



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**



**RAMON PEÇANHA**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO  
DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO  
TECIDO ADIPOSEO (AT-MSCs) EM LESÃO  
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RATOS**

**Rio de Janeiro  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**RAMON PEÇANHA**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO  
DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO  
TECIDO ADIPOSEO (AT-MSCs) EM LESÃO  
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientadores: Regina Coeli dos Santos Goldenberg  
João Pedro Saar Werneck de Castro



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2008**

Peçanha, Ramon  
INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO DAS CÉLULAS  
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO (AT-MSCs) EM LESÃO  
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RATOS / Ramon Peçanha. – Rio de Janeiro:  
UFRJ / IBCCF, 2008.

XVII,126f.: 28 il.; 29,7 cm.

Orientadores: Regina Coeli dos Santos Goldenberg e João Pedro  
Saar Werneck de Castro.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Referências bibliográficas: f. 98-126.

1. Regeneração muscular 2. Células mesenquimais 3. fibrose  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia. IV. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO DAS  
CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO  
ADIPOSO (AT-MSCs) EM LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA  
DE RATOS”**

**RAMON PEÇANHA**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)

Rio de Janeiro, 29 de Setembro de 2008.

---

**DRA. THEREZA FONSECA QUÍRICO-SANTOS**

---

**DRA. CLÁUDIA DOS SANTOS MERMELSTEIN**

---

**DRA. VÂNIA MARIA CORRÊA DA COSTA**

---

**DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG  
(ORIENTADOR)**

---

**DR. JOAO PEDRO SAAR WERNECK DE CASTRO  
(ORIENTADOR)**

---

**DR. JOSE HAMILTON MATHEUS NASCIMENTO(REVISOR)**

## RESUMO

A regeneração incompleta após lesões musculares é um problema comum na traumatologia. O objetivo do estudo foi investigar se células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AT-MSCs) contribuiriam para a regeneração muscular. As AT-MSCs de ratos Wistar machos foram mantidas em cultura até a terceira passagem. Uma semana após a laceração do músculo soleus de ratos fêmeas, as células foram injetadas diretamente no ventre muscular. Aos 14 e 28 dias após a terapia, os músculos foram avaliados por suas propriedades contráteis. Análise histológica foi realizada no final do protocolo. A detecção do quimerismo foi feita a partir do gene SRY específico de macho por PCR em tempo real. Todos os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão e os dados foram significativos quando  $p < 0.05$ . Não houve diferença entre os grupos para força em 1 Hz. A força tetânica foi maior no grupo tratado comparado ao grupo não tratado. ( $79.2 \pm 5.0\%$  vs  $58.3 \pm 8.1\%$ ,  $p < 0.05$ ) tal como o número de fibras em regeneração ( $273 \pm 18$  per  $103$  vs  $145 \pm 36$  per  $103$  fibras;  $p < 0.05$ ), duas semanas após a terapia. No entanto, 4 semanas pós tratamento, ambos grupos tiveram valores similares para os dois parâmetros. A injeção das AT-MSCs não diminuiu a deposição de colágeno. Produtos de PCR foram detectados e mostraram um decréscimo de sinal do gene de macho SRY de forma tempo-dependente. Nós concluímos que a administração da AT-MSCs contribuiu para a aceleração da regeneração muscular.

## ABSTRACT

Incomplete regeneration after traumatic muscle injury is a common problem in orthopedics and traumatology. The aim of the present study was investigate whether adipose tissue-derived mesenchymal cells (AT-MSCs) could contribute to skeletal muscle healing. The AT-MSCs of male singenic Wistar rats were cultured until the third passage. One week after laceration of female rats' soleus muscles, cells were injected directly into the muscle ventre. Fourteen and twenty eight days after cell therapy, the muscles were tested for peak twitch and tetanic force. Histological analysis was performed at the end of the protocol. Quimerism detection was performed using specific SRY male gene target by PCR real time. All data are presented as mean  $\pm$  SEM and significance was set at  $p < 0.05$ . There was no difference between groups for 1 Hz twitch strength. The 50 Hz tetanus strength was higher in the treated group compared to control group ( $79.2 \pm 5.0\%$  vs  $58.3 \pm 8.1\%$ ,  $p < 0.05$ ) as well as the number of centronucleated regenerating myofibers ( $273 \pm 18$  per 103 vs  $145 \pm 36$  per 103 myofibers;  $p < 0.05$ ), two weeks after cell injection. However, four weeks after treatment, both groups had similar values for these two parameters. Treatment did not decrease collagen deposition. PCR products were detected and showed a decreased signal of male Y gene in a time-dependent manner. We conclude that AT-MSCs administration can accelerate muscle regeneration.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Lesão muscular: considerações gerais	1
1.2. Estrutura do músculo esquelético	2
1.3. Processo inflamatório durante a regeneração muscular	3
1.4. Dinâmica de expressão dos MRFs (do inglês <i>myogenic regulatory factor</i> ) durante a regeneração muscular	5
1.5. Matriz extracelular e o desenvolvimento da fibrose do músculo esquelético	6
1.5.1. Formação da cicatriz fibrótica no músculo esquelético pós-lesão	8
1.6. Modelos de estudo em lesões musculares	10
1.7. Células satélites	12
1.7.1. Origem das células satélites	13
1.7.2. Papel das células satélites no crescimento e regeneração do músculo	14
1.7.3. Identificação e capacidade de autorenovação das células satélites	15
1.7.4. Ativação das células satélites durante a regeneração muscular	16
1.8. Terapia celular e medicina regenerativa	17
1.8. Células -Tronco: conceito	18
1.9.1. Células tronco musculares	19
1.9.2. Células mesenquimais multipotentes (MSC)	23
1.10 Células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AT-MSC)	24
1.10.1 Caracterização das AT-MSCs	26
1.10.2 Diferenciação em linhagens mesodérmicas	27
1.10.3 Diferenciação Adipogênica	28
1.10.4 Diferenciação osteogênica	29

1.10.5 Diferenciação condrogênica	30
1.10.6 Potencial miogênico das At-MSCs	30
1.11 Objetivos	33
1.12 Objetivo geral	33
1.13 Objetivos específicos	33
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
2.1 Animais	34
2.2 Modelo experimental de lesão muscular esquelética por laceração	35
2.3 Isolamento e cultura das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AT-MSCs)	37
2.3.1 Fracionamento	37
2.3.2 Contagem de células e viabilidade	39
2.4. Injeção das células	39
2.5 Registro de tensão isométrica em músculo esquelético	40
2.6 Amplificação do DNA por PCR em tempo real (Real time polymerase chain reaction)	41
2.6.1 Extração de DNA de músculo	41
2.6.2 Extração através da proteinase K	41
2.6.3 Desenho dos iniciadores (primers)	42
2.6.4 PCR em tempo real – SYBR Green I®	44
2.6.5. Integridade do DNA extraído	45
2.6.6. Sensibilidade da detecção do sistema SYBR Green	48
2.7 Histologia	50
2.7.1 Coloração com hematoxilina e eosina (H&E)	51

2.7.2	Quantificação do número de fibras em regeneração	52
2.7.3	Coloração com picrossírius	52
2.7.4	Quantificação da área de Fibrose	53
2.8	Análise estatística	54
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
3.1	Modelo de lesão muscular	55
3.1.1	Contratilidade muscular	55
3.2	Análise histológica do músculo Sóleo	57
3.2.1	Coloração de Hematoxilina e Eosina	62
3.2.2	Coloração com picrossírius	67
3.3	Tratamento com AT-MSCs	67
3.3.1	Preparação de músculo isolado: análise da contratilidade muscular	70
3.3.2.	Coloração de Hematoxilina e Eosina: análise do infiltrado inflamatório e quantificação de fibras musculares em regeneração	74
3.3.3	Coloração de picrossírius: análise da deposição de colágeno	
3.4.3	PCR em tempo real: detecção de quimerismo celular no músculo esquelético	78
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>81</b>
4.1	Sobrevivência das células no tecido hospedeiro	82
4.2	Mecanismo de ação das AT-MSCs	84
4.3	Impacto da terapia com AT-MSCs na formação de fibrose	89
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Programa de Bioengenharia de Terapia celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob orientação dos professores Regina Coeli dos Santos Goldenberg e João Pedro Saar Werneck de Castro, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

Dedico este trabalho aos amados e dedicados pais, Joel e Sônia.

## AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela excelência de trabalho organizacional e operacional.

Às instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. João Pedro Saar Werneck de Castro, meu amigo e Orientador, com muito carinho, agradeço pela crescente amizade durante esses anos, por ter me acompanhado durante os momentos difíceis, por me mostrar o real sentido de seriedade e compromisso no trabalho e pela orientação.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Regina Coeli dos Santos Goldenberg, pelos conselhos nos momentos importantes e pelas conversas agradáveis e divertidas nos momentos de descontração. Agradeço a oportunidade e orientação dada.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho, por ter aberto as portas do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular para mim.

A Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Jose Hamilton por ter sido a revisor desta tese.

Ao Emiliano Medei por toda a ajuda e boa vontade nos últimos momentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gisele Sudo pela sua colaboração, e também a todos os integrantes do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (Dani, Jack, Luana, Paula, Fernanda, Juliana, Patrícia, Helen...) pelos conselhos e bons momentos juntos.

Ao Prof<sup>o</sup>.Dr<sup>o</sup> Milton Moraes e a Ana Beatriz Robotton (a Xuxu), do laboratório de Hanseniose da Fiocruz/RJ, pela realização dos experimentos de PCR em tempo real e pela amizade acima de tudo. Agradeço também as suas alunas, Cynthia Chester, Alejandra e Luana que por muitas vezes foram minhas analistas nos momentos de dúvida e complicação, e pelos ótimos momentos de boas risadas. (Não há melhor lugar para fazer terapia em grupo!).

A Luiza Bagno, por ter realizado a cultura das AT-MSCs para este trabalho e ter se preocupado tanto nos momentos de contaminação e quantidade restrita de células para a realização do experimento. Agradeço também, que mesmo nesses momentos mais difíceis tenha mantido o senso de humor e tranquilidade, pois me ajudou muito com isso.

Aos alunos de iniciação científica, Marcelo Baldanza e Roberta Franco, por realizarem todo o trabalho ao meu lado sempre. Pelo interesse e empenho. Obrigado por tudo. Vocês tem todo o meu respeito e admiração.

A Juliana Silva, por ter feito as lâminas de histologia coradas com H&E e Picrossirius, mesmo cheia de trabalho e desesperada...sempre desesperada. Obrigado por ter estado do meu lado.

Aos amigos Daniel Laks, Ricardo Luzardo e Alvaro Padron da Biofísica, pelos momentos de luta e dificuldade juntos, por torcer e acreditar em mim, pelos diversos momentos muito alegres e muito divertidos entre um chopp e outro, por me incentivar a continuar no caminho...enfim, por saber o real significado da palavra “amigo”.

A todos os Membros do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular os quais fizeram parte das todas as etapas deste trabalho, dos conselhos e ajuda até as boas risadas (Juliana Dias, Debora Mello, Vanessa Pinho, Stephan, Bruno Esporcatte, Bruno Paredes, o Nobru, Luiz Fernando, Patricia Fidelis, Andreza, Fernanda Mesquita, Juliana Passipieri, Tais, Renan, Leandro Vairo, Marcinha ) e com isso me brindaram com uma dose extra de entusiasmo.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Muscular e do Exercício (João Paulo, Leandro e Ruy), por serem os alunos de iniciação científica que eu não fui. Agradeço pelo exemplo e....por tudo.

**“A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las”.**

**Aristóteles**

## LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	(do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BMP	(do inglês <i>bone morphogenic protein</i> )
brdU	(do inglês <i>5-bromo-2-deoxyuridine</i> )
BSS	(do inglês <i>Balanced Salt Solution</i> )
CD	agregado de diferenciação (e.g. CD45,CD117 dentre outros.Do inglês <i>cluster of differentiation</i> )
C3a	sistema complemento 3a (do inglês <i>complement component</i> )
C5a	sistema complemento 5a ( do inglês <i>complement component</i> )
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco modified eagle medium</i> )
ES	célula-tronco embrionária (do inglês <i>embryonic stem cells</i> )
EDTA	(do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
eGFP	(do inglês, <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
FACS	citômetro de fluxo (do inglês <i>flow cytometric cell sorting</i> )
FGF	fator de crescimento de fibroblasto (do inglês <i>Fibroblast growth factor</i> )
GAPDH	(do inglês <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
G-CSF	(do inglês <i>granulocyte-colony stimulating factor</i> )
GLUT	(do inglês <i>glucose transporter</i> )
GDF	(do inglês <i>growth differentiation factor</i> )
HGF	fator de crescimento de hepatócito (do inglês <i>Hepatocyte growth factor</i> )
HLA	(do inglês <i>human leucocyte antigen</i> )

IGF-1	fator de crescimento similar a insulina 1 (do inglês Insulin-like growth factor)
IL	interleucina (e.g. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 dentre outras)
LIF	fator inibidor de leucemia (do inglês <i>leukemia inhibitory factor</i> )
MAPK	(do inglês mitogen-activated protein kinase)
MHC	complexo de histocompatibilidade principal (do inglês <i>Major histocompatibility complex</i> )
MRF	fatores de regulação miogênica (do inglês miogenic regulatory factor)
MCI	massa celular interna
MSC	célula mesenquimal stromal multipotente (do inglês <i>mesenchymal stem cells</i> )
NCAM	(do inglês <i>neural cell adhesion molecule</i> )
NGF	fator de crescimento de nervo
Pax7	(do inglês <i>paired box gene 7</i> )
PBS	salina tamponada com fosfato (do inglês <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>platelet-derived growth factor</i> )
PI3K	(do inglês <i>phosphatidylinositol-3-kinases</i> )
PPAR $\gamma$	(do ingles <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
RICE	(do inglês <i>rest, ice, compression and elevation</i> )
SCF	(do inglês <i>stem cell factor</i> )
SDS	(do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SP	(do inglês <i>side population</i> )

SFB	soro fetal bovino
shRNA	(RNA de interferência ou do inglês <i>short hairpin RNA</i> )
SVF	fração do estroma vascular (do inglês <i>stromal vascular fraction</i> )
SRY	(do inglês sex determining region on Y)
TGF- $\beta$	fator de crescimento de transformação $\beta$ (do inglês <i>transforming growth factor</i> )
TA	Temperatura ambiente
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral- $\alpha$ (do inglês <i>tumor necrosis factor</i> )

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Lesão muscular: considerações gerais

Lesões musculares podem ocorrer tanto por trauma direto (estiramentos e contraturas) quanto por causas indiretas (isquemia, lesões neurológicas e distrofias musculares) (Kasemkijwattana *et al* 1998; Orchard & Best, 2002). A alta incidência de lesões é compensada pela grande capacidade de regeneração que esse tecido possui o que garante a manutenção da funcionalidade da musculatura esquelética (Chargé & Rudnicki, 2004).

Muito embora o músculo esquelético possua uma grande capacidade regenerativa (Seale *et al*, 2000), o acometimento de lesões graves e/ou sucessivas acarreta um ciclo de degeneração-regeneração levando o indivíduo à perda de função muscular e ao quadro de fibrose (Orchard *et al*, 2002; Noonan *et al*, 1999). Tais lesões desenvolvem graus significativos de perda da capacidade motora que está associada a um maior tempo de recuperação e impossibilidade de obter desempenhos compatíveis no âmbito profissional (Markert *et al*, 2005; Zemper, 2005). Os tratamentos para lesões musculares esqueléticas é um assunto controverso entre os grupos que os investigam. Um tratamento clássico descrito como **RICE** (do inglês, *rest, ice, compression and elevation*), até então, se mostrou eficiente para reduzir a dor local, porém não gera um benefício adicional para recuperação do músculo (Wright & Sluka, 2001; Warden, 2003). A prescrição de antiinflamatórios não esteroidais tem sido ainda a intervenção mais usada entre médicos. Contudo, o uso de antiinflamatórios tradicionais pode resultar em inúmeros efeitos colaterais, como sangramento gastro intestinal, danos

hepáticos e problemas cardíacos em casos mais graves (Hirschowitz *et al*, 1991; Boelsterli, 2002; Feenstra *et al*, 1997). Juntamente a isso, evidências atuais demonstraram que antiinflamatórios não esteroidais seriam responsáveis por atrasar a regeneração do tecido muscular e promover a formação de fibrose, e esse fenômeno estaria relacionado à diminuição do processo inflamatório (Shen *et al*, 2005).

## **1.2. Estrutura do músculo esquelético**

Cada um dos 600 músculos esqueléticos do corpo humano é composto de centenas de milhares de células alongadas e multinucleadas chamadas fibras musculares.(Fig. 1). Dentro de uma única fibra, as proteínas miosina e actina compõem os filamentos, os quais estão organizados longitudinalmente em sequencia formando os sarcômeros (Fig. 1). Sarcômeros em series formam as miofibrilas, e existem muitas miofibrilas em cada fibra muscular. As miofibrilas hipertrofiam induzidas por exercícios de força e atrofiam por imobilização, inatividade, lesão e idade. A mudança no comprimento dos sarcômeros ocorre quando os filamentos deslizam um sobre o outro, mediado por interações cíclicas entre as projeções da miosina, chamada de ponte cruzada.

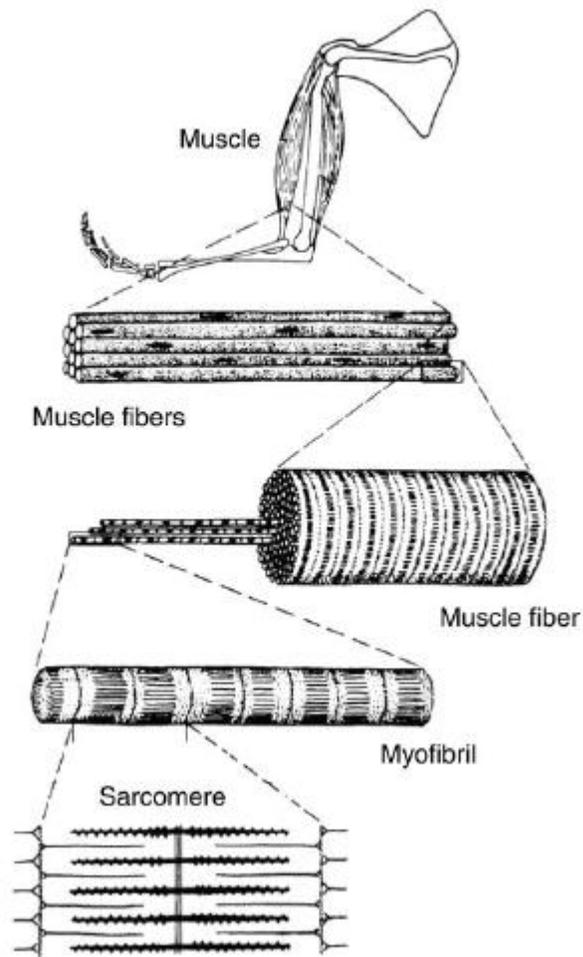


Figura 1 – Representação ilustrativa da hierarquia estrutural do músculo esquelético.

### 1.3. Processo inflamatório durante a regeneração muscular

O processo inflamatório é um dos primeiros eventos que acontece logo após a lesão muscular. Essa rápida resposta se dá, inicialmente, por diversos fatores atrativos que estão sendo liberados na área de lesão, ou seja, uma ação quimiotática. Robertson *et al* (1993) demonstraram que neutrófilos e linfócitos respondem mais rapidamente a esses fatores atrativos do que macrófagos. Além disso, macrófagos peritoneais,

apresentam grande capacidade migratória quando cultivados na presença de um extrato de músculo (Robertson *et al*, 1993; Fielding *et al*, 1993). Apesar da natureza do agente atrativo não ter sido determinada, alguns produtos da ativação do sistema complemento (C3a, C5a ), citocinas, além de debris celulares e da matriz extracelular, podem exercer esse papel. Chazaud *et al* (2003) através da técnica de micro arranjo, demonstraram que a célula precursora de músculo cultivada durante três dias, secreta fatores que atraem macrófagos e monócitos. Os autores ainda sugerem que exista uma associação dessas células na amplificação da resposta inflamatória durante a regeneração muscular.

Após 48 horas da lesão, os macrófagos se tornam o tipo celular predominante e possuem a função de fagocitar o tecido lesionado e de liberar diversos fatores de crescimento e citocinas, que exercem diferentes funções no processo de regeneração em curso (Robertson *et al*, 1993; Fielding *et al*, 1993). É importante destacar que existem algumas populações de macrófagos no tecido muscular normal e a maioria desses macrófagos expressam o fenótipo ED2<sup>+</sup> e está intimamente associado com a microvasculatura do músculo (Honda *et al*, 1992). Porém, durante a regeneração, Pierre & Tidball (1994) observaram uma invasão caracterizada por macrófagos com fenótipo ED1<sup>+</sup> e moléculas da classe II do MHC (Ia<sup>+</sup>) que demonstraram grande atividade fagocítica. Baseados nesses achados os autores propõem um padrão de resposta de macrófagos durante a regeneração, sendo a resposta inicial de degeneração e fagocitose do músculo caracterizada pela invasão de ED1<sup>+</sup> e Ia<sup>+</sup> e a fase regenerativa com a presença de ED2<sup>+</sup> (McLenmam, 1993).

#### **1.4. Dinâmica de expressão dos MRFs (do inglês *myogenic regulatory factor*) durante a regeneração muscular**

No nível molecular, a ativação de células precursoras de músculo, é caracterizada pela rápida expressão dos fatores reguladores de músculo (MRF). Após a ativação, no entanto, ocorre um aumento na expressão de *MyoD* ou *Myf5*, que antecede o aparecimento de marcadores de proliferação celular. Subseqüentemente, durante a fase proliferativa, esses dois fatores são co-expressos (Cooper *et al*, 1999; Cornelison & Wold, 1997). Após essa fase, encontramos a expressão de *Mrf4* e miogenina, e as células entram na fase terminal de diferenciação, que envolve o crescimento do miotubo e a ativação de diversas proteínas específicas da linhagem muscular (Raws *et al*, 1998; Francis-West *et al*, 2003).

A importância desses fatores para a ativação e diferenciação das células satélites é confirmada por trabalhos que utilizaram camundongo deficiente em *MyoD*. Sabourin *et al* (1999), utilizando esse animal transgênico, observaram uma reduzida capacidade de diferenciação, caracterizada pelo aumento do número de células precursoras de músculo e diminuição de miotubos. Já os animais deficientes em miogenina e *Mrf4* possuem progenitores que expressam *myod* e *myf5*, porém são deficientes em músculos diferenciados (Raws *et al* 1998).

