jul;9(7):2019-27.

Rooij J, Kerstens A, Danuser G, Schwartz MA & Waterman-Storer CM. Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. *J Cell Biol* (2005), **171**, 153-64.

Rosu-Myles M, Stewart E, Trowbridge J, Ito CY, Zandstra P, Bhatia M. A unique population of bone marrow cells migrates to skeletal muscle via hepatocyte growth factor/c-met axis. *J Cell Sci.* 2005 Oct 1;118(Pt 19):4343-52.

Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell.* 1993 Dec 31;75(7):1351-9.

Sambasivan R, Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Dec;18(6):870-82.

Sammels LM, Bosio E, Fragall CT, Grounds MD, van Rooijen N, Beilharz MW. Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy. *Transplantation.* 2004 Jun 27;77(12):1790-7.

Schäfer K, Braun T. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1*. *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):213-6.

Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchie OM, Ruegg UT, Schittny J, Müller U. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell.* 2003 May;4(5):673-85.

Schultz E, Gibson MC, Champion T. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J Exp Zool.* 1978 Dec;206(3):451-6.

Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, Ackermann R, Ruehl M, Nakamura T, Riecken EO. Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor. *Gastroenterology.* 1998 Jan;114(1):139-52.

Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000 Feb 15;218(2):115-24.

Seltzer JL, Weingarten H, Akers KT, Eschbach ML, Grant GA, Eisen AZ. Cleavage specificity of type IV collagenase (gelatinase) from human skin. Use of synthetic peptides as model substrates. *J Biol Chem.* 1989 Nov 25;264(33):19583-6.

Sheehan SM, Allen RE. Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol.* 1999 Dec;181(3):499-506.

Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, Wagers AJ. Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle. *Cell.* 2004 Nov 12;119(4):543-54.

Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC, Lin RH. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):237-42.

Shimomura T, Kondo J, Ochiai M, Naka D, Miyazawa K, Morimoto Y, Kitamura N. Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J Biol Chem.* 1993 Oct 25;268(30):22927-32.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 1989 Jun 30;244(4912):1578-80.

Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS, Di Santo JP, Mouly V. Comparative analysis of genetically engineered immunodeficient mouse strains as recipients for human myoblast transplantation. *Cell Transplant.* 2005;14(7):457-67.

Sim EK, Haider HK, Law PK. Single fiber skeletal muscle transplantation or purified myoblast engraftment? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 May;125(5):1181-2

Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ & Janowska-Wieczorek A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* (2006), **24**, 1254-64.

Skuk D, Tremblay JP. Complement deposition and cell death after myoblast transplantation. *Cell Transplant.* 1998 Sep-Oct;7(5):427-34.

Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000 Mar;59(3):197-206.

Skuk D, Vilquin JT, Tremblay JP. Experimental and therapeutic approaches to muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol.* 2002 Oct;15(5):563-9.

Skuk D, Goulet M, Roy B, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, Dugré FJ, Sylvain M, Lachance JG, Deschênes L, Senay H, Tremblay JP. Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Apr;65(4):371-86.

Skuk D, Goulet M, Roy B, Piette V, Côté CH, Chapdelaine P, Hogrel JY, Paradis M, Bouchard JP, Sylvain M, Lachance JG, Tremblay JP. First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large

volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul Disord*. 2007 Jan;17(1):38-46.

Smithe GM, Fan Y, Grounds MD. Enhanced migration and fusion of donor myoblasts in dystrophic and normal host muscle. *Muscle Nerve*. 2000 Apr;23(4):560-74.

Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol*. 1993 Oct;123(1):223-35.

Stupack DG. Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death Differ* (2005), **12**, 1021-30.

Sunada Y, Bernier SM, Kozak CA, Yamada Y, Campbell KP. Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *J Biol Chem*. 1994 May 13;269(19):13729-32.

Suzuki K, Murtuza B, Heslop L, Morgan JE, Smolenski RT, Suzuki N *et al*. Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 May;123(5):984-92.