Launay *et al* (2001), através de hibridização *in situ*, também foram capazes de mostrar um aumento na expressão de *MyoD*, *Myf5* e *Mrf4* nos primeiros estágios de regeneração. Transcritos para miogenina foram encontrados já em miotubos o que caracteriza o papel mais tardio desse fator na diferenciação. Porém, nesse mesmo trabalho, foi observada uma dinâmica de expressão diferente para os MRF, quando o

músculo foi desnervado, além de lesionado. Assim, a ativação de células satélites é mediada por uma combinação de diversos fatores incluindo: fatores de crescimento liberados pela própria célula muscular e pelo processo inflamatório e sinalização induzida por moléculas de adesão. Porém, a ligação entre esse microambiente e a regulação molecular, ainda não foi encontrada. Dessa forma, o papel específico de cada um desses fatores, bem como de suas interações para modular o processo de ativação, proliferação e diferenciação ainda necessita de mais estudos.

### **1.5. Matriz extracelular e o desenvolvimento da fibrose do músculo esquelético**

A matriz intercelular é o termo utilizado para descrever todos os tecidos conjuntivos, presentes em três subdivisões no músculo esquelético: o epimísio, o perimísio e o endomísio. O epimísio refere-se ao tecido conjuntivo que envolve todo o músculo. Um fascículo com diversas fibras musculares é envolvido por uma densa camada de tecido conjuntivo chamado de perímisio, por onde passam importantes conexões vasculares, pequenos vasos linfáticos e células nervosas. O endomísio é uma fina membrana de matriz extracelular que envolve cada fibra muscular por onde passam capilares e se localizam os fibroblastos (Mayne & Sanderson, 1985).

Com o evento lesivo e durante a fase inicial da regeneração muscular, a matriz extracelular é rompida tanto diretamente pelo mecanismo de lesão, quanto pela degeneração na área lesada mediada pelo processo inflamatório (Grounds, 1991; Gulati *et al*, 1983). Desta forma, os vários componentes da matriz extracelular desaparecem e durante a formação e crescimento dos miotubos, uma nova membrana basal é composta (Gulati, 1986). No entanto, existem evidências que os componentes

da matriz presentes no tecido viável ao redor da lesão, possam desempenhar um papel de orientação da regeneração muscular (Vracko & Benditt, 1972).

O principal componente da matriz intercelular do músculo esquelético é o colágeno. Diversos trabalhos demonstraram que predomina no endomísio o colágeno dos tipos I, III e como componente minoritário o tipo V (Takala & Virtanen, 2000; Mayne & Sanderson, 1985; Foidart & col, 1981; Light & Champion, 1984). O colágeno do tipo I é predominante no epimísio e perimísio, enquanto que o tipo III constitui 16,4 e 30% destas camadas, respectivamente (Light & Champion, 1984). Apesar destes tipos fibrilares de colágenos serem predominantes na matriz intercelular do músculo, alguns estudos demonstraram a presença de diversas isoformas desta molécula: tipo II, IX, XII, XIV, XV e XVII (Takala & Virtanen, 2000).

Gulati *et al* (1983) observaram as mudanças nos componentes da membrana basal e no colágeno tipo IV durante o processo de degeneração e regeneração. Após uma diminuição na expressão, em volta dos miotubos, uma nova membrana basal reaparecia, demonstrando que esta estrutura era dinâmica e capaz de influenciar no processo de regeneração. Com protocolo de lesão intermitente por 4 semanas, Stauber *et al* (1998) observaram um aumento na expressão de colágeno e na formação de fibrose no tecido muscular.

A relação entre a regeneração muscular e a síntese de colágeno é também observada em doenças associadas ao músculo esquelético. De fato, pacientes com a síndrome de Ullrich's, possuem uma deficiência em colágeno tipo VI e apresentam um fenótipo de alteração no crescimento e regeneração muscular (Higuchi *et al*, 2003). A análise do material genético extraído do músculo do animal *mdx* pela metodologia de microarranjo, encontrou um aumento na expressão de colágeno (Porter *et al*, 2002). O

camundongo *mdx* é gerado a partir de uma mutação pontual espontânea localizada no exon 23 do gene da distrofina. Essa mutação forma um códon de parada prematuro, produzindo uma proteína defeituosa (Chargé & Rudnicki, 2004).

Além da quantidade total, a proporção entre os colágenos I e III também se modifica durante o processo de regeneração muscular. No músculo normal, encontramos uma maior quantidade de colágeno tipo I, porém durante a regeneração, a quantidade de colágeno III é aumentada e permanece assim por longos períodos. A isoforma III apresenta menor diâmetro e menos ligações entre as fibrilas, o que pode estar relacionado com a alta incidência de lesões nos sítios previamente lesionados (Mutsaers *et al*, 1997; Letho *et al*, 1985).

Além do colágeno, outras moléculas como fibronectina, proteoglicanos e lamininas, compõem a matriz extracelular. As células são então capazes de se ligarem a esses componentes através de moléculas de adesão, principalmente formadas por integrinas. Essa associação é extremamente dinâmica, e possui uma taxa constante de síntese e degradação (Gulati, 1986; Border & Noble, 1994).

### **1.5.1. Formação da cicatriz fibrótica no músculo esquelético pós-lesão**

O principal responsável pela síntese dos componentes da matriz extracelular no músculo é o fibroblasto, que por sua vez é controlado por mediadores derivados das células inflamatórias, das células musculares e das próprias células precursoras de músculo. Li *et al* (2004) mostraram que células miogênicas também se diferenciam em miofibroblastos durante a regeneração e o TGF- $\beta$ 1 seria o principal responsável. Gu *et al* (2007) mostraram haver uma interação entre o TGF-  $\beta$ 1 e a ativação do fator de

transcrição smad3 no processo proliferação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos tal como o aumento da produção de colágeno.

Existe um consenso da literatura mostrando que lesões musculares graves e/ou repetidas, induzem a formação de uma cicatriz fibrosa (Kääriäinen *et al* 1998; Stauber *et al* 2000; Menetrey *et al*, 1999). Esta pode ser definida por uma excessiva deposição de componentes de matriz que resulta na destruição da arquitetura normal do tecido e compromete sua função. No músculo esquelético, ela é caracterizada pela grande deposição desses componentes no interstício e na região perivascular (Stauber *et al* 1994; Stauber *et al*, 2000). Diversas citocinas estão envolvidas no remodelamento do tecido após a lesão, tais como: PDGF, FGF, TGF- $\beta$ , TNF, IL1 e IL6. Dentre esses fatores, o TGF- $\beta$  tem um papel fundamental na ativação, produção e deposição de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular. Em mamíferos, esta citocina, possui três isoformas (TGF- $\beta$  1-2-3) com propriedades biológicas similares. Produzida e secretada em uma forma inativa, essa proteína fica armazenada na superfície da célula e na matriz extracelular até ser convertida em sua forma ativa por um mecanismo ainda desconhecido (Border & Noble, 1994; Kulkarnil *et al*, 1993). Apesar de atuar em sinergia com outros fatores durante a regeneração, o TGF- $\beta$  é o principal estimulador da deposição de matriz extracelular e está envolvido na quimiotaxia de células inflamatórias e fibroblastos (Wahl *et al*, 1987; Postlethwaite *et al*, 1987). Este fator é ainda capaz de estimular sua própria síntese, amplificando seus efeitos biológicos no sítio de lesão (Kim *et al*, 1990).

Dentro da resposta normal a lesões, o TGF- $\beta$  estimula também a produção de inibidores de proteases e modifica a expressão de integrinas aumentando a adesão

celular. Em casos de lesões muito graves e/ou repetidas, altas concentrações desse fator são encontradas, e está relacionado com a formação de cicatriz fibrótica (Fukushima *et al*, 2001).

Analisando a localização do TGF- $\beta$ 2-3 durante a regeneração muscular, McLennan & Koishi (1997), mostraram que o TGF- $\beta$ 2 é produzido e se acumula na junção entre o tecido necrótico e as células ainda viáveis, e, posteriormente, é fortemente expresso pelos miotubos em formação. A expressão do TGF- $\beta$ 3 aumenta de acordo com a evolução do processo inflamatório.

Os ensaios com bloqueadores de TGF- $\beta$  reforçam o seu papel na indução de fibrose muscular pós-lesão. Fukushima *et al* (2001) obtiveram um decréscimo tanto na expressão de colágeno por fibroblastos musculares em cultura, quanto uma diminuição na área de fibrose *in vivo*, utilizando um proteoglicano chamado decorina, que é um componente da matriz extracelular capaz de se ligar ao TGF- $\beta$ 1 e inibir esse fator. Com o mesmo inibidor, Sato *et al* (2003) confirmaram esses dados em um animal submetido à lesão por laceração. A inibição da fibrose foi também demonstrada por Chan *et al* (2003) através da injeção de suramina, uma molécula que compete com o TGF- $\beta$ 1 pelo seu receptor.

## **1.6. Modelos de estudo em lesões musculares.**

Ainda que as fases degenerativas e regenerativas do reparo muscular sejam similares nos diferentes tipos de músculo e nas diversas formas de lesão, a evolução e amplitude de cada fase podem variar de acordo com o tipo, extensão e modelo animal

utilizado (Chargé & Rudnicki, 2004; Grounds, 1991). Com o objetivo de estudar o processo regenerativo segundo princípios da metodologia científica de controle, especificidade e reprodutibilidade, é necessário o desenvolvimento de modelos de estudo para lesão muscular.

Desta forma, diversos modelos já foram propostos para a indução de lesões nos diversos tipos de músculos, tais como: miotoxinas, estiramento forçado, agente hipertônico, laceração, trauma direto, esmagamento, crioinjúria, autotransplante, deinervação, imobilização e contrações excêntricas (Stauber *et al*, 2000; Labarge & Blau, 2002; Asakura *et al*, 2002; Crisco *et al*, 1994; Bischoff, 1970; Inrintchev *et al*, 1997; Billington, 1997; Winchester *et al*, 1991; Herbison *et al*, 1978).

O modelo de laceração, que consiste em um corte transversal de 50% da região do maior ventre muscular com 100% de profundidade (Menetrey *et al*, 1999) é amplamente utilizado nos trabalhos que se propõem a estudar as fases de degeneração e regeneração musculares, e nos estudos que investigam o tratamento com fármacos e também com células tronco. Os autores colocam que esse modelo possui uma boa reprodutibilidade devido a padronização da posição do corte, apesar de não fornecerem as posições anatômicas necessárias para tal. Nos primeiros quatro dias após a lesão, eles descrevem uma fenda na área cortada, com a presença de infiltrado inflamatório e tecido de granulação. Após 28 dias, os autores descrevem que essa região foi preenchida com tecido cicatricial, o que caracteriza uma regeneração incompleta (Menetrey *et al*, 1999).

A utilização de camundongos transgênicos com deficiências em diversas proteínas como pax7, FGF6 (do inglês, *fibroblast growth factor*), LIF (do inglês, *leukemia inhibitory factor*), miostatina e distrofina, tem produzido um grande avanço no

entendimento do processo regenerativo e constituem interessantes modelos de estudo (Floss *et al*, 1997; Kurek *et al*, 1997; Seale *et al* 2000a). Dentre esses, o animal com deficiência em distrofina, conhecido como mdx, representa, ao lado do modelo de lesão por toxinas, o modelo mais utilizado em investigações sobre a regeneração muscular. A importância desse animal vem também do fato de que ele representa um modelo de estudo para a distrofia muscular em humanos (Distrofia muscular de Duchenne), doença degenerativa que pode levar à morte. A distrofina é o maior componente de um complexo de glicoproteínas que faz a ligação do citoesqueleto da célula muscular com a matriz extracelular. A desorganização desse complexo induz um aumento na susceptibilidade da membrana a lesões, a tal ponto que elas possam ser induzidas pela própria contração muscular (Meier & Rugg, 2000; Petrof, 1998; Watchko *et al*, 2002). Esse animal, portanto, apresenta em toda a sua vida, sinais de degeneração muscular, o que leva a uma morte mais prematura nos animais mais velhos. Além disso, o processo de deposição de tecido cicatricial, formação de fibrose, é contínuo e progressivo (Petrof, 1998).

### **1.7. Células satélites**

Na década de 60, Stockdale & Holtzer (1961) demonstraram que uma vez incorporado na fibra muscular, o núcleo da célula muscular rapidamente perde sua capacidade de dividir e dar origem a uma célula precursora, ou seja, a síntese de DNA não ocorre em uma fibra muscular madura. Entretanto, Macconnachie *et al* (1964) demonstraram que existe um grande aumento no conteúdo de DNA nas fibras musculares durante o período pós-natal. Além disso, um número considerável de

estudos mostrou que o músculo esquelético possui uma elevada capacidade regenerativa (Chargé & Rudnicki, 2004; Grounds, 1991; Bischoff, 1990). Este aparente enigma foi esclarecido após a identificação das chamadas células satélites musculares.

Descritas inicialmente por Mauro (1961), com o advento do microscópio eletrônico, as células satélites estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema, sendo consideradas, no músculo esquelético maduro, mitoticamente quiescentes e indiferenciadas (Cornelison & Wold, 1997). Apesar de ser identificada em todos os músculos esqueléticos estudados, a população de células satélite não possui uma distribuição uniforme, sendo encontrada em maior número em fibras de contração lenta, próxima a junção neuromuscular e a capilares (Schmalbruch & Hellhammer, 1977; Wokke, 1989). As evidências sugerem que a quantidade de células satélites também varia com a idade. Elas constituem 30% da quantidade de núcleos de um músculo no animal neonato, diminuindo para 4% no animal adulto, chegando a 2% no senil (Hawke & Garry, 2001). Esta diminuição da densidade de células satélites durante o envelhecimento também foi confirmada por outros investigadores (Marsh *et al*, 1998; Vignaud, *et al*, 2003).

### **1.7.1. Origem das células satélites**

Um estudo indicou que as células satélites se originam das células do somito, no mesoderma (Buckingham *et al* 2003). Essa hipótese é principalmente sustentada por estudos que utilizaram o transplante entre espécies desenvolvidos no modelo de aves. Os resultados demonstraram que estas células contribuíam tanto para o desenvolvimento do músculo, quanto para a população de células satélites. Porém

ainda não estava estabelecido se as células satélites migravam dos somitos como uma população distinta, ou se originavam de uma população pré-existente, durante o desenvolvimento (Hawke & Garry, 2001).

DeAngelis *et al* (1999) acreditaram poder existir células isoladas da aorta dorsal que possuíam a morfologia e a expressão de marcadores de linhagem miogênica e endotelial, similares ao das células satélites adultas. Além disso, o transplante dessas células para o músculo de animais neonatos revelou que elas são capazes de participar no crescimento e regeneração musculares. Dessa maneira, os autores acreditam que possam existir mais de uma fonte (somítica e não-somítica) para origem das células satélites.

### **1.7.2. Papel das células satélites no crescimento e regeneração do músculo**

As funções da célula satélite foram inicialmente descritas na década de 70. Moss & Leblond (1971) observaram que essas células apresentam íntima associação com crescimento pós-natal do músculo esquelético. Mais tarde, alguns trabalhos demonstraram o grande potencial miogênico dessas células em cultura e *in vivo*, desencadeada pelo processo regenerativo (Bischoff, 1970; Hill *et al*, 2003; Bischoff, 1990). Essa hipótese é reforçada por trabalhos que utilizaram a radiação gamma para bloquear a proliferação das células satélites, causando assim uma forte inibição da capacidade regenerativa do músculo (Rosenblatt, *et al*, 1994; Barton-Davies, *et al*, 1999). As células satélites possuem também um importante papel na adaptação muscular ao exercício, particularmente evidenciado pelos modelos de hipertrofia

muscular, onde se observa a adição de núcleos na fibra madura (Hawke & Garry, 2001).

### **1.7.3. Identificação e capacidade de autorenovação das células satélites**

Ainda que a identificação das células satélites possa ser facilmente realizada através da sua peculiar posição anatômica, em situações fisiológicas, essas células são ativadas, abandonam sua posição original, proliferam e migram para regiões de lesão (Anderson, 2006). Dessa forma, diversos trabalhos têm abordado a questão da identificação das células satélites, tanto quiescentes, quanto ativadas, e proposto marcadores que vão desde moléculas de superfície, como: CD34 (do inglês, *Cluster of differentiation*) M-caderina, Sidecan-3/4, c-met, NCAM; até fatores de transcrição de proteínas do citoesqueleto como: Desmina, Pax 7, MSX1, *Myf5* e *MyoD* (Grounds *et al*, 1992; Cornelison *et al*, 2001; Seale *et al*, 2000a; Beauchamp *et al*, 2000; Cornelison & Wold, 1997)

Alguns desses marcadores têm sido relacionados com a capacidade de autorenovação das células satélites. Ainda que o músculo seja submetido a diversos ciclos de regeneração, a quantidade de células satélites se mantém relativamente constante, sugerindo que essas células fazem uma divisão assimétrica (Beauchamp *et al*, 1999). Assim, um papel importante nesse processo tem sido proposto para o fator *Myf5* e para a proteína de membrana CD34. A presença de CD34 está também relacionada a uma subpopulação de células satélites quiescentes. No entanto, durante a ativação e diferenciação dessas células ocorrem mudanças na expressão dessa proteína. Foi observado também que em culturas de mioblastos induzidos para diferenciação, células

CD34<sup>+</sup> não fusionam e não expressam *MyoD*. Quando se comparou a expressão de CD34 em um animal *Myf5/LacZ*, foi demonstrada uma co-localização sugerindo então a existência de uma população quiescente, expressando CD34/*Myf5*, porém comprometida com a linhagem muscular (Beauchamp *et al*, 2000). Jankowski *et al* (2002) demonstraram que as células derivadas de músculo, que expressam CD34, são mais eficientes na regeneração e na expressão de distrofina quando transplantadas em um camundongo mdx.

A análise das células deficientes em *MyoD* e que expressam níveis aumentados de *Myf5* reforçam o papel desse fator nesse processo de manutenção das células quiescentes. Alguns trabalhos demonstraram que essas células estão em maior número no músculo esquelético adulto, porém possuem uma deficiência na diferenciação em cultura e expressam níveis aumentados de IGF-I (do inglês *insulin-like growth factor*) e do marcador de ciclo celular p21 (Beauchamp *et al*, 2000).

#### **1.7.4. Ativação das células satélites durante a regeneração muscular**

A ativação e proliferação das células satélites é um evento importante no processo de regeneração muscular. Isso é sustentado pela observação de que as metodologias que impedem essa etapa reduzem drasticamente a capacidade regenerativa do músculo (Zammit *et al*, 2001; Robertson *et al*, 1992; Yan *et al*, 2003).

No curso da regeneração muscular, as células satélites exibem um estado quiescente, passando depois de ativadas para um período de proliferação, seguido da diferenciação e fusão para formar novas fibras musculares ou regenerar as fibras lesionadas (Zammit *et al*, 2001). Durante essas fases, as células satélites quiescentes

são renovadas, demonstrando que elas possuem uma capacidade de auto-renovação e que esse processo é remanescente do período embrionário (Hill *et al*, 2003; Yan *et al*, 2003.). Essa fase inicial da regeneração muscular é também acompanhada pela infiltração de células inflamatórias no sítio de lesão a qual parece ter um papel fundamental para ativação, proliferação e diferenciação das células precursoras de músculo (Chazaud *et al* 2003; Robertson *et al*, 1992). Entretanto, ressaltando o que foi dito anteriormente, apesar do músculo possuir células capazes de repará-lo, tal como as células satélites, em caso de lesões severas ou sucessivas, um quadro de recuperação funcional incompleta e fibrose é instalado. Sendo assim, a terapia celular e a medicina regenerativa surgem oferecendo esperança a tais desordens.

### **1.8. Terapia celular e medicina regenerativa**

Relatos históricos descrevem a medicina regenerativa há muito mais tempo que o excitante cenário atual da terapia com células-tronco. Reconstrução de extremidades como nariz, orelhas têm sido realizadas a milhares de anos na Índia. Atualmente, transplantes autólogos são praticados com propostas variadas, tal como o reparo de queimaduras graves de pele, lesões ósseas dentre outros (Gardner, 2007).

Medicina regenerativa é um campo profissional multidisciplinar que envolve biologia, medicina e engenharia entre outros. Biomateriais são desenvolvidos para promover a organização, o crescimento e diferenciação das células para formar um novo tecido. Agentes biológicos são necessários para otimizar a proliferação e diferenciação celular e inclui: fatores de crescimento, citocinas, hormônios dentre

outros. Porém, o ponto chave desta multidisciplinaridade é a disponibilidade de células necessárias para terapia.

O princípio básico da medicina regenerativa é restaurar a homeostase de órgãos e tecidos lesados. Em outras palavras, obter suficiente quantidade de um tipo específico celular para restabelecer a condição fisiológica normal de uma área lesada por uma injúria física, química, isquêmica ou por consequência de desordens genéticas ou infecciosas. Sua crescente importância vem das evidências que a capacidade regenerativa de muitos dos tecidos adultos é limitada. Mesmo quando a lesão induz uma grande proliferação celular, as novas células freqüentemente falham em diferenciar de uma forma adequada para repor as que foram perdidas (Gardner , 2007).

### **1.9. Células -Tronco: conceito**

A célula-tronco é uma célula indiferenciada (sem especialização funcional e marcadores de diferenciação tecido-específicos), com capacidade de proliferação, auto-renovação, e plasticidade (capacidade de se diferenciar em vários tecidos distintos) (Loeffler *et al*, 1997). A sua taxa de proliferação é baixa, porém altamente clonogênica (Alison *et al*. 2002).

As células-tronco possuem diferentes estágios de comprometimento celular, ou seja, algumas são completamente indiferenciadas e outras já têm algum grau de diferenciação. As células-tronco mais primitivas são o oócito fertilizado (zigoto) e as descendentes das duas primeiras divisões mitóticas. Estas células são consideradas totipotentes, pois são capazes de gerar um embrião e o trofoblasto da placenta. Após quatro dias, estas células totipotentes começam a se especializar formando uma massa

de células esférica chamada de blastocisto, que por sua vez contém a massa celular interna (MCI), da qual o embrião se desenvolve.

A MCI do blastocisto é formada por células-tronco embrionárias (ES), que se diferenciam em células provenientes dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). Porém, estas células não são capazes de originar a placenta e os tecidos que sustentam a gestação. Desta forma, as células ES são um exemplo de células-tronco pluripotentes.

A maioria dos tecidos possui células-tronco multipotentes, ou seja, capazes de produzir uma limitada variedade de linhagens celulares diferenciadas de acordo com a sua localização (Alison *et al.* 2002).

Por último, na hierarquia das células-tronco temos as chamadas células unipotentes (ou progenitoras comprometidas), capazes de originar um único tipo celular específico (ex: células-tronco constituintes da camada basal da epiderme, que originam somente as células escamosas queratinizadas da pele). Estas células progenitoras comprometidas originam células com capacidade de auto-renovação limitada, baixa clonogenicidade e rápida taxa de proliferação. A seguir, estas células se dividem originando células terminalmente diferenciadas, que perdem a sua capacidade de proliferação e mais tarde evoluem para um processo de morte celular programada (Alison *et al.* 2002).

### **1.9.1. Células tronco musculares**

Desde a sua descoberta na década de 60 até o final dos anos 90, as células satélites eram consideradas precursoras miogênicas, quiescentes e com capacidade

limitada de autorenovação, possuindo diversas funções na fisiologia muscular (Hawke & Garry, 2001). Porém, trabalhos mais recentes demonstraram que o músculo esquelético possui células capazes de dar origem a outras linhagens, sugerindo a existência de progenitores multipotentes presentes nesse tecido, além de diferenciar-se em músculo esquelético (Gussoni *et al*, 1999; Asakura *et al*, 2002; Qu-Petersen *et al*, 2002). Entretanto, a real identidade dessa célula, bem como sua localização, não foram até agora identificados. Inicialmente, a interpretação desses dados sugeria duas hipóteses: que a população de células satélites é heterogênea, no sentido de que possuem a mesma localização anatômica, porém respondem diferentemente durante a regeneração (Qu-Petersen *et al*, 2002; Beuchamp *et al*, 1999). Neste caso, determinado grupo de células possui uma capacidade multipotente, é capaz de gerar uma célula progenitora muscular, além de servir para a manutenção da quantidade de células satélites. A outra hipótese, sugere que existem, além das células satélites, outros tipos celulares, em nichos diferentes no tecido muscular, mas capazes de se diferenciar em várias linhagens diferentes, incluindo células satélites e musculares (Seale *et al*, 2000; Asakura *et al*, 2002).

Diversos trabalhos foram publicados com células derivadas de músculo, associados a marcadores genéticos, e demonstraram que estas células foram capazes de reconstituir a medula óssea de camundongos irradiados (Jakson & Goodell, 1999; Cao, *et al* 2003), de se diferenciarem em miofibroblastos (Li & Huard, 2002) e células endoteliais (Tamaki *et al*, 2002; Majka *et al* 2003). Além disso, Gussoni *et al* (1999) conseguiram, utilizando a citometria de fluxo (FACS; do inglês, *Flow Cytometer Cell Sorting*) e o corante Hoeschst 33342, isolar uma subpopulação de células do músculo esquelético (SP) que expressa marcadores de células-tronco como Sca1/c-Kit. Ao

injetar em um camundongo mdx irradiado, os autores demonstraram que as SP possuem alta capacidade miogênica, além de induzir um aumento na expressão de distrofina. Asakura *et al*, (2002) mostraram que as SP têm grande capacidade de hematopoiese, mas não é capaz de se diferenciar em músculo *in vitro*. Porém, quando transplantadas em músculo esquelético, geram tanto miócitos quanto células satélites. Uma outra população derivada de músculo, positiva para as proteínas de membrana CD34 e Sca1, quando injetadas na circulação periférica de camundongo mdx, foram capazes de migrar para o músculo e aumentar a expressão de distrofina (Torrente *et al*, 2001).

Através do isolamento por digestão enzimática e mecânica do músculo, e não por citometria de fluxo, Beuchamp *et al* (1999), observaram que apenas uma pequena população de células sobrevive após o transplante em animais mdx irradiados e é responsável pela regeneração muscular. No entanto, as metodologias aplicadas não esclarecem a real localização dessa população, apesar de identificar, pelo menos em parte, alguns marcadores para essas células progenitoras do músculo. Na tentativa de esclarecer esses pontos, Seale *et al* (2000) publicaram um trabalho caracterizando o papel do fator transcricional Pax7 na especificação da linhagem das células satélites. Eles mostraram que o animal deficiente para esse fator não possuía células satélites, tinham o crescimento muscular pós-natal comprometido e morriam em aproximadamente duas semanas por insuficiência respiratória. Esses resultados sugerem claramente que as células satélites e, as chamadas células-tronco derivadas de músculo são populações diferentes e possuem uma localização anatômica também diferenciada (Seale *et al*, 2000).

Em contrapartida, Wada *et al* (2002) utilizaram um sistema de cultura que permite o isolamento de uma fibra muscular e posteriormente de uma célula satélite. Eles observaram que essa célula co-expressa diferentes genes de determinação para a linhagem muscular (*MyoD*) e para a linhagem osteogênica (*Runx2*). Isso sugere que pode existir algum grau de pluripotência dentro da população de células satélites, além de outros tipos celulares presentes no músculo com essa mesma capacidade, como demonstrado anteriormente. Porém estudos *in vivo* são necessários para a comprovação desses achados.

Um outro grupo de pesquisadores, ainda na busca de identificar as populações de células-tronco do músculo esquelético, descreveram uma metodologia de pré-plaqueamento de células derivadas de músculo baseado no tempo de adesão (Lee *et al*, 2000). Os autores mostraram que esse protocolo é capaz de isolar células com capacidade miogênica, melhorando a regeneração muscular e expressão de distrofina no camundongo mdx. Essas células ainda possuem a capacidade osteogênica quando induzidas a expressar BMP-2 e são similares a uma população específica de células previamente identificadas por FACS (Gussoni *et al* 1999; Seale *et al* 2000). Eles observaram ainda, por imunohistoquímica, que diversos marcadores destas células em cultura eram encontrados na região da lâmina basal, o que levou a conclusão que as células isoladas poderiam ser uma população específica localizada na região das células satélites.

O confronto desses achados nos leva a concluir que, até o momento, existe a evidência de que o músculo esquelético possui além das células satélites, outras populações de células com capacidade multipotente. Entretanto, a real identidade dessas células, sua relação com a regeneração muscular e sua precisa localização no

tecido muscular, ainda não estão esclarecidas. Todos esse itens fazem com que essas células não sejam as candidatas ideais para a terapia celular. Assim, outras fontes de células vem sendo investigadas.

### **1.9.2. Células mesenquimais multipotentes (MSC)**

Durante o desenvolvimento, o mesoderma se divide em paraxial, intermediário e lateral. A progressão no processo de diferenciação desse folheto embrionário forma os tecidos que darão o suporte estrutural ao corpo. Tais estruturas incluem o tecido conjuntivo fibroso, o estroma, cápsulas de órgãos, cartilagem, ossos, músculo esquelético, músculo liso, coração, vasos linfáticos e sanguíneos, tecido hematopoiético, cápsula dos rins, dentre outros (Patten, 1971; Moore & Persaud, 1993). Dentro desses tecidos há uma população de células progenitoras comprometidas com o seu tecido em particular, responsável pela sua manutenção, sendo assim, consideradas unipotentes. Evidências de uma população de células na medula óssea com capacidade de diferenciação mesodermica multipotente, foi demonstrada primeiramente por Friedenstein *et al* (1976 e 1978). Contudo, Young *et al* (1993 e 1995), propuseram que tais células com potencial de gerar esse fenótipo estão localizadas nos tecidos conjuntivos associados a vários órgãos e tecidos. Recentemente, foram denominadas “Células mesenquimais estromais multipotentes” (MSC) (Horwitz *et al*, 2005), e são caracterizadas de acordo com a sua capacidade de aderência ao plástico, potencial multipotente para expressar características específicas de células de linhagens de tecido conjuntivo, e expressão de antígenos de superfície

específica. As células mesenquimais de medula óssea vêm sendo amplamente utilizadas na terapia de doenças cardiovasculares (Olivares et al, 2004).

#### **1.10. Células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AT-MSc)**

O tecido adiposo é a associação de adipócitos maduros a uma trama de fibras colágenas e tem a capacidade de se expandir e diminuir dinamicamente durante toda a vida adulta. Juntamente a esses adipócitos, há uma população heterogênea de células do estroma vascular, onde encontramos células precursoras de adipócito em vários estágios de diferenciação, células endoteliais, células musculares lisas, pericitos e células mesenquimais (Zuk *et al*, 2001).

Células mesenquimais de tecido adiposo com características de fibroblasto são morfologicamente similares as mesenquimais obtidas de outros tecidos de mesma origem embrionária, como medula óssea, periósteo, membrana sinovial etc, (Yoshimura *et al*, 2006). Juntamente a isso, alguns trabalhos demonstraram que essas células possuem a capacidade extensa de auto-renovação, manutenção do cariótipo diplóide, e de se diferenciar em células de origem mesodérmica *in vitro* sob condições apropriadas como: adipócitos, condrócitos, osteócitos e mioblastos (Zuk *et al*, 2002; Rodriguez *et al*, 2005).

Indo além, há algumas vantagens dignas de observação comparando as duas fontes celulares, a medula óssea e o tecido adiposo. A morbidez gerada pela extração de células da medula limita a quantidade que pode ser retirada, o que aumenta o tempo de cultura necessário para gerar uma quantidade de nível terapêutico. Assim, a retirada do volume de sangue da medula óssea sob anestesia local e geralmente limitada, não

ultrapassando muito mais do que 60 mililitros (Strem *et al*, 2005). O grande benefício das AT-MSCs é poder ser retirado com um simples método pouco invasivo e sua oferta abundante, passando facilmente de 200 mililitros em um procedimento cirúrgico, o que forneceria aproximadamente 40 vezes mais células do que o volume médio de sangue retirado da medula óssea (Strem *et al*, 2005). Além disso, a população de AT-MSCs em cultura pode se expandir rapidamente em comparação as BM-MSCs, e mesmo após muitas passagens, elas mantêm sua capacidade multipotente ( Nakagami *et al*, 2006).

Atualmente, há uma inconsistência na literatura quando são usados termos para descrever as células precursoras multipotentes do estroma adiposo, como lipoaspirado processado, células estromais derivadas do tecido adiposo, preadipócitos entre outros. O termo fração do estroma vascular (SVF), muito usado hoje, descreve as células que são obtidas imediatamente após a digestão do tecido adiposo por colagenase (Zuk *et al*, 2001; Bacou *et al*, 2004), enquanto as células mesenquimais constituem a fração aderente da SVF.

Alguns grupos conseguiram mostrar a partir de resultados de citometria de fluxo que as células progenitoras derivadas do tecido adiposo mudam o seu fenótipo no decorrer da aderência e das passagens em cultura. A proteína CD34, classicamente descrita como marcadora de progenitoras hematopoiéticas é largamente expressa nas SVF. Entretanto, após plaqueamento e primeiras passagens em cultura, poucas células mesenquimais ainda expressam CD34. Já os marcadores associados a células do estroma parecem aumentar sua expressão com o plaqueamento e no decorrer das passagens (Rodriguez *et al*, 2005; Mitchell *et al*, 2006; Wall *et al*, 2007). Portanto, a população aderente das SVF parece ser purificada através do procedimento de cultura,

muito embora não podemos excluir a hipótese de que as condições de cultura possam modular a expressão de proteínas de superfície de membrana.

### **1.10.1. Caracterização das AT-MSCs**

Embora as células mesenquimais de medula óssea já tenham sido fenotipicamente descritas, a caracterização das AT-MSCs ainda está em processo. Entretanto, a sociedade internacional de terapia celular propôs, recentemente, que o critério mínimo para definir uma célula mesenquimal seria:

- 1- A capacidade de aderir a garrafas de cultura sob condições padrão;
- 2- Capacidade de se diferenciar em adipócito, osteócito e condrócito;
- 3- Expressar as proteínas de membrana associadas a células estromais como CD73, CD90 e CD105;
- 4- Não expressar proteínas de membrana características de linhagem hematopóéticas como c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 $\alpha$  e HLA-DR.

A ausência da expressão do HLA-DR e as propriedades imunomodulatórias já descritas (Aust *et al*, 2004; Yañez *et al*, 2006) tornam essas células boas candidatas para procedimentos de transplantes alogênicos, diminuindo o risco de rejeição. Cui *et al* (2007) evidenciaram que AT-MSCs não provocam ativação de aloreatividade de linfócitos *in vitro*, e são capazes de suprimir uma proliferação linfocitária. Essa reação se mostra independente de contato célula a célula e parecer ser mediado por secreção prostaglandina E2. Esses achados dão suporte a idéia que as AT-MSCs compartilham

as propriedades imunomodulatórias com as BM-MSCs e, portanto, podem se tornar uma fonte alternativa de células para medicina regenerativa.

A imunofenotipagem das AT-MSCs é bem similar a BM-MSCs. Vale ressaltar algumas similaridades chave entre essas células. Por exemplo, CD105, Stro-1 e CD166 são três marcadores comuns usados para identificar linhagens multipotentes e são consistentemente expressos nessas células (Simmons *et al*, 1994; Barry *et al*, 1999). O CD117 (receptor do SCF, do inglês *stem cell factor*), que é expresso em células totipotentes e pluripotentes, também é visto em ambas as fontes de células mesenquimais. Junto com esses marcadores, as AT-MSCs exibem inúmeros outros marcadores similares aos da medula óssea incluindo o CD29 ( $\beta$ -1 integrina, que tem importante função na angiogênese), CD44 (receptor de hialuronato, o qual é crucial no desenvolvimento de matriz extracelular em condições normais e patológicas), CD49e (alfa-5 integrina, importante para adesão celular a fibronectina) (Aye *et al*, 1992; Ogawa *et al*, 1993; De Ugarte *et al*, 2003; Li *et al*, 2005 ).

AT-MSCs, como as BM-MSCs, não expressam marcadores hematopoiéticos e endoteliais tais como CD3, CD4, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31, CD33, CD38, CD56, CD104, CD144.

### **1.10.2. Diferenciação em linhagens mesodérmicas**

Como dito anteriormente, uma importante característica das MSCs é a capacidade de diferenciação multipotencial. As MSCs são capazes de adquirir características de células derivadas de todo o mesoderma, tal como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos entre outros.

### 1.10.3. Diferenciação Adipogênica

Dada a origem da AT-MSCs, não é surpresa que, em meio de cultura apropriado, essas células se diferenciem em adipócitos. Alguns grupos de pesquisadores confirmaram a diferenciação pela expressão de proteínas encontradas em adipócitos como Leptina, Lipoproteína lipase e GLUT 4, juntamente com formação de vacúolos celulares de lipídeo. A expressão dessas proteínas parece estar relacionada ao nível de diferenciação das células sendo visto em menor nível em células que ainda estão com morfologia de fibroblasto (Zuk *et al*, 2001 e 2002; Sakaguchi *et al*, 2005; Yoshimura *et al*, 2006). A diferenciação adipogênica também foi confirmada pela expressão de fatores de transcrição específicos de adipócitos como PPAR $\gamma$ 2 e dos genes aP2 e PPAR $\gamma$ 1. No entanto, tais transcritos estão sendo expressos independentes do meio de cultura (adipogênico ou não), mas o aumento da expressão dos genes se mostrou relacionada ao meio de diferenciação (Zuk *et al*, 2002).

A capacidade dessas células de se diferenciarem *in vivo* também tem sido demonstrada em cirurgias estéticas e de correção, como na reconstrução de mama, lábios e outras partes do corpo. Patrick *et al* (1999) demonstraram que o uso de adipócitos maduros nesse processo de reparo não representa uma boa alternativa, porque a exposição dos adipócitos a forças mecânicas e liposucção resulta na ruptura de mais de 90% dos adipócito reforçando o uso das AT-MSCs. A respeito das células mesenquimais, é importante saber que os estudos realizados atualmente demonstram que o processo de diferenciação *in vivo* de uma forma mais robusta, necessita da utilização de hormônios e fatores de crescimento. Yuksel *et al* (2000) evidenciaram a

adipogênese dessas células no local em que foram implantadas microesferas biodegradáveis contendo insulina e IGF-1 separadamente, e ambos em outro grupo. Um outro estudo demonstrou fatos similares, onde a capacidade de diferenciação e adesão a biomateriais injetados *in situ* é acrescida quando adicionado o fator de crescimento bFGF (Neubauer *et al*, 2005).

#### **1.10.4. Diferenciação osteogênica**

A capacidade das células mesenquimais em derivar osteoblastos já é bem conhecida (Nuttal *et al*, 1998). Semelhante ao que já foi visto em células mesenquimais de medula óssea, as AT-MSCs se mostraram capazes de expressar genes e proteínas associados ao fenótipo de osteoblasto, incluindo fosfatase alcalina, colágeno tipo 1, osteopoetina, osteonectina, osteocalcina, RunX-1, BMP-2, BMP-4 (Zuk *et al*, 2002). Durante toda nossa vida, os tecidos ósseos tem a capacidade de adaptar sua forma, sua massa e sua arquitetura trabecular para suportar cargas mecânicas. Isso faz com que as células ósseas sejam responsivas a esse estresse, gerando uma sinalização em resposta a diferentes formas de cargas mecânicas. Knippenberg *et al* (2005) confirmaram que as AT-MSCs, adquirem responsividade a estresse mecânico durante o processo de diferenciação osteogênica. Juntamente a esse fato, a associação de fatores de crescimento como o GDF-5 no processo de diferenciação osteogênica comprovou a expressão do fator de crescimento VEGF, o que deu suporte a idéia que o processo de restauração tecidual seria supostamente realizado por uma ação conjunta da melhora da vascularização, dando base aos mecanismos de reparo endógenos (Zeng *et al*, 2006).

### **1.10.5. Diferenciação condrogênica**

A função da cartilagem nos seres humanos é cobrir as superfícies articulares, permitindo o movimento de forma suave, e livrando os ossos de cargas excessivas. Apesar da sua eficiência, fatores como idade e movimentos repetitivos podem levar a uma lesão dessa estrutura que tem pouca capacidade de regeneração (O'Driscoll *et al*, 1998). Em 1998, distintos grupos de pesquisadores constataram que BM-MSCs tinham capacidade de se diferenciar em condrócitos (Johnstone *et al*, 1998; Mackay *et al*, 1998). Esses trabalhos ratificaram o que havia sido visto em 1994, quando Wakitani *et al* observaram que essas mesmas células tinham gerado reparo em cartilagens articulares. Zuk *et al* (2001) confirmaram pela primeira vez que as AT-MSCs também tinham capacidade de se diferenciar em condrócitos. Esse fato foi confirmado em estudos posteriores que notaram a formação de nódulos com presença de proteoglicanos na matriz e a expressão de genes consistentes com a condrogênese, como a expressão de aggrecan e colágeno tipo II (Zuk *et al*, 2002; Gimple, 2003).

### **1.10.6. Potencial miogênico das AT-MSCs**

Como já confirmado em culturas de BM-MSCs, a presença de dexametasona, hidrocortisona e/ou 5 azacitidina no meio de cultura das AT-MSCs resulta em um padrão temporal de expressão de genes consistente com a miogênese, o que foi definido pela expressão de myoD, myf5 e miogenina nos primeiros momentos, seguido pela expressão de desmina e cadeia pesada de miosina (Wakitani *et al*, 1995; Mizuno *et al*, 2002; Zuk *et al*, 2002). Esse processo foi associado a mudanças características

na morfologia celular, incluindo a geração de células alongadas, multinucleadas e expressando myoD e após duas semanas a formação de bandas celulares formadas por proteínas miofibrilares.

Di Rocco *et al*, (2006) em elegante estudo, demonstraram que as AT-MSCs adquiriram fenótipo de mioblasto e passaram a expressar marcadores miogênicos em co-cultura com células C2C12 independente do contato. No entanto, o processo de diferenciação é intensificado quando há o contato célula-célula (Di Rocco *et al*, 2006). Não obstante, foi observado que AT-MSCs de origem humana teriam a capacidade de se incorporar a células C2C12 em co-cultura, e seus núcleos adquiriram a capacidade de reprogramação, expressando proteínas específicas de músculo humano (Lee & Kemp, 2006).

Em modelos animais, Rodriguez *et al* (2005) foram os primeiros a descrever o potencial das AT-MSCs humanas em se diferenciar em células com fenótipo miogênico, e expressar distrofina em camundongos mdx. Di Rocco *et al* (2006) deram suporte a essas afirmações além de mostrar sua capacidade de regenerar músculos após indução de isquemia de membro inferior. Porém, os achados *in vitro* sugerem que as células podem gerar músculo independente do mecanismo de fusão. Bacou *et al* (2004) realizaram um estudo onde demonstram que o transplante autólogo de células tronco de tecido adiposo contribuiu para o aumento da secção transversa e do peso de músculos lesionados além de aumentar a produção de força com relação ao não tratado. Todavia, foram usados células que permaneceram três ou sete dias em cultura. Como dito anteriormente, nesse momento as células ainda estão numa distribuição fenotípica muito heterogênea, com um percentual grande de células CD34+, o que poderia caracterizar progenitores hematopoiéticas/endoteliais. Além disso, tal trabalho

só encontrou resultados positivos com células em três dias de cultura, e não em sete. Portanto, a contribuição real das AT-MSCs ficou por ser respondida.

Dados epidemiológicos destacam a alta incidência das lesões musculares (Carlson *et al*, 1983; Taylor *et al*, 1993; Kasemkijwattana *et al*, 1998; Menetrey *et al*, 1999; Jarvinen *et al*, 2000). Além disso, a descoberta de uma estreita ligação entre as células mesenquimais derivadas de medula óssea e a regeneração muscular, a descoberta dessa subpopulação celular em diversos tecidos, abrem novos caminhos para o estudo de alternativas terapêuticas para as lesões musculares. Juntando a esses fatos, as similaridades encontradas nas AT-MSCs em relação a imunofenotipagem e a capacidade de expressar marcadores de diferenciação tal como as BM-MSCs, e as vantagens oferecidas como a diminuição da mordidez para extração das células por ser um método menos invasivo, grande oferta e a rápida expansão em cultura, faz das AT-MSCs fortes candidatas a terapia celular.

### **1.11.Objetivos**

#### **1.12.Objetivo geral:**

- Estudar o papel do tratamento de lesões musculares com células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (AT-MSCs).