Tajbakhsh S, Buckingham M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol*. 2000;48:225-68.

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Buckingham M. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature*. 1996 Nov 21;384(6606):266-70.

Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem*. 1994 Dec 23;269(51):32634-8.

Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol*. 1986;69(1-2):91-5.

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

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O and Allen RE (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*. 194: 114-128.

Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G *et al* . Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and

ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. J Clin Invest. 2004 Jul;114(2):182-95.

Torrente Y, El Fahime E, Caron NJ, Del Bo R, Belicchi M, Pisati F, Tremblay JP, Bresolin N. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates chemotactic response in mouse myogenic cells. Cell Transplant. 2003;12(1):91-100.

Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A, Richards CL. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. Cell Transplant. 1993 Mar-Apr;2(2):99-112.

Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Ando M, Bertotti A, Comoglio PM and Boccaccio C (2000). HGF/ scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing avidity. FASEB J 14: 1629-1640.

Tsivitse SK, McLoughlin TJ, Peterson JM, Mylona E, McGregor SJ, Pizza FX. Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD+ cells in skeletal muscle. Eur J Appl Physiol. 2003 Nov;90(5-6):633-8. Epub 2003 Sep 4.

Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, Anderson LV, Pavanello RC, Passos-Bueno MR et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000 Jun;23(6):984-8.

Vainzof M, Zatz M. Protein defects in neuromuscular diseases. Braz J Med Biol Res. 2003 May;36(5):543-55.

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

Vilquin JT, Guérette B, Puymirat J, Yaffe D, Tomé FM, Fardeau M et al. Myoblast transplantations lead to the expression of the laminin alpha 2 chain in normal and dystrophic (dy/dy) mouse muscles. Gene Ther. 1999 May;6(5):792-800.

Volonte D, Liu Y, Galbiati F. The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. FASEB J. 2005 Feb;19(2):237-9.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev. 2000 Sep 1;14(17):2123-33.

Wang H & Keiser JA. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun (2000), **272**, 900-5.

Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC. Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci.* 1982 Dec;57(2-3):319-31.

Watt DJ, Morgan JE, Partridge TA. Use of mononuclear precursor cells to insert allogeneic genes into growing mouse muscles. *Muscle Nerve.* 1984 Nov-Dec;7(9):741-50.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P *et al.* PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature.* 2007 May 3;447(7140):87-91.

Wewer UM, Engvall E. Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1996 Dec;6(6):409-18.

Wong SH, Lowes KN, Quigley AF, Marotta R, Kita M *et al.* DNA electroporation in vivo targets mature fibres in dystrophic mdx muscle. *Neuromuscul Disord.* 2005 Oct;15(9-10):630-41.

Williams, B.A., Ordahl, C.P., 1994. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks the early stages in myogenic cell specification. *Development* 120, 785–796.

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

Yamaura K, Ito K, Tsukioka K, Wada Y, Makiuchi A, Sakaguchi M *et al.* Suppression of acute and chronic rejection by hepatocyte growth factor in a murine model of cardiac transplantation: induction of tolerance and prevention of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* (2004), **110**, 1650-7.

Yang XM, Vogan K, Gros P, Park M. Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in *Splotch* mice. *Development.* 1996 Jul;122(7):2163-71.

Yao CC, Ziober BL, Sutherland AE, Mendrick DL, Kramer RH. Laminins promote the locomotion of skeletal myoblasts via the alpha 7 integrin receptor. *J Cell Sci.* 1996 Dec;109 (Pt 13):3139-50.

Yusuf F, Brand-Saberi B. The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat Embryol (Berl).* 2006 Dec;211 Suppl 1:21-30.

Zhou HY & Wong AS. Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells. *Endocrinology* (2006), **147**, 2557-66.

Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, Tidball JG, McNally EM. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett.* 2000 May 26;474(1):71-5.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)