#### **1.13.Objetivos específicos:**

- Estabelecer um modelo de lesões por laceração no músculo esquelético;
- Avaliar a evolução da lesão através da análise da função muscular e histopatológica;
- Investigar o potencial regenerativo das AT-MSCs na regeneração e contratilidade musculares no modelo de lesão por laceração em ratos Wistar.

## **2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

Ao longo de todo o experimento, foram usados 10 ratos machos para obtenção das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e 34 fêmeas, contabilizando 44 ratos. Ratos singênicos Wistar (Fêmeas - 12 a 15 semanas de idade; 180 a 210 gramas de peso; Machos – 12 a 15 semanas de idade; 200 a 250 gramas) foram fornecidos pelo Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – (Rio de Janeiro). Os animais foram mantidos em temperatura controlada e expostos a ciclos claro/escuro de 12 horas cada com ração e água *ad libitum*.

Os animais machos foram utilizados para o isolamento das AT-MSCs e as fêmeas para o modelo de lesão muscular esquelética experimental. Todos dos procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética para uso de animais experimentais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

### **2.2. Modelo experimental de lesão muscular esquelética por laceração**

Ratos Wistar fêmeas singênicos foram anestesiados através da injeção intraperitoneal de Ketamina (50mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg) e colocados em uma pequena mesa cirúrgica em decúbito ventral com a pata posterior direita fixada. Logo após a tricotomia da pata e realização da assepsia da região, foi realizada uma pequena incisão com bisturi na pele permitindo a visualização do limite anatômico dos músculos gastrocnêmio e fibular, unidos por uma fascia caracterizada por uma linha longitudinal esbranquiçada na região lateral. Com bisturi, divulsionamos o músculo

gastrocnêmio ao longo da fascia, o separando dos demais músculos e acessando, assim, o músculo *soleus*, logo abaixo, facilmente reconhecido por sua morfologia singular e seu tendão de origem proeminente (figura 1-B).

Após a sua identificação, o *soleus* foi divulsionado, proporcionando o livre acesso a sua região anterior e posterior. A lesão foi provocada por uma tesoura cirúrgica oftálmica (figura 1-C) na região de maior diâmetro do ventre muscular, causando uma laceração em cinquenta por cento do seu diâmetro e cem por cento de sua espessura (figura 1-D). O músculo *soleus* de rato foi escolhido pelo nosso grupo por apresentar grande vantagem perante outros músculos esqueléticos para esse tipo de investigação porque os arranjos de suas fibras musculares são praticamente paralelos longitudinalmente e se estendem por mais do que cinquenta por cento do seu comprimento. Portanto, uma secção no seu ventre muscular abrange todas as suas fibras (Chamberlain & Lewis, 1989). Após cada procedimento cirúrgico, a incisão era rapidamente suturada com fio de seda 2.0 e limpa com álcool iodado. O músculo da pata contralateral não foi submetido ao procedimento cirúrgico e foi utilizado como controle não lesionado. Os valores de contratilidade muscular foram normalizados para a pata contralateral (ver item de estatística).

Após a cirurgia, os animais permaneciam em observação até recuperarem sua capacidade motora normal e, caso não houvesse complicações, eram conduzidos ao biotério onde eram mantidos com água e ração *ad libitum*. Não houve mortes por anestesia em nenhum dos grupos.

## Modelo de Lesão Muscular (Laceração)



- 50% da secção transversa
- 100% da espessura



Figura 2 – Ilustração do modelo de lesão muscular por laceração. A figura A mostra uma imagem geral da exposição do músculo *soleus*. Figura B, em detalhe, o músculo *soleus* divulsionado. Figura C, o posicionamento da lâmina no momento do corte. Figura D, esquema representativo do local da lesão no *soleus* de fêmeas.

### 2.3. Isolamento e cultura das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AT-MSCs)

Ratos machos Wistar singênicos foram anestesiados com isoflurano e submetidos a deslocamento cervical. Cerca de dois gramas de tecido adiposo foi extraído da região

inguinal e colocado em PBS<sup>®</sup> ( 2,8 Mm KCl, 1,47 Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136,89 Mm, 8,1 Mm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) para posterior fracionamento.

### **2.3.1. Fracionamento**

Sob condições estéreis, com auxílio de pinças e tesouras, o tecido é cortado em pequenos pedaços e colocados em um tubo para a digestão enzimática em solução com 0,1% colagenase Tipo II (Worthington-Massachusetts-EUA) em PBS por 45 minutos à 37°C sob agitação gentil. Após o tempo de digestão, acrescenta-se volume igual de meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Dulbecco's modified eagle médium, Life Technologies<sup>®</sup>, Grand Island, NY, EUA). Este material é centrifugado a 200 x g por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o restante da amostra é filtrada em uma rede de nylon de 80mm para a retirada da camada de gordura (adipócitos maduros) e debris do tecido não digeridos. Após a filtragem, as células centrifugadas foram ressuspendidas em DMEM e centrifugadas a 200 x g por 10 minutos. O sobrenadante é novamente descartado e o sedimentado formado é ressuspenso em meio DMEM 20% SFB suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma<sup>®</sup> St.Louis - EUA) e antibióticos (penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 mg/mL) (Sigma<sup>®</sup> - St.Louis - EUA). As células foram, então, plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em frascos de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon<sup>®</sup> 3847, Becton Dickson and Company, Lincoln Park, NJ, EUA) e mantidas à 37°C em estufa (Thermo Forma<sup>®</sup>) com atmosfera úmida em presença de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após quarenta e oito horas de incubação, as células não aderentes foram descartadas, as células aderentes foram lavadas duas vezes com BSS<sup>®</sup> e o meio de cultura foi trocado. As células aderentes eram lavadas e o meio de cultura era trocado de três em três dias. Quando alcançaram 70-80% de confluência (Figura 2A), as células foram removidas dos frascos através da adição de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma<sup>®</sup> - St.Louis - EUA), por no máximo 3 minutos. A atividade da tripsina sobre as células foi reduzida pela adição de DMEM com soro. As células foram centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente e o sedimento de células foi mais uma vez plaqueado em duas garrafas diferentes. Esse procedimento foi repetido por duas vezes para a expansão da população das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo com o objetivo de purificá-las e ter um número suficiente de células para a terapia ( $10^6$  células). O acompanhamento da cultura celular foi realizado através de análises em microscópio óptico (AXIOVERT 100 Carl ZEISS, West Germany, Alemanha).

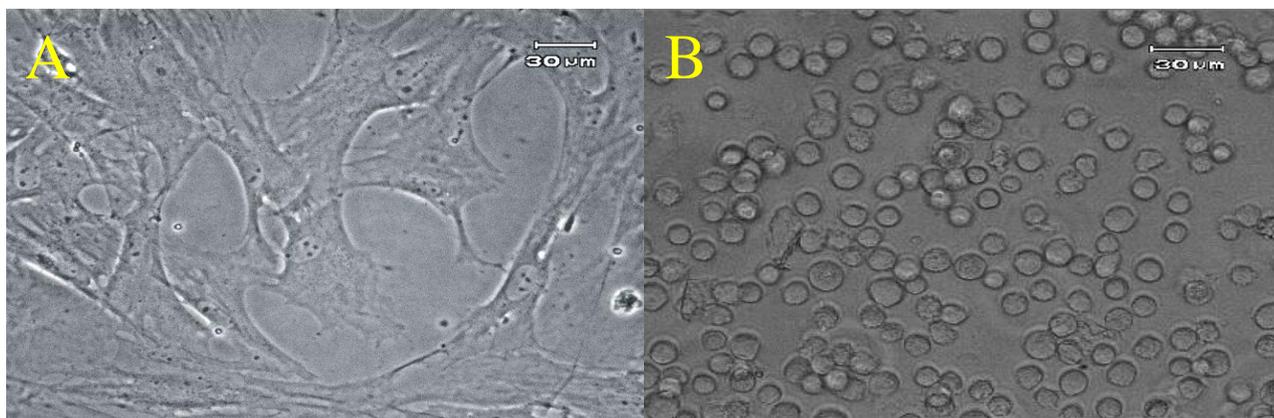


Figura 3 – AT-MSCs com aproximadamente 70%-80% de confluência com morfologia similar a fibroblastos (A) e após o processo de tripsinização, com formato esférico (B).

### 2.3.2. Contagem de células e viabilidade

Uma alíquota de 10  $\mu$ L de suspensão de células foi retirada, incubada com 10  $\mu$ L de solução de azul de Tripán (Sigma<sup>®</sup>, EUA) a 0,4% diluído em tampão fosfato e colocada na câmara de Neubauer (Hausser Scientific – Horsham - EUA). O número de células redondas, brilhantes e que não incorporaram o azul de tripan foi contado nos quatro quadrantes da câmara. O número total de células por mL foi calculado através da multiplicação da média dos quatro quadrantes pelo fator de diluição (vezes 2 -10  $\mu$ L de solução de azul de tripan) e pelo volume total das células. As células que incorporaram o azul de tripan foram consideradas mortas e contadas também. Observamos que mais de 95% das células estavam viáveis.

### 2.4. Injeção das células

Uma semana após a indução da lesão muscular esquelética, as patas lesionadas foram submetidas novamente ao acesso cirúrgico do *soleus* (como descrito na figura 1) para injeção de células. As AT-MSCs foram retiradas dos frascos de cultura por tripsinização (ver figura 2), contadas e testadas para viabilidade, ressuspendidas em solução de PBS e matrigel (3:1, *Collaborative Biomedical Products*). Foram injetadas 1-2x 10<sup>6</sup> de AT-MSCs, em 30  $\mu$ L de solução, diretamente na região do ventre muscular em regeneração (n=14). Após o procedimento cirúrgico a incisão era rapidamente suturada e limpa. Nos animais controle foi injetado uma solução contendo apenas 30 $\mu$ L PBS e matrigel (n=14).

## 2.5 Registro de tensão isométrica em músculo esquelético

As análises funcionais dos músculos isolados foram realizadas 14 e 28 dias após o tratamento com células. Para tal, os animais foram anestesiados com isoflurano e logo sacrificados por deslocamento cervical, e o músculo *soleus* foi dissecado em uma cuba horizontal contendo solução Ringer (116,8mM NaCl; 25mM NaHCO<sub>3</sub>; 5,9mM KCl; 1,2mM MgSO<sub>4</sub>; 1,25mM CaCl<sub>2</sub>; 5mM Glicose) à temperatura ambiente. O músculo foi colocado em uma cuba vertical com capacidade de 15 ml de solução, seu tendão distal foi fixado à haste fixa do eletrodo de estimulação e seu tendão proximal fixado à haste móvel ligada ao transdutor de força (®Grass FT03 - Rhode Island - EUA) para registro de abalos musculares (tensão isométrica). A solução da cuba foi continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> – White Martins - Brasil) e mantida à temperatura de 37 °C. O músculo foi estimulado eletricamente por meio de um estimulador (Grass S88) a uma frequência de 0,2 Hz. Após a estabilização dos abalos musculares ( $\pm$  20min) foi feito um registro em frequências de 1 e 50Hz para avaliação de contrações rápidas e do tétano, respectivamente. Para cada frequência de estimulação, media-se a variação da base e do pico de tensão desenvolvida, o que representa o máximo de tensão para aquela frequência. Os sinais captados pelo transdutor eram amplificados (Cyberamp – Molecular devices, EUA) e registro da tensão isométrica foi digitalizada (Digidata 1322 – Molecular devices, EUA) e armazenada no computador. A visualização e análise do experimento eram feitas no programa axoscope 11.0.

## **2.6. Amplificação do DNA por PCR em tempo real**

### **2.6.1. Extração de DNA de músculo**

Após o protocolo de tensão isométrica nos músculos, alguns destes foram congelados e armazenados em eppendorfs em um freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriormente passarem pelo processo de extração do seu conteúdo de DNA (n=20).

### **2.6.2. Extração através da proteinase K**

A extração de DNA que utiliza proteinase K-fenol é uma extração orgânica. A proteinase K, classificada como uma serina protease endolítica, cliva ligações peptídicas na porção carboxílica de resíduos de aminoácidos alifáticos, aromáticos e hidrofóbicos (Ebeling *et al*, 1974). Desse modo, para a extração de DNA (adaptada de Stefani *et al*, 2003), músculos congelados foram macerados por pistilo e os fragmentos resultantes foram colocados em um tubo eppendorf. Os fragmentos foram digeridos com  $300\ \mu\text{g}/\text{mL}$  de proteinase K<sup>®</sup> (Invitrogen – EUA) por 18 horas, a  $56\ ^{\circ}\text{C}$  em solução ( $600\ \mu\text{L}$ ) contendo Tris-HCl  $10\ \text{mM}$  (pH 7,4), NaCl  $150\ \text{mM}$ , SDS a 2% e EDTA  $10\ \text{mM}$  (pH 8,0). O DNA foi extraído do homogeneizado com igual volume ( $600\ \mu\text{L}$ ) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) seguido de centrifugação a  $12.000\ \times\ \text{g}$  por 15 minutos em temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação, uma fase aquosa (sobrenadante) é separada de uma fase orgânica (inferior). A fase aquosa, onde estão os ácidos nucleicos, foi coletada e o DNA foi precipitado com  $600\ \mu\text{L}$  de isopropanol centrifugando a  $14000\ \times\ \text{g}$  por 20 minutos

a TA e por fim o sedimentado de DNA foi lavado com 500ul de etanol 70%, centrifugando a 7500 x g por 8 minutos a TA. O precipitado de DNA foi secado a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de TE (5mM Tris-HCL, pH 7,4; 0,1mM EDTA).

O DNA resultante foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience) no comprimento de onda de 260 nm.

### **2.6.3 Desenho dos iniciadores (primers)**

Para tentar identificar células mesenquimais de macho, foram desenhados iniciadores para amplificar por PCR um fragmento de 115 pares de bases do gene SRY (sex determining region on Y), presente apenas no cromossomo Y. Como a presença de contaminantes como, heme, sal e fenol podem afetar a eficiência da reação de PCR, foi também amplificado um fragmento de 105 pares de bases do gene GAPDH, para confirmar a qualidade da amostra. As seqüências utilizadas estão na tabela 1. Os primers foram desenhados com auxílio do programa Primer 3 versão 0.4.0.

<b>Gene</b>	<b>Primer</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>	<b>Tamanho do fragmento amplificado</b>
<b>SRY</b>	<b>Senso</b>	<b>CGTGAAGTTGCCTCAACAAA</b>	<b>55</b>	<b>115bp</b>
	<b>Anti-senso</b>	<b>TCTGGTTCTTGGAGGACTGG</b>	<b>55</b>	
<b>GAPDH</b>	<b>Senso</b>	<b>ACATGCCGCCTGGAGAAA</b>	<b>55</b>	<b>105bp</b>
	<b>Anti-senso</b>	<b>AAGGGCAAAACCAAAGATGA</b>	<b>55</b>	

Tabela 1- Desenho das seqüências iniciadoras (Primers)

#### 2.6.4 PCR em tempo real – SYBR Green I®

O sistema de aquisição do PCR em tempo real utilizou um fluoróforo, intercalante de DNA dupla fita, denominado SYBR Green I (Applied Biosystems) cuja fluorescência é diretamente proporcional a formação do produto. As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 10  $\mu\text{L}$  de SYBR Green I Mastermix 2X (Applied Biosystems), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo (senso e antisenso) e 2  $\mu\text{L}$  de DNA da amostra processada (5 ng).

Para a amplificação utilizou-se uma máquina de PCR em tempo real da marca Applied Biosystems modelo 7000 que executou a seguinte programação: 95 °C por 10 minutos para a ativação da enzima Taq polimerase, seguida de 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15s, 55 °C por 75s).

A distinção entre os produtos de amplificação foi feita através da curva de dissociação. Por esta ser dependente do conteúdo de pares de base GC, do tamanho e da seqüência dos fragmentos amplificados, os produtos de amplificação específicos e inespecíficos foram discriminados. A  $T_m$  ou temperatura de fusão dos produtos gerados foi calculada através da curva de dissociação. Para este cálculo, a temperatura foi elevada gradativamente de 60 °C para 95 °C em 20 minutos, sendo a taxa de transição da temperatura equivalente a 0,3 °C por segundo. Após a obtenção das curvas de amplificação para cada amostra, a curva de dissociação foi executado através de um único ciclo como segue: 95 °C por 15 s, 60 °C por 20 s e 95 °C por 15 s (sendo que a elevação da temperatura de 60 °C para 95 °C foi realizada em 20 minutos).

Alguns produtos de PCR em Tempo Real foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0.5X (Tris 0,0445 M; Acido Bórico 0,0445 M e EDTA 0,001 M) e corado com brometo de etídeo (1 µg/ml).

#### **2.6.5. Integridade do DNA extraído**

Para garantir a integridade do DNA extraído, foi realizado previamente, um PCR em tempo real de um gene constitutivo das células de rato macho e fêmea, o GAPDH. Os resultados mostram que houve a amplificação do produto extraído de todos os músculos evidenciando a viabilidade do DNA extraído (figura 3). Para avaliarmos a especificidade das seqüências iniciadoras, confirmamos que todos os produtos amplificados eram realmente produtos de PCR e não formação de dímeros de *primer*, pela realização da curva de dissociação (figura 4).

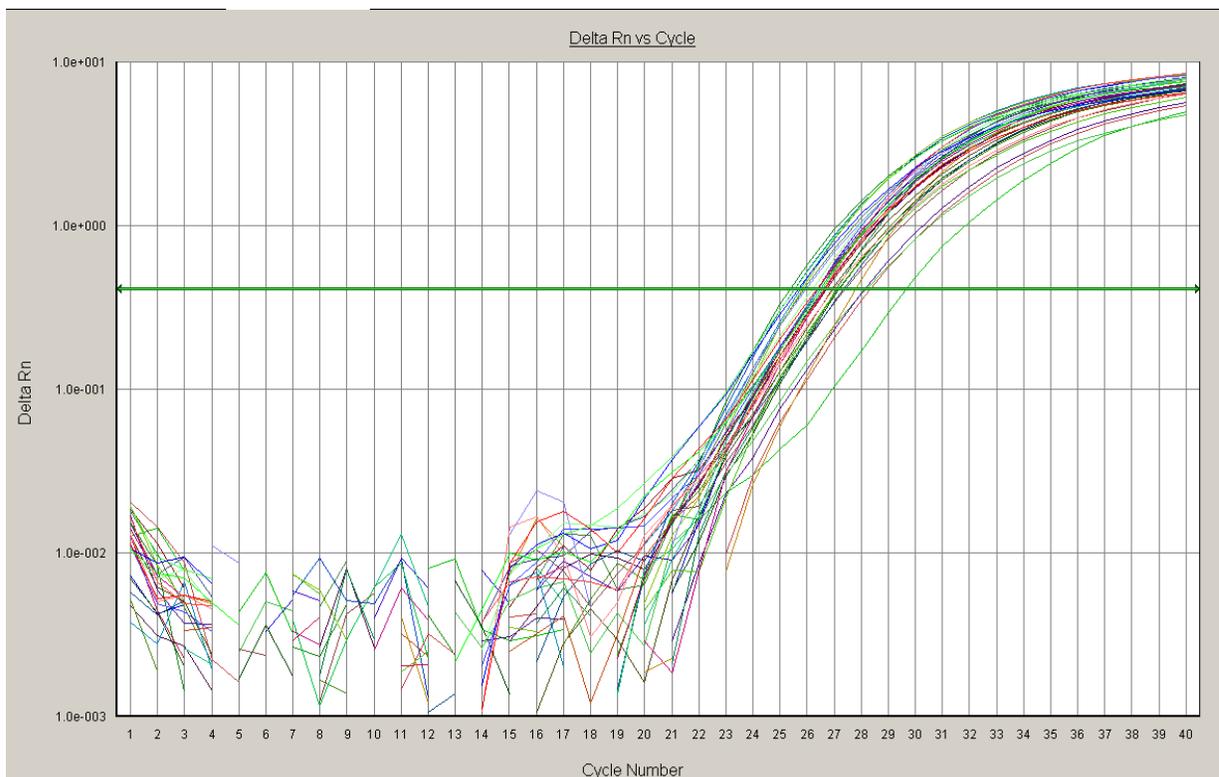


Figura 4 – PCR em tempo real. Integridade do produto confirmada pela curva de amplificação do GAPDH do DNA de todos os produtos extraídos (3horas, 24 horas, 72 horas, 14 dias, 28 dias). A linha verde horizontal define o início do crescimento exponencial do produto. Cada curva colorida representa o DNA extraído de um músculo e submetido a 40 ciclos de amplificação. Note que todas as amostras começam a amplificar exponencialmente a partir dos ciclos 21 e 22 e atingem o limiar de ciclos por volta 26-27 ciclos

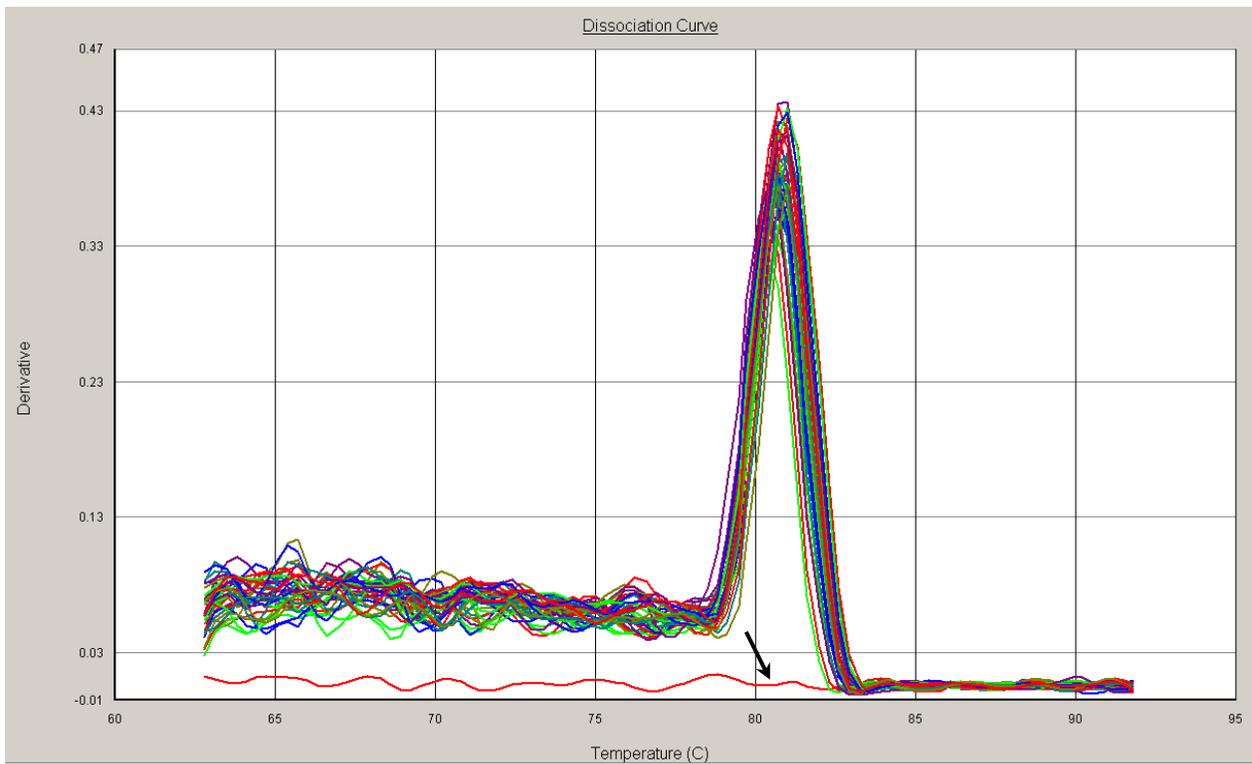


Figura 5 – Diferenciação do produto amplificado na figura 3, pela curva de dissociação. Os produtos formados geram um sinal em uma temperatura aproximada de 80°C, o que define o seu tamanho. Note uma linha abaixo, em vermelho do controle negativo do experimento (seta).

### 2.6.6. Sensibilidade da detecção do sistema SYBR Green

Garantido a viabilidade do produto, nosso próximo passo foi realizar uma curva de diluição do DNA extraído das células mesenquimais de macho e amplificá-los com PCR em tempo real para saber quão sensível o sistema de detecção era para detectar o gene SRY (do inglês *Sex determining region on Y*). Após a realização da curva de diluição, observamos que tínhamos uma faixa ótima de concentração próxima de cinco nanogramas de DNA amplificado e acima dessas concentrações, começamos a observar uma inibição parcial e chegando a uma inibição total da reação nas concentrações acima de cinquenta nanogramas. A realização da curva também nos demonstrou que o sistema tinha a capacidade de amplificar o gene alvo a uma concentração de até cinco picogramas, ou seja, o equivalente à quantidade do DNA genômico de uma célula diplóide (gráfico 1). Além disso, a técnica de PCR em tempo real demonstrou que quando diminuimos a concentração do DNA, aumenta a formação de dímeros de primer (figura 5).

Conhecida a sensibilidade de detecção do sistema, nosso próximo passo foi realizar o PCR em tempo real das amostras de músculos que receberam a injeção de células nos determinados tempos após injeção.

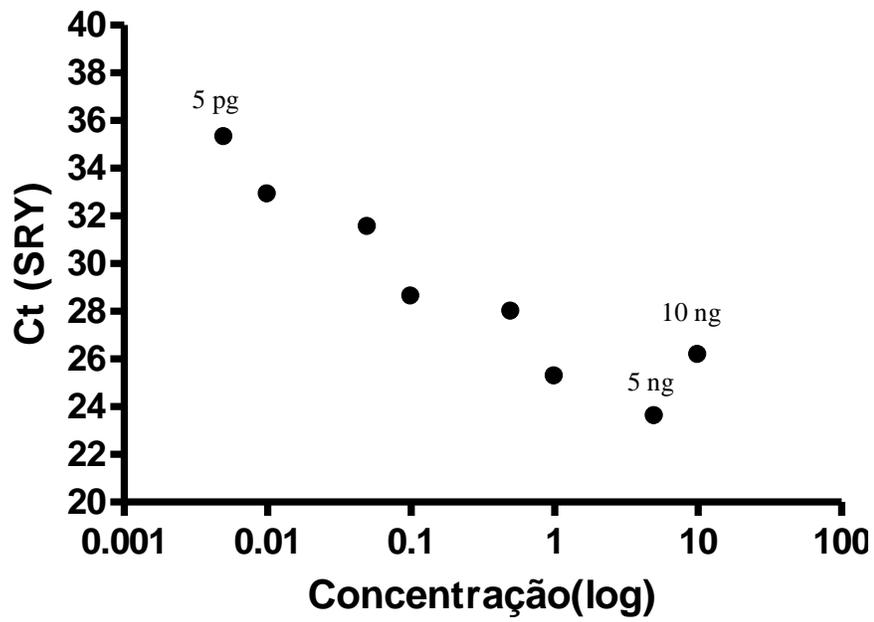


Gráfico 1 – Curva de diluição do DNA extraído das AT-MSCs. Os números indicam os Ct (início a ascensão exponencial) do gene SRY nas várias concentrações.

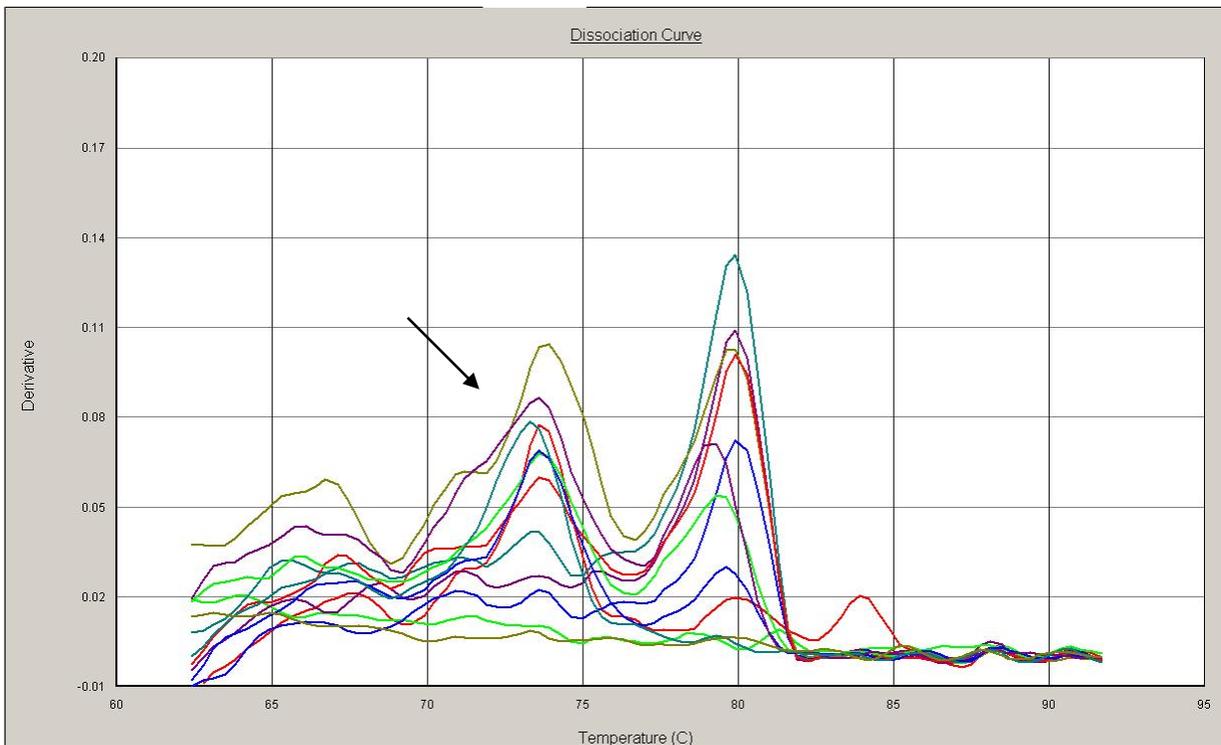


Figura 6 – Curva de dissociação dos produtos formados a partir da curva de diluição do DNA das AT-MSCs. A seta indica a formação de curvas abaixo de 75°C, distintas das curvas acima de 80°C, diferenciando a formação de dímeros de primer da formação do produto de PCR.

## 2.7. Histologia

Após a análise funcional, uma parte dos músculos lesionados e normais foram fixados com uma solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato e processados após 48 horas. As peças foram lavadas em tampão fosfato 1x (PBS) para retirada do excesso de fixador e cortadas transversalmente em duas partes onde foi realizada a laceração. Em seguida, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80%, 90% e 100%) por 30 minutos em cada banho e colocadas em xilol

puro 2 vezes por 30 minutos. A infiltração foi feita em três banhos de parafina à 60°C, e posteriormente, os músculos foram emblocados com suas fibras orientadas verticalmente em dois blocos diferentes (A e B).O tecido então foi seccionado em micrótomo histológico (Leica - Germany) obtendo-se cortes transversos de ambas as partes em 5 µm de espessura.

### **2.7.1 Coloração com hematoxilina e eosina (H&E)**

As lâminas foram colocadas em solução de hematoxilina de Harris durante 10 minutos e foram lavadas em água destilada por mais 10 minutos. Em seqüência, o material passou rapidamente por um banho de álcool clorídrico e a lâmina passou por banho de água destilada (3x de 5 minutos). O álcool/ácido clorídrico é usado para tornar nítida a diferença entre o citoplasma e o núcleo. Essas lâminas foram postas em eosina durante 10 minutos e então, lavadas em água corrente rapidamente. O material foi desidratado com duas lavagens sucessivas em álcool 95% por cinco minutos e 100%, de três minutos. Os cortes foram clarificados em xilol por três vezes durante cinco minutos e as lâminas foram montadas em Entellan e observadas em microscópio óptico Axiovert 100 (Zeiss) com objetivas de 10x e 20x. Com esta coloração, temos o citoplasma em várias tonalidades de rosa e o núcleo em púrpura.

### **2.7.2 Quantificação do número de fibras em regeneração**

Para a quantificação do número de fibras em regeneração, ou seja, com um ou mais núcleos centralizados, 10 fotos de cada corte, utilizando a objetiva de 10x foram tiradas das lâminas coradas com H&E. As condições para a aquisição das fotos no microscópio com o programa ImagePro 5.0 foram padronizadas e não houve modificação das mesmas após sua obtenção. Foi calculada uma razão entre o número de fibras em regeneração por  $10^3$  fibras de cada secção transversa.

### **2.7.3. Coloração com picrossírius para quantificação do colágeno**

As lâminas emblocadas foram colocadas na estufa à 60° C durante 20 minutos para a retirada da parafina. Os cortes histológicos foram submetidos a três banhos com xilol PA (1x de 20 minutos, e 2x de 5 minutos). Este material foi hidratado através de incubações seqüenciais de cinco minutos, em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 90% 70%), e em seguida com água destilada por 10 minutos. As lâminas foram colocadas na solução de ácido fosfomolibdico 0,2% por um minuto, e em seguida incubadas durante 90 minutos na solução de picrossírius. Após a incubação, as lâminas foram lavadas durante dois minutos em HCl (ácido clorídrico) 0,01N e álcool 70% por 45 segundos. O material foi desidratado com duas lavagens sucessivas em álcool 95% e 100%, de cinco minutos. Os cortes foram clarificados através de duas lavagens com xilol durante cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram montadas com Entellan e observadas em microscópio óptico Axiovert 100 (Zeiss) com objetivas de 10x e 20x.

#### 2.7.4. Quantificação da área de Fibrose

Com o objetivo de quantificar a área de fibrose, novamente, 10 fotos de cada corte, com a objetiva de 10x foram tiradas das lâminas coradas com picrosírius. As condições para a aquisição das fotos no microscópio com o programa ImagePro 5.0 foram padronizadas e não houve modificação das mesmas após sua obtenção.

As fotos foram então analisadas através do ImagePro (Mediacybernetics – EUA) para a quantificação da área marcada de vermelho e da área total de todas as fotos. A partir daí foi calculada a razão das duas áreas:

- Área marcada em vermelho

Área Total

Sendo a área total representada pela área do tecido sem o interstício.

#### 2.8. Análise estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. A diferença entre os grupos foi comparada através do teste de variância ANOVA uni e bidirecional, considerando o nível de significância  $P < 0,05$ . Encontrando essa significância, utilizamos o teste post hoc de comparações múltiplas de Bonferroni, sendo toda essa análise realizada no programa estatístico GraphPad Prism 4<sup>®</sup> (EUA).

### 3.RESULTADOS

#### 3.1 Modelo de lesão muscular

##### 3.1.1 Contratilidade muscular

Analizamos a capacidade funcional dos músculos *soleus* através do protocolo de contratilidade *in vitro* (montagem de músculo isolado), estimulados a 1 Hz e 50 Hz de frequência. Os valores de tensão foram corrigidos através das medidas de força exercida pelo músculo contralateral não lesionado, representados em percentual. Nosso modelo de laceração foi eficaz, a medida que houve queda (entre 30 e 40%) na capacidade de gerar força em relação ao músculo normal (100%) nos animais lesionados e não tratados, 21 dias após a lesão, tanto em estimulações de 1 Hz ( $67,1 \pm 8,8\%$ ,  $p < 0.05$ ) quanto em estimulações tetânicas ( $59,3 \pm 8,1\%$ ,  $p < 0.05$ ) (Gráfico 2). Trinta e cinco dias após a lesão, o grupo apenas lesionado, ainda apresentava menor desenvolvimento de força a 1Hz ( $84,2 \pm 3,6\%$ ,  $p < 0.05$ ) e a 50 Hz ( $84,2 \pm 3,1\%$ ,  $p < 0.05$ ). No entanto, observamos uma maior força desenvolvida no grupo analisado com 35 dias quando comparados ao grupo sacrificado com 21 dias em 1Hz ( $67,1 \pm 8,8\%$  vs  $84,2 \pm 3,6\%$  respectivamente;  $p < 0.05$ ) e 50Hz ( $59,3 \pm 8,1\%$ , vs  $84,2 \pm 3,1\%$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ) de estimulação. Esses últimos resultados nos permitem afirmar que houve melhora funcional do *soleus* de 21 para 35 dias e, conseqüentemente, a contratilidade muscular aumentou. A Tabela 3 resume os dados absolutos apresentados no Gráfico 2.

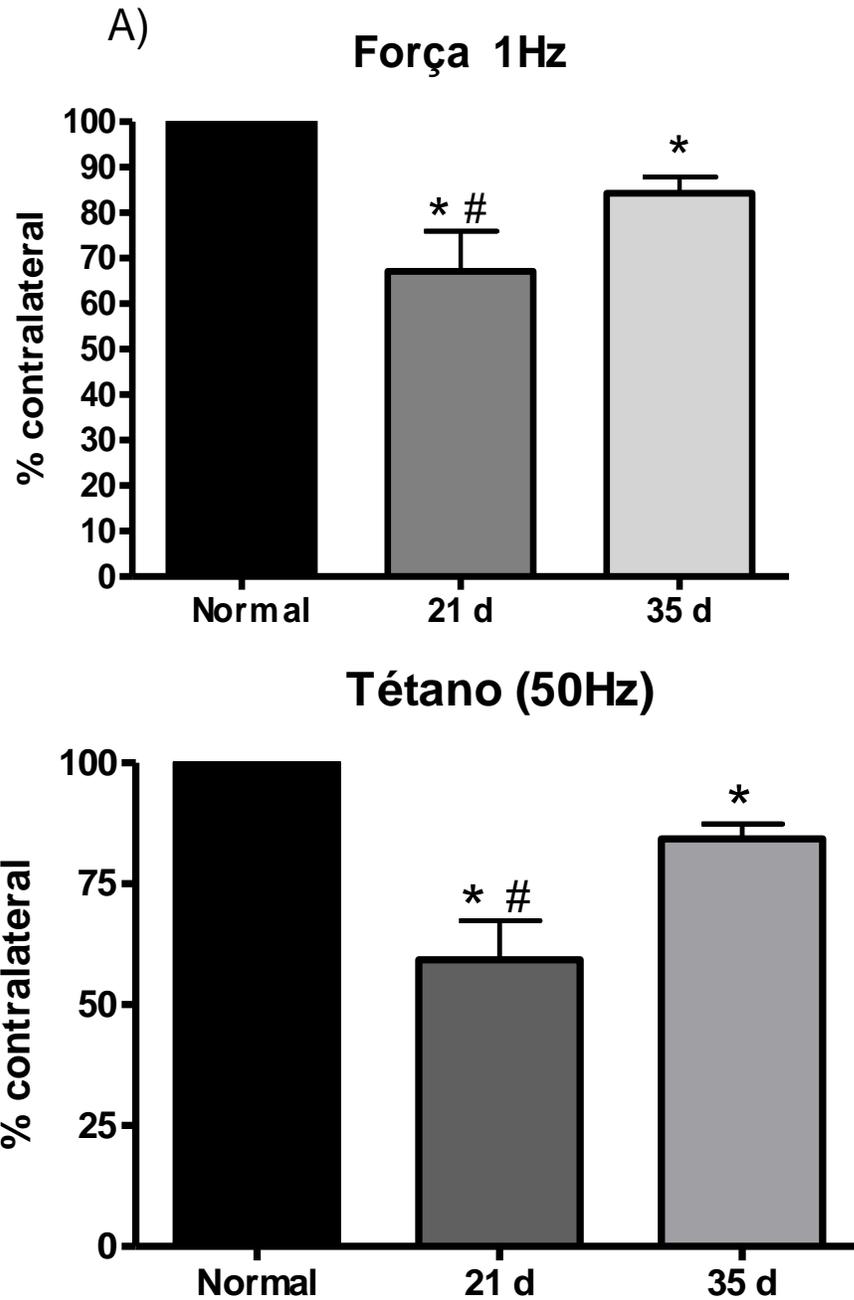


Gráfico 2 – Tensão isométrica em 1Hz (A) e 50Hz (B) do músculo *soleus* corrigida pela tensão do músculo contralateral nos tempos avaliados após intervenção da injeção controle. \*  $P < 0,05$  vs Normal, #  $P < 0,05$  vs 35 dias.

	1Hz		50Hz	
	21 dias	35 dias	21 dias	35 dias
<b>Número de animais</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
<b>Mínimo (%)</b>	<b>41,3</b>	<b>70,9</b>	<b>29,1</b>	<b>66,7</b>
<b>Máximo (%)</b>	<b>86,8</b>	<b>98,7</b>	<b>80,5</b>	<b>94,4</b>
<b>Mediana (%)</b>	<b>65,3</b>	<b>80,8</b>	<b>65,9</b>	<b>83,8</b>
<b>Média (%)</b>	<b>67,1</b>	<b>84,2</b>	<b>59,3</b>	<b>84,2</b>
<b>Desvio Padrão (%)</b>	<b>19,7</b>	<b>9,6</b>	<b>19,8</b>	<b>8,8</b>
<b>Erro Padrão (%)</b>	<b>8,8</b>	<b>3,6</b>	<b>8,1</b>	<b>3,1</b>

Tabela 2 – Análise de Tensão isométrica do músculo *soleus* do grupo controle. (Valores em percentual da pata contralateral).

### 3.2. Análise histológica do músculo Sóleo

Com o objetivo de observar a evolução do processo inflamatório, a organização e o processo de regeneração do tecido muscular, foram feitas análises histológicas do músculo *soleus* a partir da coloração de hematoxilina e eosina. Para analisar a distribuição da deposição de colágeno e quantificá-la, coramos as lâminas com picrossírius.

### 3.2.1. Coloração de Hematoxilina e Eosina

Na coloração de hematoxilina/eosina, observamos que a secção transversa do músculo normal é constituída por fibras paralelas, organizadas em fascículos e multinucleadas, e com núcleos periféricos (figura 7). Vinte e um dias após a lesão, duas zonas são claramente definidas no tecido muscular: a região mais acometida pela lesão, com uma grande quantidade de células do infiltrado inflamatório (alta densidade de núcleos), e fibras musculares com núcleo centralizado, o que seria um indicativo de regeneração muscular. Porém, nessa região tais células ainda aparentam ter pequeno diâmetro e estarem desorganizadas (figura 8). Em contrapartida, na zona menos lesionada já podemos identificar uma diminuição significativa do infiltrado inflamatório e uma maior organização do tecido. Destacamos nessa região o número de fibras com núcleos centralizados com um maior diâmetro em relação a região mais periférica uma fase de remodelamento da regeneração muscular (figura 8).

Trinta e cinco dias após a lesão observamos um pequeno número de células do infiltrado inflamatório entre as fibras em regeneração, porém ainda presente. Nesse tempo, as áreas profundas já apresentam uma morfologia mais semelhante ao tecido não lesionado (figura 9). Ainda encontramos fibras musculares com núcleo centralizados e em maior diâmetro, caracterizando a continuidade do processo de regeneração (figura 9-B).

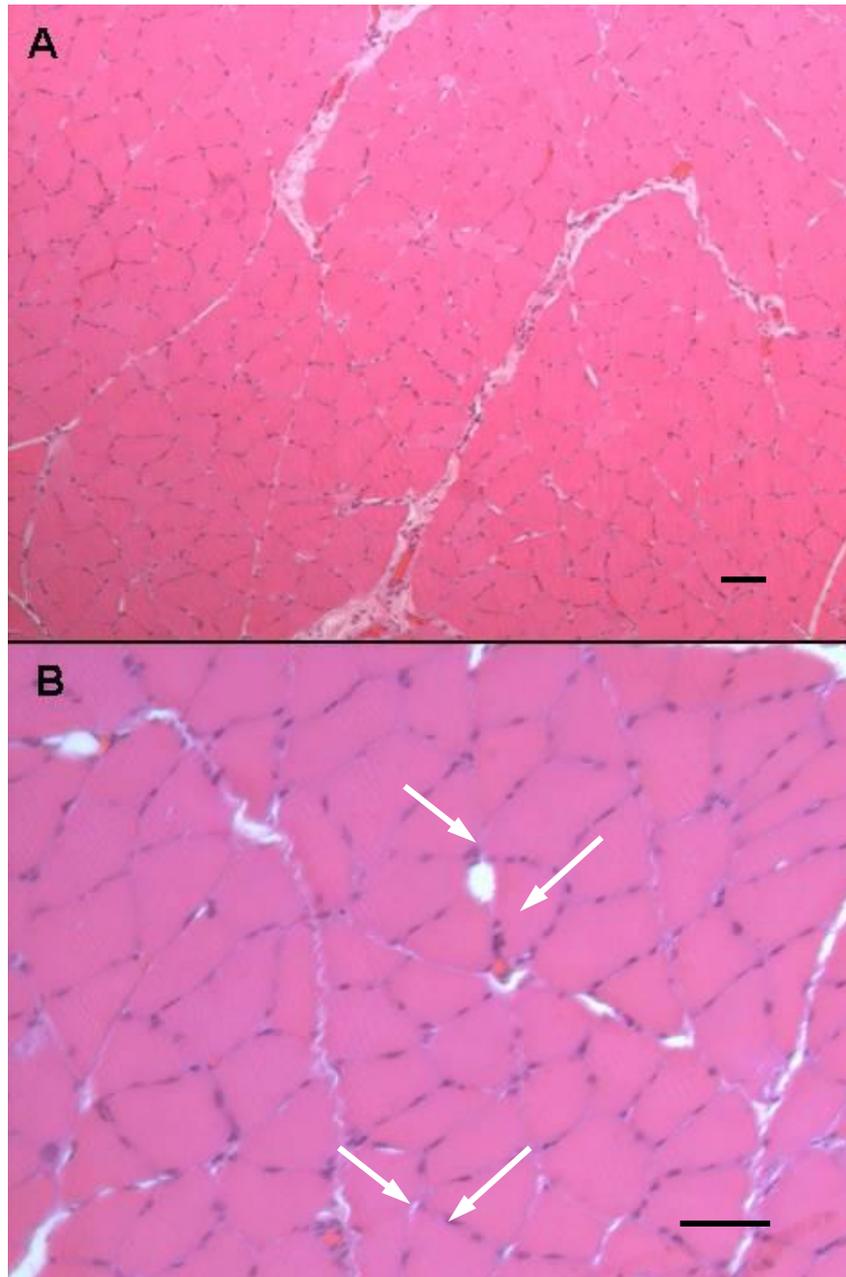


Figura 7 - Análise histológica do músculo *soleus* normal, não lesionado. Os painéis A e B mostram a coloração com hematoxilina/eosina, no aumento de 10X e 20X, respectivamente. Observe em A e B a estrutura geral do tecido muscular organizado em fibras multinucleadas (setas brancas – figura B). A posição periférica dos núcleos é característica desse tecido em condições normais. Barras de escala: 50µm

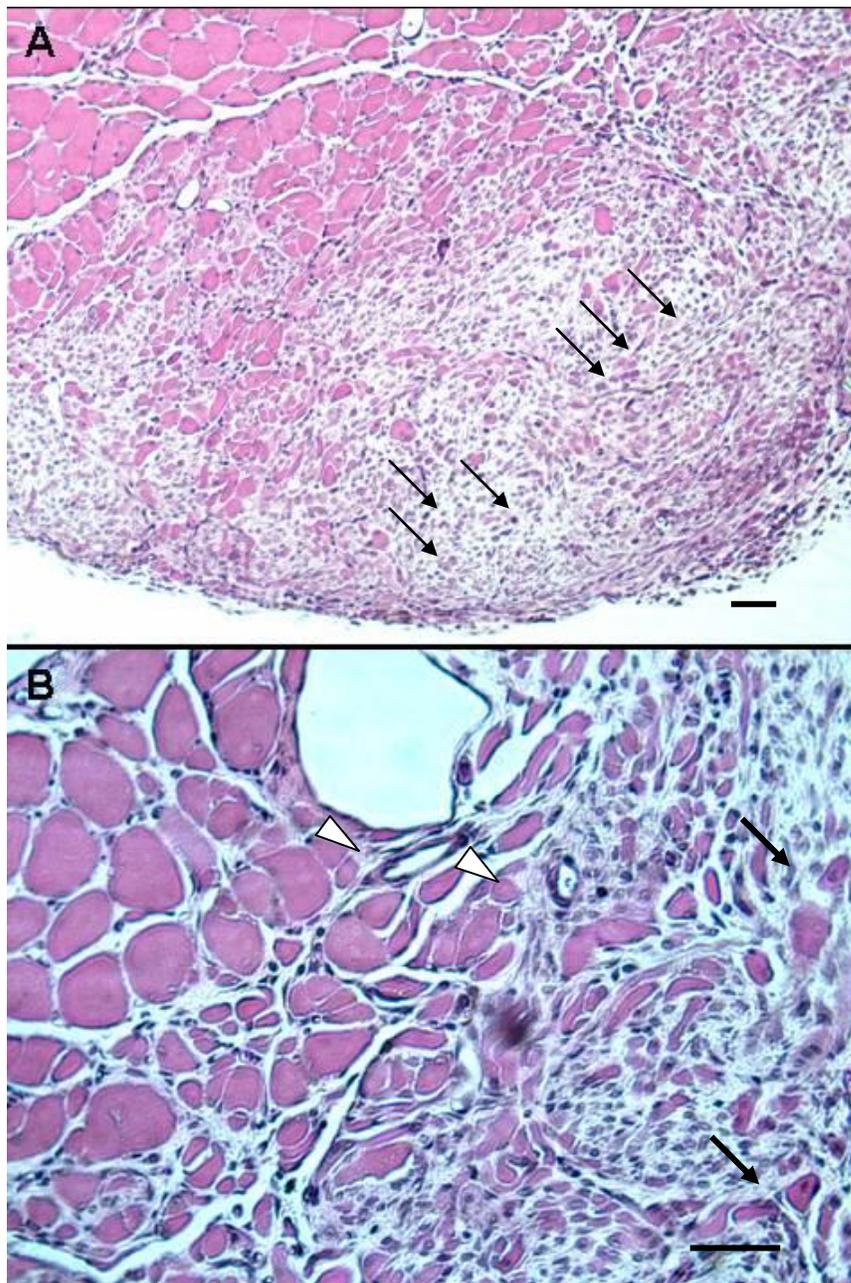


Figura 8 - Análise histológica do músculo *soleus* após 14 dias após a intervenção da injeção. Os painéis A e B mostram a coloração com hematoxilina/eosina nos aumentos de 10x e 20x, respectivamente. Observe no painel A, o intenso infiltrado inflamatório (setas pretas), com aumento da celularidade no tecido. Note em B, núcleos centralizados (setas pretas) e vaso sanguíneo (cabeças de setas brancas).

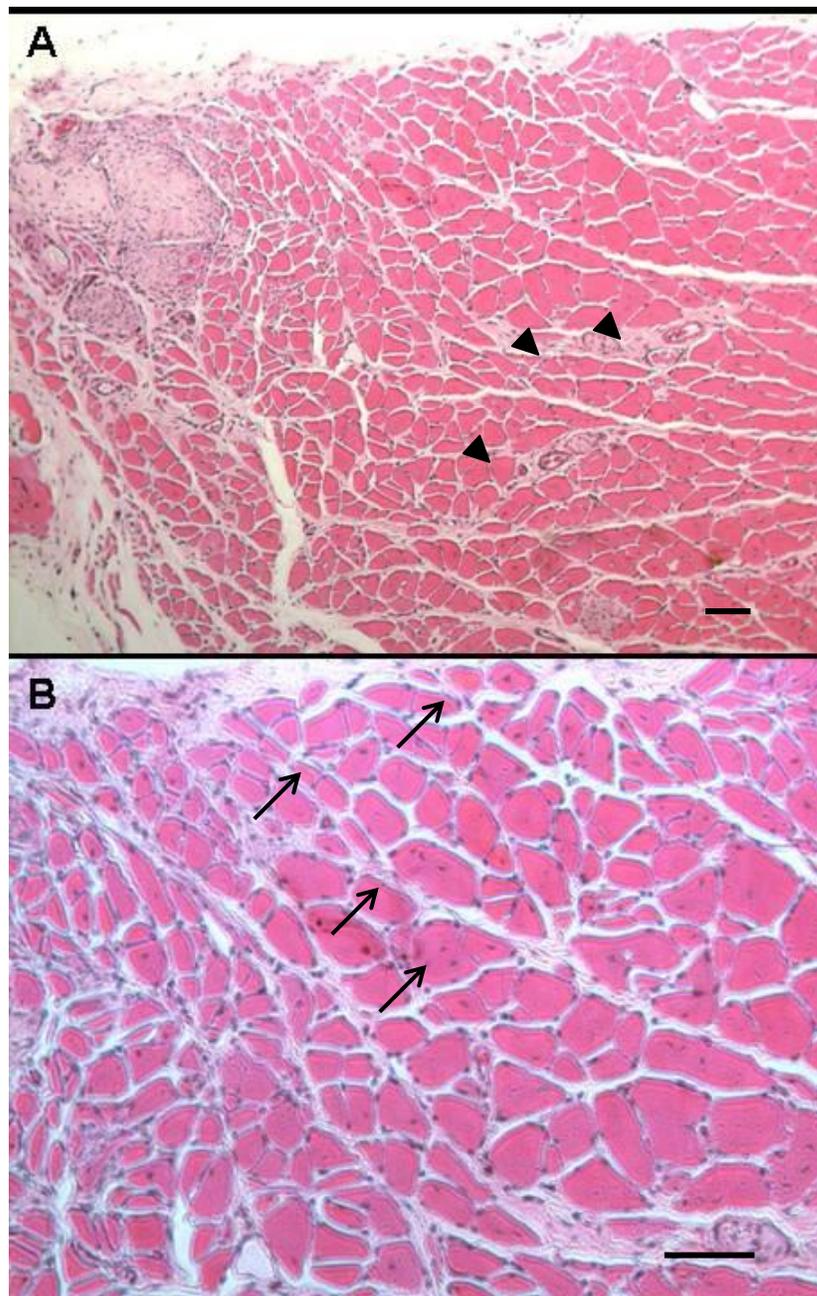


Figura 9 - Análise histológica do músculo *soleus* após 28 dias após interveção da injeção ou 35 dias após a lesão. Os painéis A e B mostram a coloração com hematoxilina/eosina nos aumentos de 10x e 20x, respectivamente. Observamos no painel A, presença de vasos sanguíneos (cabeça de seta). Identificamos em B um grande número de fibras com núcleos centralizados (setas).

### **3.2.2. Coloração com picrosírius.**

Com o objetivo de verificar a área de fibrose no modelo de lesão, coramos o tecido muscular com picrosírius, onde colágeno apresenta um tom avermelhado enquanto que as outras estruturas celulares ficam amareladas. Utilizando o programa ImagePro, que permite fazer a relação entre a área avermelhada e a área total, obtivemos um percentual indicativo da fibrose tecidual.

A Figura 10 mostra a presença de colágeno nos músculos não lesionados. A marcação de colágeno por picrosírius é restrita aos espaços entre as fibras e fascículos e, principalmente, ao redor dos vasos sanguíneos. Os animais lesionados, entretanto, apresentam extensas áreas cobertas por cicatriz, e qualitativamente, não há diferença entre 21 e 35 dias (Figuras 11 e 12, respectivamente).

Os animais lesionados exibiram um aumento na quantidade de colágeno presente no tecido muscular nos dois tempos estudados no modelo de lesão muscular utilizado (Tabela 3 e Gráfico 3). Esses dados sugerem que o quadro de lesão por laceração é capaz de induzir o aparecimento da fibrose e que permanece por até 35 dias após a indução da lesão.

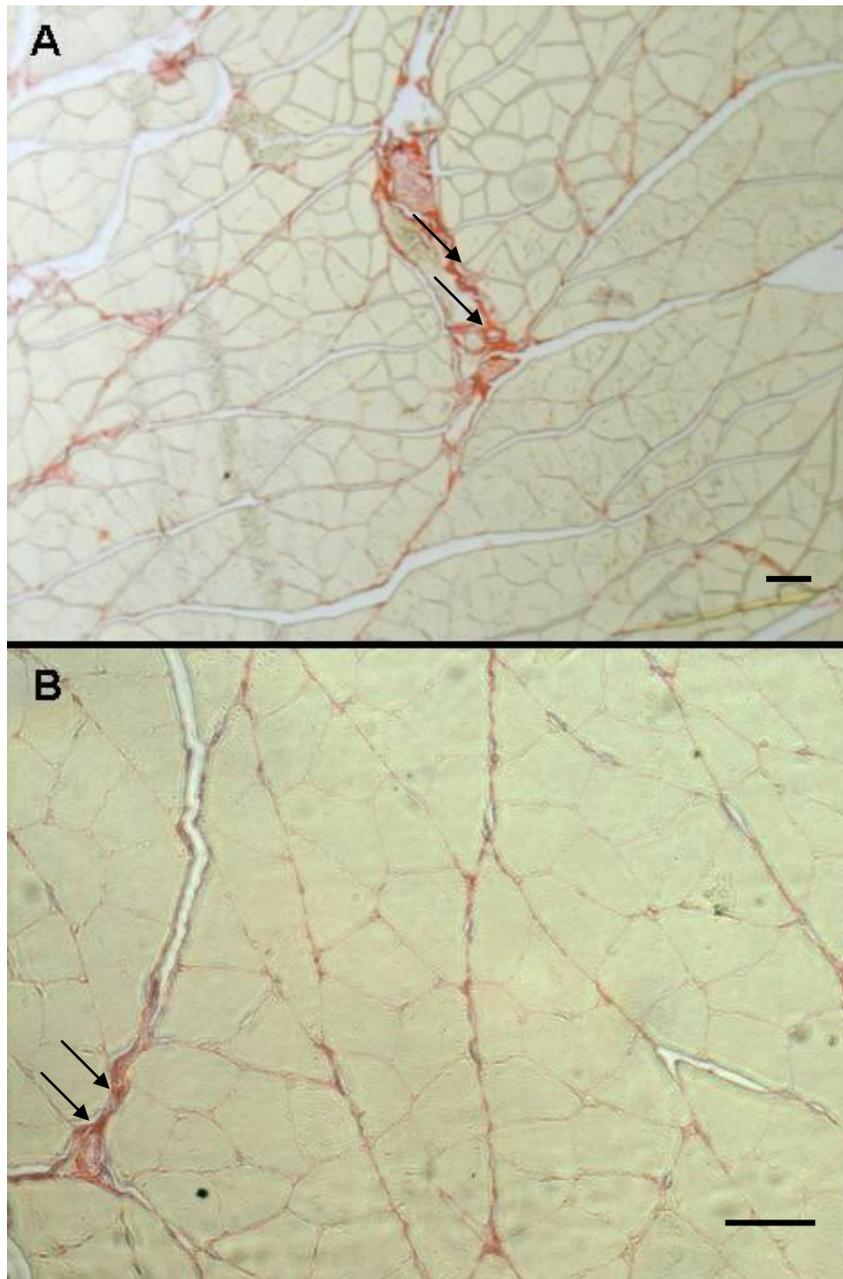


Figura 10 - Análise histológica do músculo *soleus* normal. Os painéis A e B mostram a coloração com picrosírius nos aumentos de 10x e 20x, respectivamente. Observamos a pequena quantidade de colágeno marcada em vermelho. Note ainda a característica interfibrilar dessa marcação em A e B, ilustrando as camadas de matriz extracelular característica desse tecido (seta). Barras de escala: 50 $\mu$ m

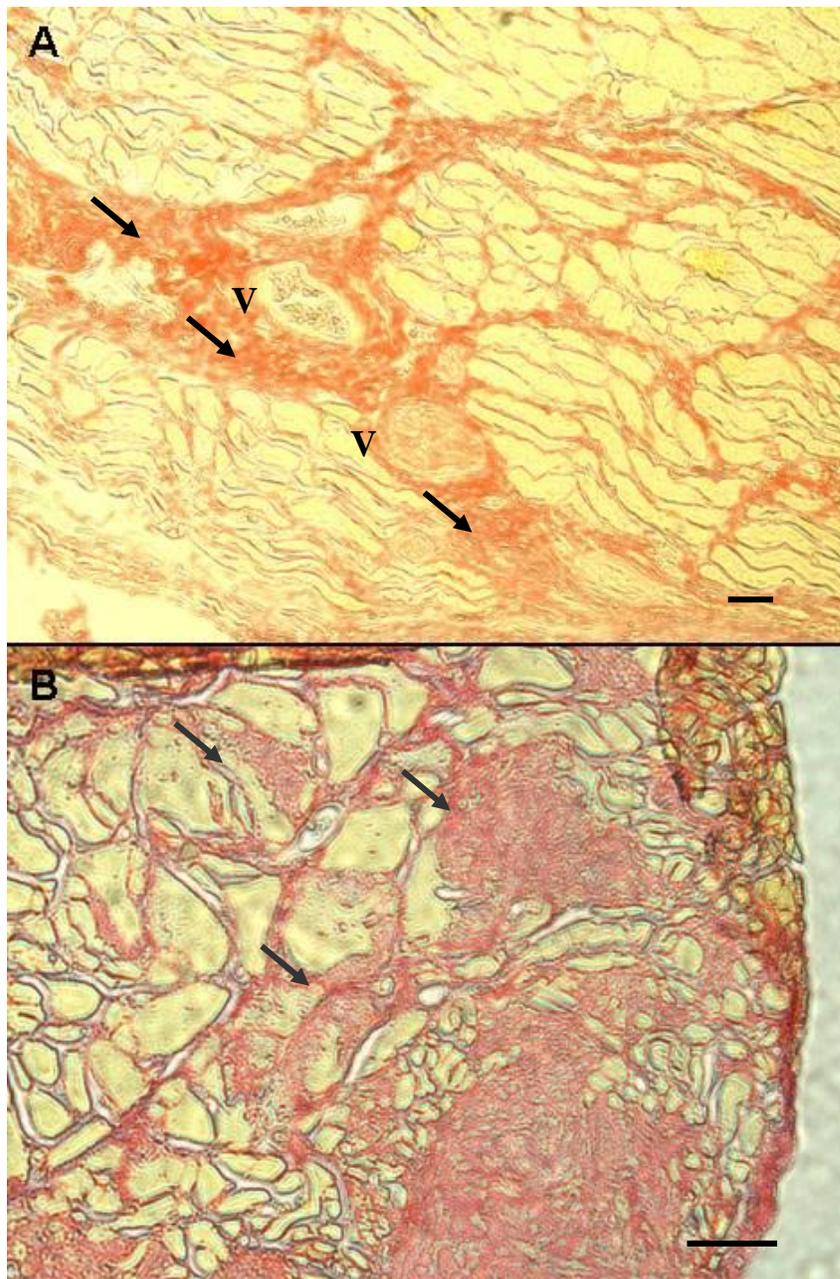


Figura 11 - Análise histológica do músculo *soleus* após 21 dias de lesão. Os painéis A e B mostram a coloração com picrosírius nos aumentos de 10x e 20x, respectivamente. Observamos no painel A uma grande área de fibrose, sempre mais densa em volta dos vasos sanguíneos (V) (seta). Em B identificamos claramente o aumento do colágeno interfibrilar (seta).

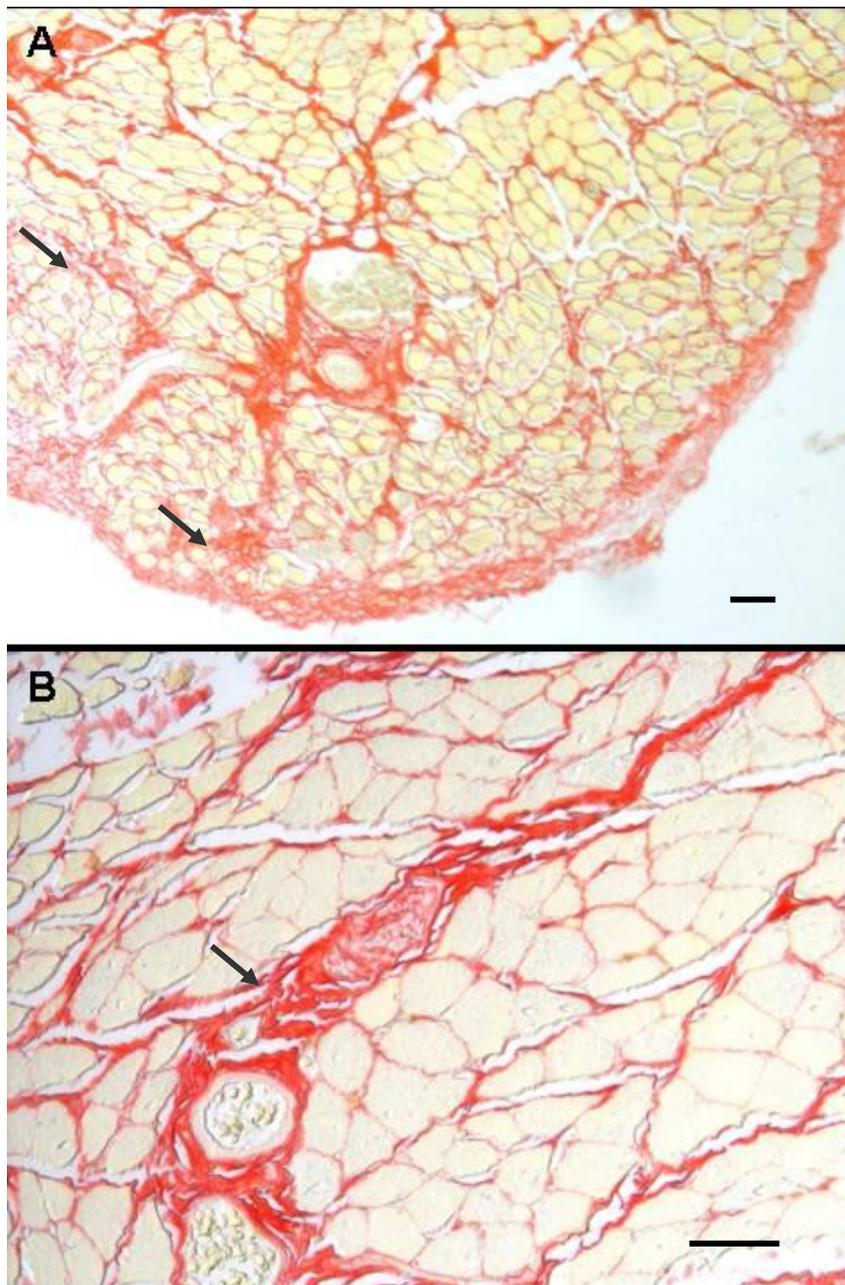


Figura 12 - Análise histológica do músculo *soleus* após 35 dias de lesão. Os painéis A e B mostram a coloração com picrosírius nos aumentos de 10x e 20x, respectivamente. Observamos no painel A grandes áreas de fibrose interfibrilar e com característica perivascular (seta). Identificamos com detalhe em B, a presença de regiões com a coloração aumentada, principalmente na rede vascular do músculo, em comparação com a figura 9.

	Normal	14 dias	28 dias
<b>Número de animais</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Mínimo</b>	<b>3,33</b>	<b>14,01</b>	<b>19,57</b>
<b>Máximo</b>	<b>10,36</b>	<b>38,57</b>	<b>36,13</b>
<b>Mediana</b>	<b>8,17</b>	<b>29,57</b>	<b>22,99</b>
<b>Média</b>	<b>7,55</b>	<b>27,38</b>	<b>25,42</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>2,73</b>	<b>12,43</b>	<b>7,32</b>
<b>Erro Padrão</b>	<b>1,22</b>	<b>7,17</b>	<b>3,66</b>

Tabela 3 – Quantificação de colágeno no músculo *soleus* após o protocolo de lesão (grupo 1).

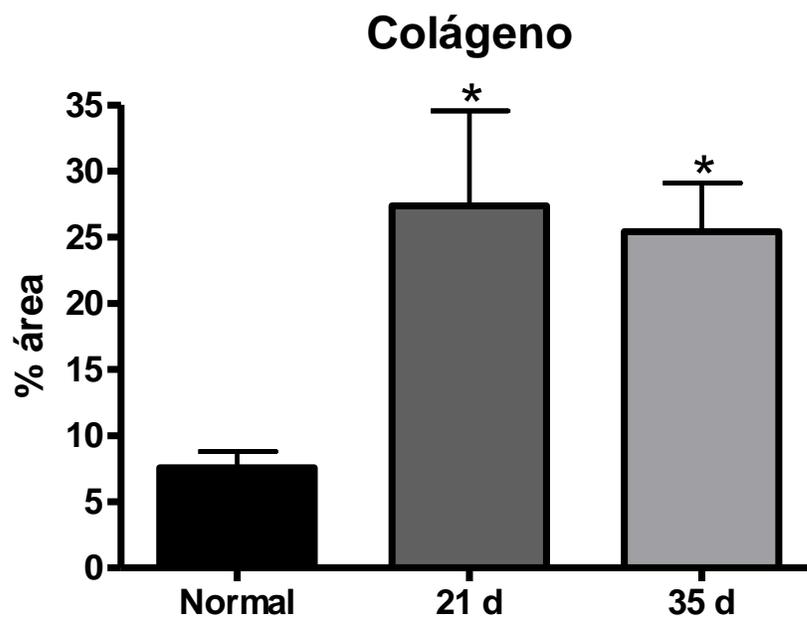


Gráfico 3 - Percentual da área com fibrose da secção transversa total do músculo *soleus* dos animais não tratados \*  $p < 0,05$  vs normal.

### **3.3. Tratamento com AT-MSCs.**

#### **3.3.1 Preparação de músculo isolado: análise da contratilidade muscular**

A fim de avaliar o potencial terapêutico das células mesenquimais derivadas de tecido adiposo no processo de regeneração muscular, analisamos a capacidade funcional dos músculos tratados e não tratados 14 e 28 dias após a injeção de células, ou seja, 21 e 35 dias após indução da lesão muscular.

Nos experimentos com estimulações em baixa frequência, 1 Hz, não houve diferenças na força desenvolvida entre os animais tratados com AT-MSCs quando comparados com os tratados apenas com veículo, tanto 14 quanto 28 dias pós injeção de células. (valores absolutos na Tabela 4, gráfico 3-A). Todavia, a produção de força tetânica foi maior nos músculos tratados, em 14 dias, comparado ao grupo controle (tabela 4, gráfico 3-B). Quando consideramos a produção de força em tétano 28 dias após a injeção de células, encontramos valores similares entre grupo tratado e controle (tabela 4, gráfico 3-B).

	14 dias ñ tratado (%)		14 dias AT-MSCs (%)		28 dias ñ tratado (%)		28 dias AT-MSCs (%)	
	1Hz	50Hz	1Hz	50Hz	1Hz	50Hz	1Hz	50Hz
<b>Número de análises</b>	6	6	6	6	8	8	8	8
<b>Mínimo</b>	41,3	29,1	39,8	65,4	70,9	66,7	51,3	68,1
<b>Máximo</b>	65,3	65,95	52,3	76,3	80,8	83,85	81,65	81,6
<b>Mediana</b>	86,8	80,5	117,7	95,4	98,7	94,4	94,4	93,6
<b>Média</b>	67,12	59,28	59,86	79,2 <sup>A</sup>	84,26	84,26	76,39	80,76
<b>Desvio padrão</b>	19,73	19,85	35,78	11,21	9,639	8,857	17,6	9,169
<b>Erro padrão</b>	8,824	8,103	16	5,014	3,643	3,132	6,224	3,466

Tabela 4 - Análise da tensão isométrica máxima do músculo *soleus* tratado e não tratado, após o protocolo de lesão. **A** =  $p < 0,05$  vs 14 dias não tratado 50 Hz.

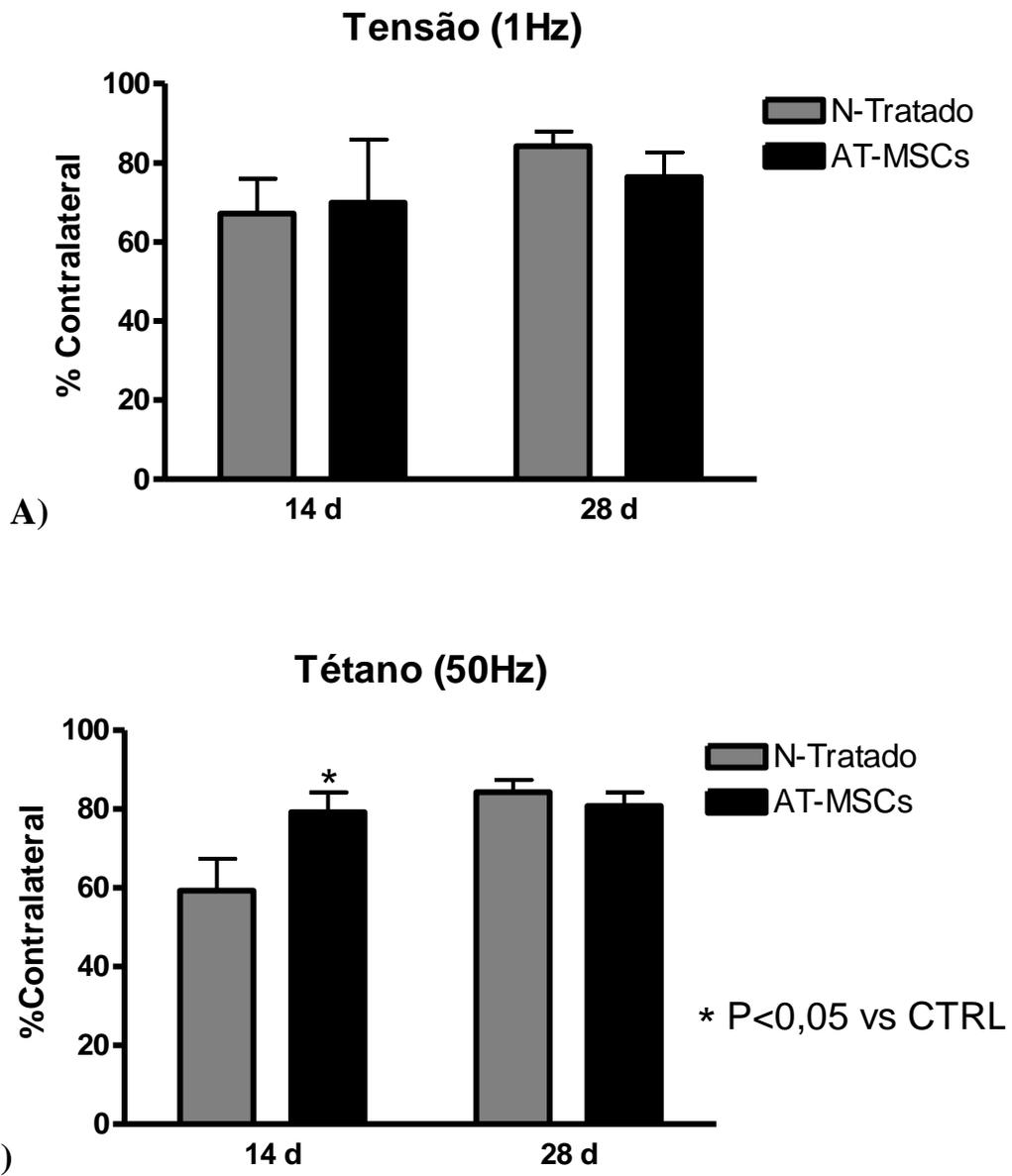


Gráfico 4 - Valores da tensão isométrica máxima do músculo *soleus* corrigidos pelos valores de força do músculo não lesionado nas frequências de 1Hz (A) e 50Hz (B).

### **3.3.2. Coloração de Hematoxilina e Eosina: análise do infiltrado inflamatório e quantificação de fibras musculares em regeneração**

Para estudar a resposta inflamatória e processo de regeneração do tecido muscular após o tratamento com AT-MSCs, analisamos os músculos tratados em 14 e 28 dias pós injeção através da coloração de H&E e quantificamos o número de fibras com núcleo centralizado. Qualitativamente, parece não haver diferenças na extensão do infiltrado inflamatório, dado pela celularidade (presença de núcleos) tecidual em ambos os tempos avaliados (Figuras 13 e 14), muito embora, com 28 dias, o infiltrado tenha praticamente cessado (Figura 14).

Com relação ao processo de regeneração, o número de fibras com núcleo centralizado no grupo tratado foi maior em relação ao grupo não tratado, 14 dias após a injeção das AT-MSCs (gráfico 5 - tabela 5). Entretanto, não houve diferença no número de fibras com núcleo central 28 dias após o tratamento (gráfico 5 - tabela 5) entre os grupos tratado e não tratado.

### Fibras em regeneração

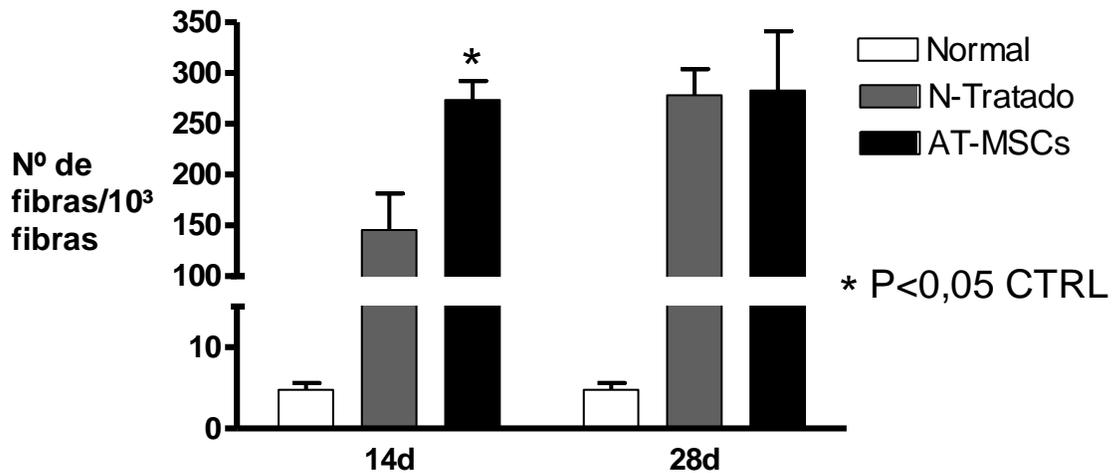


Gráfico 5 – Número de fibras em regeneração nos grupos tratado e não tratado 14 e 28 dias após a injeção das AT-MSCs.

	Normal	ñ tratado 14 dias	AT-MSCs 14 dias	ñ tratado 28 dias	AT-MSCs 28 dias
<b>Número de análises</b>	8	4	3	4	5
<b>Mínimo</b>	0	114	245	234	106
<b>Máximo</b>	5	182,5	268	267	272
<b>Mediana</b>	8	223	308	344	435
<b>Média</b>	4,75	175,5	273,7 <sup>a</sup>	278	282,8
<b>Desvio Padrão</b>	2,375	51,63	31,88	51,61	130,5
<b>Erro Padrão</b>	0,84	25,82	18,41	25,81	58,36

Tabela 5 – Valores do número de fibras com núcleo centralizado, dos grupos tratado e controle, 14 dias e 28 dias após a injeção. **a**,  $p < 0,05$  vs 14 dias não tratado. Os valores estão determinados por 1000 fibras analisadas

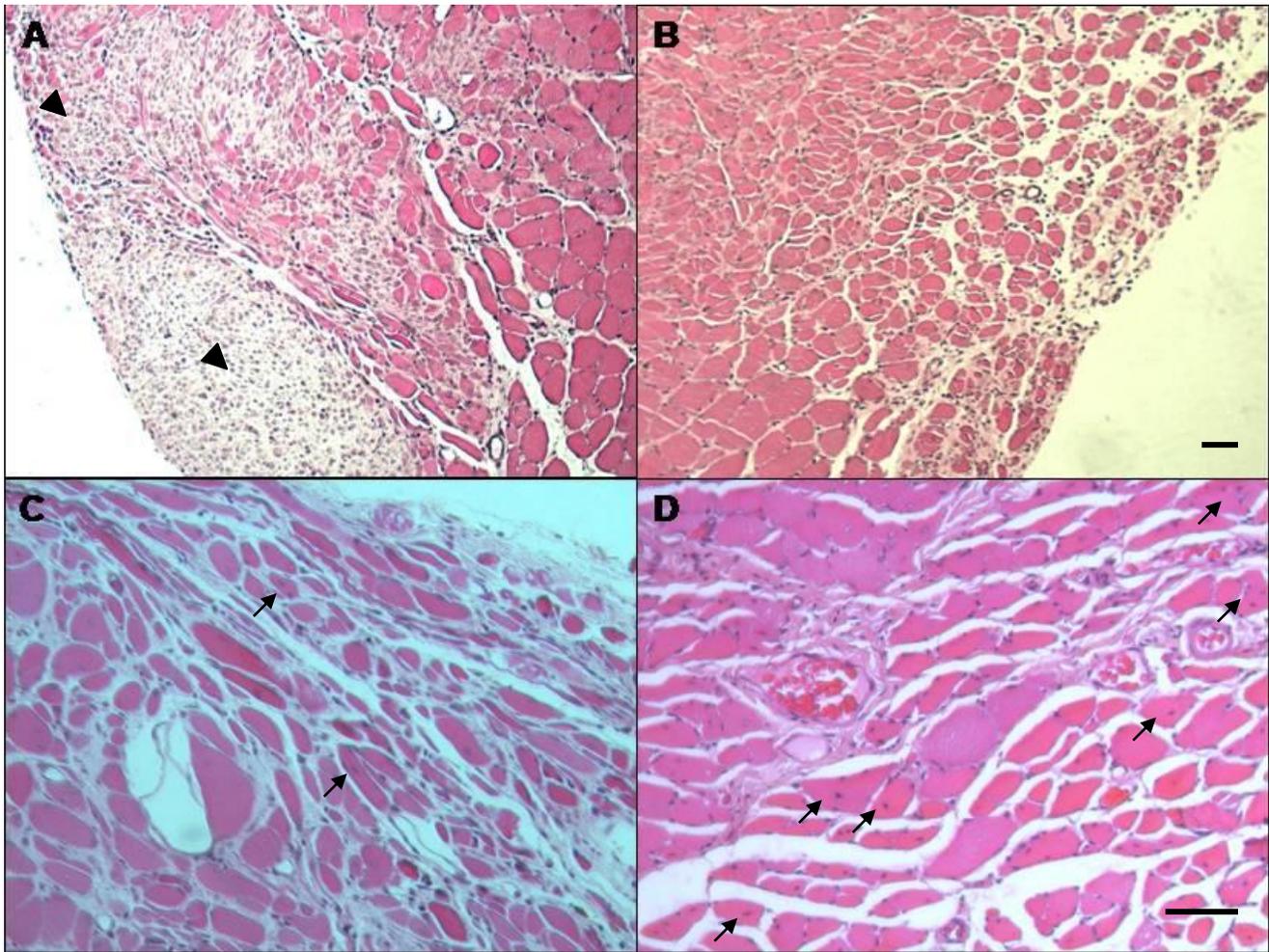


Figura 13 - Análise histológica do músculo *soleus* tratado após 14 dias injeção. Os painéis A e C mostram a coloração com hematoxilina/eosina nos aumentos de 10x e 20x dos músculos controle e os painéis B e D dos tratados, respectivamente. Observamos nos painéis A e B grande área em processo inflamatório (cabeça de seta). Porém identificamos também, no painel D, áreas com a morfologia normal e um grande número de fibras com núcleo centralizado em relação ao controle no painel C (seta). Barras de escala: 50µm

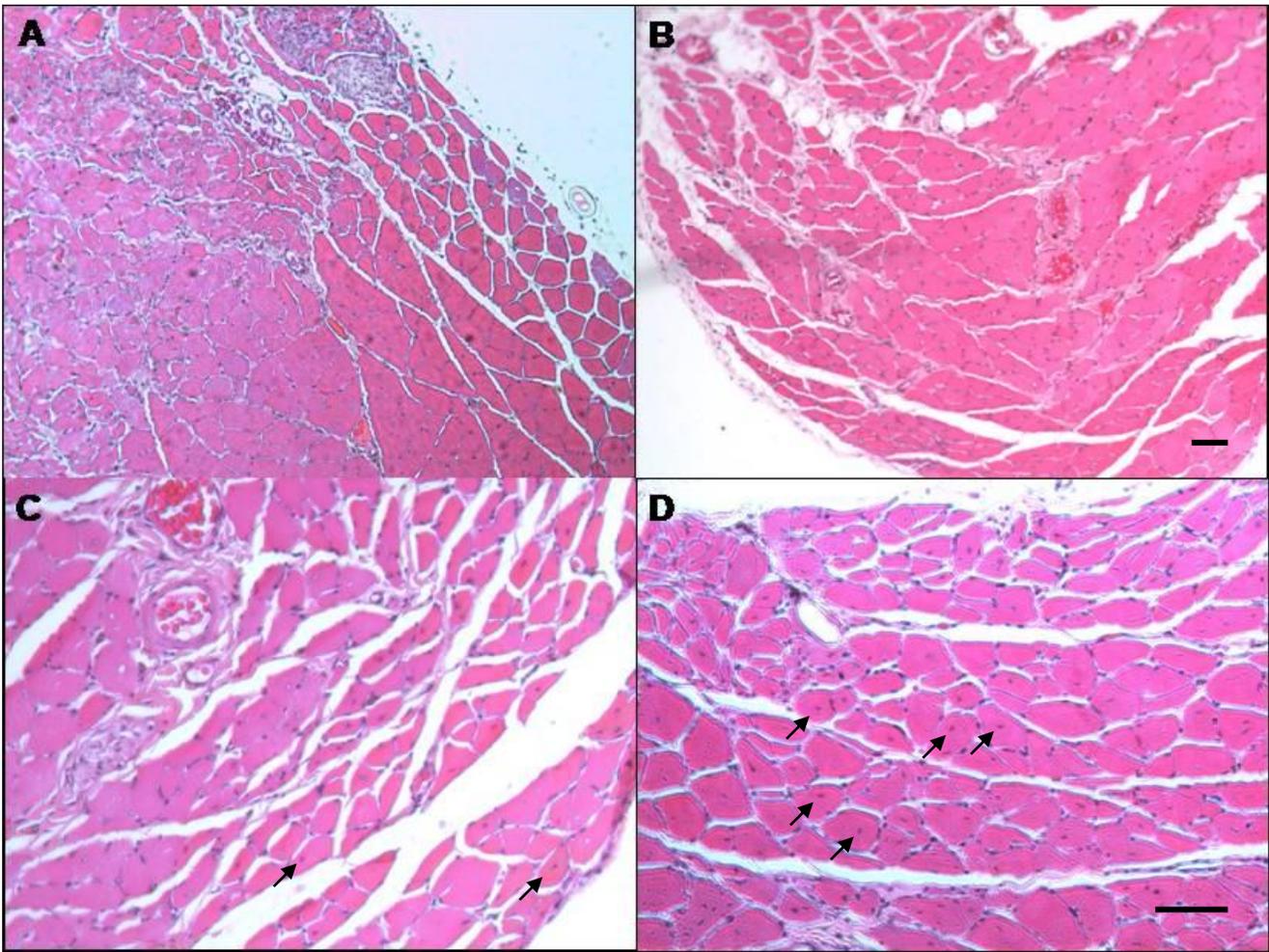


Figura 14 - Análise histológica do músculo *soleus* 28 dias após tratamento. Os painéis A e C mostram a coloração com hematoxilina/eosina nos aumentos de 10x e 20x dos músculos controle e os painéis B e D dos tratados, respectivamente. Observamos em todos os painéis uma organização tecidual aparentemente maior em relação aos músculos de 14 dias. Destacamos ainda nos painéis C e D, a presença de núcleos centralizados caracterizando a continuidade do processo de regeneração tecidual (seta).

### 3.3.3. Coloração de picrosírius: análise da deposição de colágeno

Observamos, através da coloração de picrosírius, que houve aumento na extensão da fibrose com a laceração muscular tanto nos animais tratados como não tratados (Figuras 15 e 16). Além disso, podemos identificar claramente que a área mais cometida pela lesão apresentava uma fibrose acentuada, em ambos os tempos, sem diferença entre os grupos (Figuras 15 e 16). Entretanto, em 28 dias encontramos também regiões que apresentam uma marcação de colágeno similar ao músculo normal (figura 12-D). Não houve diferença na quantificação da área tecidual coberta por tecido fibroso entre os grupos tratados e não tratados em quaisquer tempos de avaliação (Tabela 6 e Gráfico 6).

	Normal 14 dias	Normal 28 dias	ñ tratado 14 dias	AT-MSCs 14 dias	ñ tratado 28 dias	AT-MSCs 28 dias
<b>Número de análises</b>	5,0	9,0	3,0	3,0	4,0	5,0
<b>Mínimo</b>	3,3	4,5	14,0	27,1	19,6	14,6
<b>Máximo</b>	8,2	7,5	29,6	30,8	23,0	24,5
<b>Mediana</b>	10,4	12,5	38,6	33,2	36,1	32,0
<b>Média</b>	7,6	8,0	27,4	30,4	25,4	23,1
<b>Desvio Padrão</b>	2,7	2,9	12,4	3,1	7,3	6,7
<b>Erro Padrão</b>	1,2	1,0	7,2	1,8	3,7	3,0

Tabela 6 – Valores da análise da deposição de colágeno no músculo *soleus*, 14 e 28 dias após o protocolo de injeção.

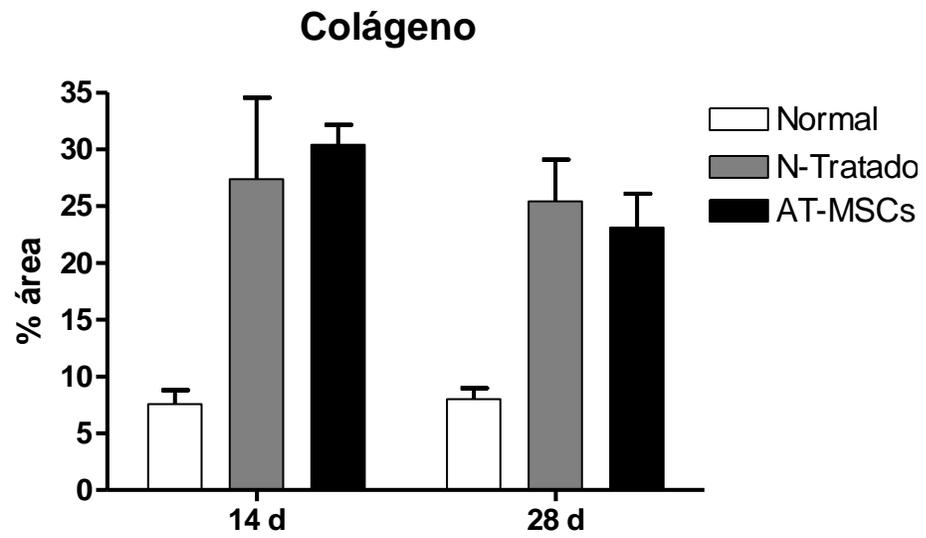


Gráfico 6 – Análise do percentual da área de colágeno nos músculos tratados e não tratados 14 e 28 dias após a injeção de células.

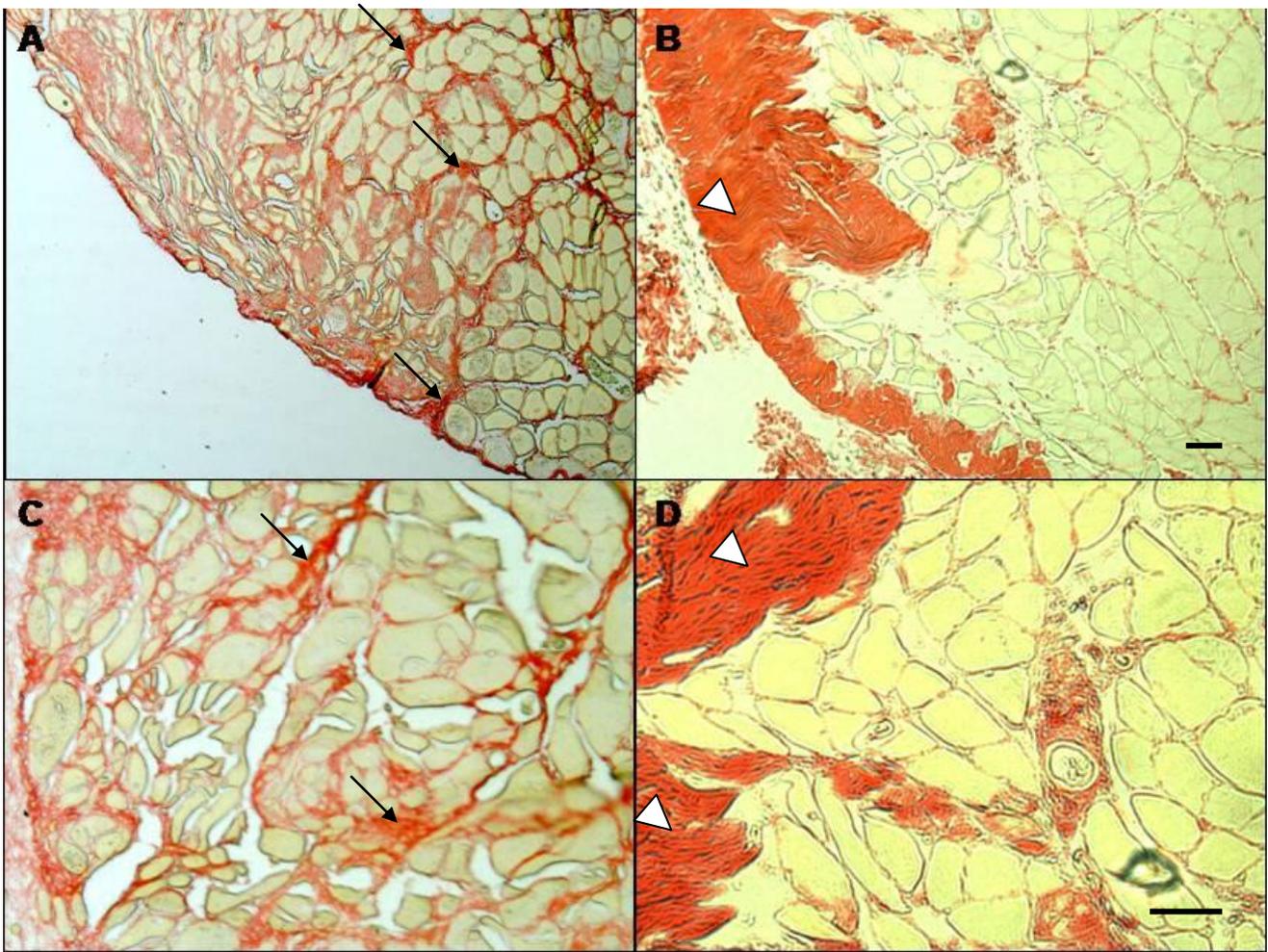


Figura 15 - Análise histológica do músculo *soleus* após 14 dias de tratamento. Os painéis A e C mostram a coloração com picrosírius nos aumentos de 10x e 20x dos músculos controle e os painéis B e D dos tratados, respectivamente. Em destaque nos painéis A e C, a característica tanto interfibrilar, quanto perivascular dessa fibrose. Observamos nos painéis B e D uma grande área de fibrose, ocupando a região mais lesionada e sugerindo perda de tecido muscular (cabeça de seta). Barras de escala: 50µm

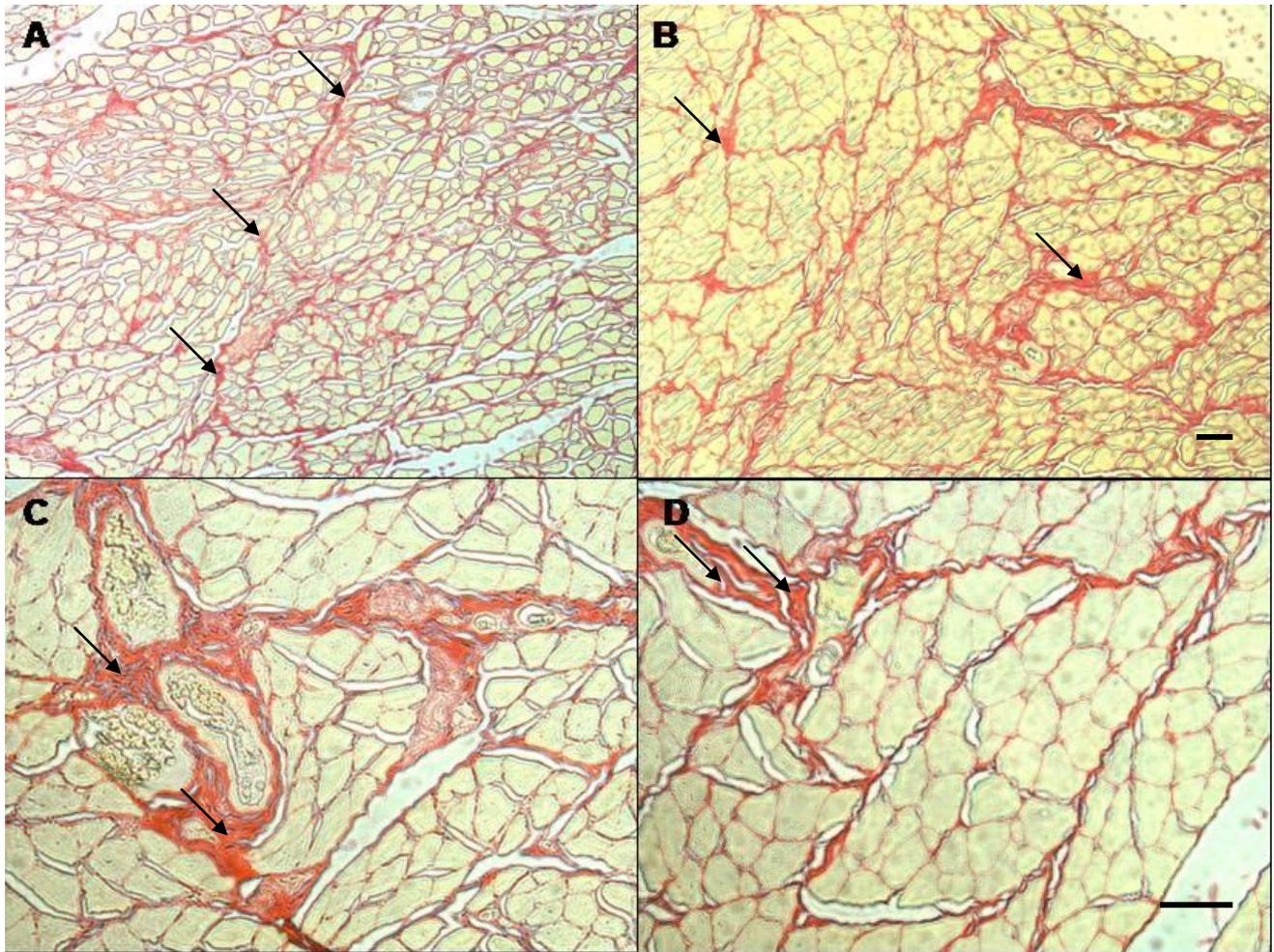


Figura 16 - Análise histológica do músculo *soleus* após 28 dias de tratamento. Os painéis A e C mostram a coloração com picrosírius nos aumentos de 10x e 20x dos músculos controle e os painéis B e D dos tratados, respectivamente. Note que os painéis A e B demonstram uma área de fibrose com característica interfibrilar (seta). Em detalhe, nos painéis C e D a deposição de colágeno perivascular (seta).

### 3.4.3. Detecção de quimerismo celular no músculo esquelético

Para confirmar a presença das células dos animais doadores no músculo hospedeiro, utilizamos a técnica de PCR em tempo real. Injetamos células de rato macho em músculos de fêmeas e rastreamos um fragmento do gene específico do cromossomo Y.

Para este protocolo, as células foram injetadas uma semana após o protocolo de lesão e a detecção foi realizada em 3 horas, 24 horas, 72 horas, 14 dias e 28 dias após a injeção. Para isso, retiramos os músculos e extraímos o DNA de acordo com o protocolo citado anteriormente (ver materiais e métodos).

As curvas de amplificação do gene alvo (SRY) foram normalizadas pelo gene constitutivo (GAPDH), e foi usada a técnica de comparação por  $\Delta\Delta\text{Ct}$  descrita por Livak *et al* (2001).

Os resultados evidenciaram que três horas após a injeção as AT-MSCs, encontramos aproximadamente 80% do sinal do gene Y nas amostras, relativo ao controle positivo (gráfico 7, figura 17). Após 24 horas, notamos que há um decréscimo evidente para 4% e se manteve decrescido após 72 horas de injeção (cerca de 2%). Em 14 dias e 28 dias após a terapia com AT-MSCs, o PCR em tempo real não foi capaz de detectar nenhum tipo de sinal específico do gene alvo (gráfico 7).

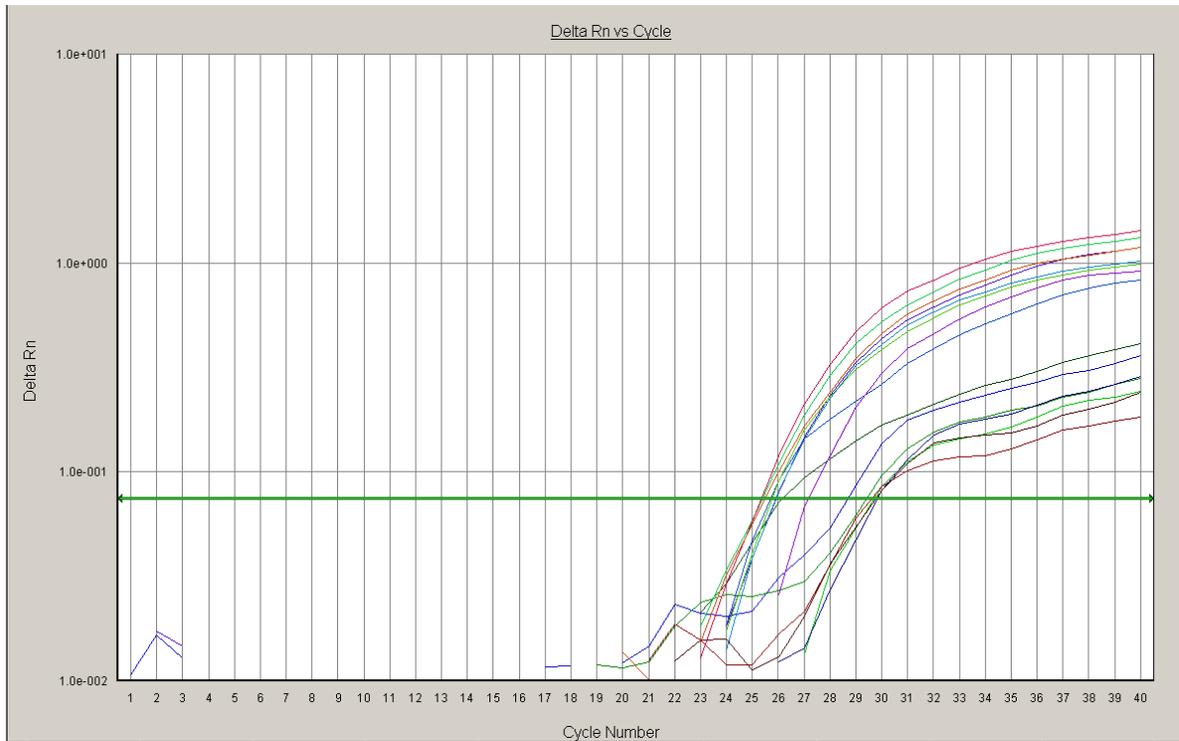


Figura 17 – PCR em tempo real. Curva de amplificação do SRY e GAPDH. A normalização dos produtos é gerada pela diferença entre o número de ciclos dos dois produtos e pelo sinal gerado pelo DNA do controle positivo ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ).

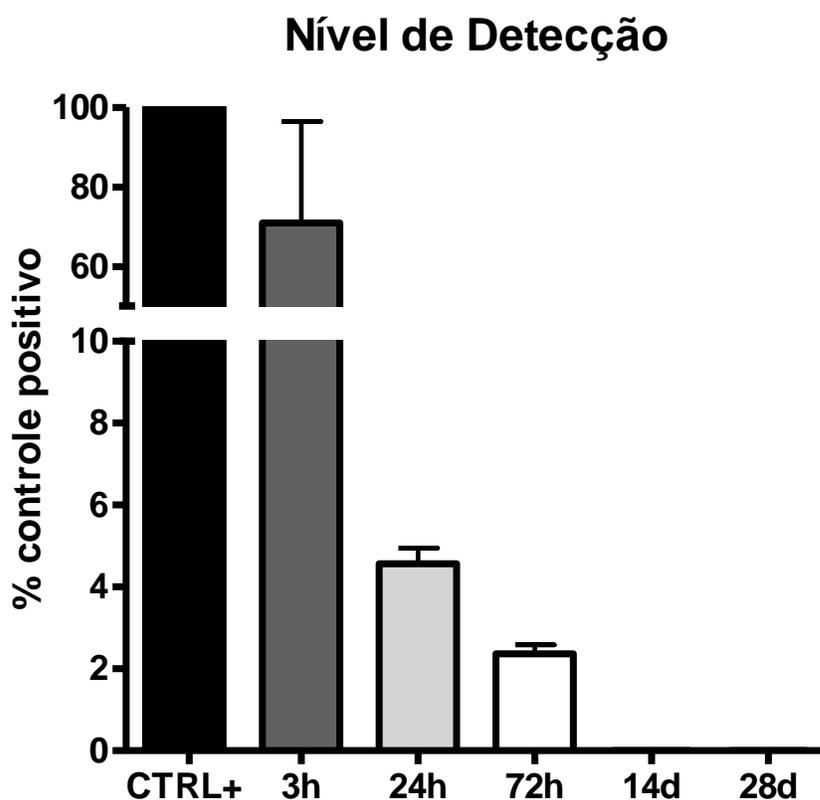


Gráfico 7 – Nível de detecção do fragmento do gene SRY relativo ao controle positivo (5 ng de DNA de AT-MSCs). Notamos um notório decréscimo do sinal do gene SRY de 3 horas para os tempos subseqüentes pós-injeção. Não observamos sinal do gene duas e quatro semanas pós-injeção.

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo revela que o transplante das AT-MSCs, 7 dias após a lesão muscular esquelética por laceração, gera um benefício no processo de regeneração, refletido pelo aumento na produção de força tetânica e no número de fibras com núcleo centralizado 14 dias pós-injeção. No entanto, não conseguimos observar uma diminuição na formação do tecido fibroso, assim como a melhora em todos os parâmetros analisados 28 dias pós-injeção.

Diversos trabalhos na literatura abordam a estrita relação entre as células mesenquimais da medula óssea e a sua capacidade de participar na regeneração muscular (Corbel *et al*, 2003; Dezawa *et al*, 2005; Poleskaya *et al*, 2003; Cao *et al*, 2003). Porém, não temos maior conhecimento sobre o potencial terapêutico das células de mesenquimais do tecido adiposo na regeneração muscular. Assim, o presente trabalho mostrou que o tratamento com células foi capaz de acelerar o processo regenerativo do músculo, apresentando uma melhora de aproximadamente 20% na capacidade funcional (Gráfico 4-B), em comparação ao músculo não tratado, 14 dias após o protocolo de lesão quando estimulados ao máximo (tetania). Para nossa surpresa, a produção de força frente a estímulos de baixa frequência (1 Hz) não foi diferente entre o grupo tratado e não tratado (Gráfico 4-A). Isso pode estar relacionado ao nosso modelo de análise funcional que foi o de músculo isolado. Neste modelo, as fibras musculares mais internas podem ser submetidas a condições fisiológicas diferentes das externas, como diferentes gradientes de oxigênio, gás carbônico, potássio e hidrogênio (Allen *et al*, 1995). Concomitantemente, algumas fibras mais internas podem não ser estimuladas suficientemente para deflagarem um potencial de

ação, ao passo que, na estimulação tetânica, é bem mais provável que todas as fibras musculares sejam estimuladas adequadamente. Não podemos descartar o efeito funcional da somação temporal nos músculos com mais fibras em regeneração (tratados).

#### **4.1 Sobrevivência das células no tecido hospedeiro**

A sobrevivência das células injetadas tem um importante papel na regeneração tecidual. Por isso, o tempo de transplante é crucial e discutido pelos pesquisadores da área de terapia celular, independente do tecido alvo (Hu et al, 2006). Em nosso trabalho, sétimo dia após a lesão foi escolhido, pois é o momento de declínio da intensidade do processo inflamatório, o processo de revascularização já restaurou grande parte da microcirculação e células em apoptose estão sendo removidas (Tidball et al, 1996). Diversos trabalhos demonstram que a injeção de células precursoras miogênicas logo após a lesão resulta numa taxa de sobrevivência muito baixa, próxima de 1%, já no quarto dia de injeção (Huard et al, 1994; Beauchamps et al, 1994; Fan et al, 1996; Holzer et al, 2005). Isso está relacionado a fatores humorais que são essenciais ao processo inflamatório durante os primeiros dias depois da lesão muscular (Tidball et al, 2005; Bondensen et al, 2004). Células NK (do inglês *Natural killer*) foram identificadas como uma das responsáveis pela limitação do transplante celular nos primeiros dias após a lesão. A revascularização muscular inicia-se no terceiro dia após lesão e o processo de fagocitose dos debris celulares das fibras mortas alcança seu máximo no quarto dia (Lefaucheur & Sebillé, 1995; Lefaucher et al, 1996). Portanto, a ruptura da microvasculatura muscular é um fator limitante a resposta regenerativa

nessa fase (Teixeira *et al*, 2005). Contudo, o insucesso na sobrevivência das células tem sido relacionado a diversos fatores além da resposta inflamatória, como o microambiente em hipóxia e a ausência dos sinais de sobrevivência do contato célula-célula e, além disso, a injeção intramuscular causa uma grande taxa de mortalidade devido à lesão mecânica e uma subsequente resposta inflamatória aguda (Hu *et al*, 2007).

Os resultados da detecção das AT-MSCs no músculo por PCR em tempo real demonstraram que há um decréscimo do sinal, ou seja, do número de células ao longo do tempo, o que resulta em uma ausência de sinal do gene SRY duas e quatro semanas após a injeção. Observamos que 3 horas após a injeção de células no ventre dos músculos lesionados, mais de 70% do sinal ainda era detectado, o que denota uma eficiente injeção e refuta a idéia de que as células não estavam presente no tecido nos tempos de 14 e 28 dias devido a injeção mal sucedida (Gráfico 6). Entretanto, o sinal detectado era muito pequeno no dia seguinte, em torno de 4%, e 2%, 72 horas pós-transplante. Consequentemente, não foi possível detectar sinal de células do doador no tecido hospedeiro 14 e 28 dias após tratamento.

Nesse sentido, o presente trabalho teve certas limitações, pois não avaliou a sobrevivência celular em outros tempos pós-lesão e muito menos em músculos não lesionados. Isso poderia nos responder se realmente o infiltrado inflamatório tem papel importante na sobrevivência celular. Mesmo na ausência de células, encontramos um maior número de fibras em regeneração (núcleos centralizados) nos animais tratados com AT-MSCs, 2 semanas após a injeção (Tabela 5).

## 4.2 Mecanismo de ação das AT-MSCs

Alguns mecanismos já foram propostos para explicar os benefícios da terapia celular. Primeiro, vários trabalhos demonstraram que as células do doador poderiam diferenciar-se em células do tecido hospedeiro e, assim, repopular a massa de tecido morto e impedir a deterioração adicional do órgão ou até regenerá-lo (Dezawa et al, 2005; Palermo et al, 2005). Entretanto, alguns autores mostraram que essa diferenciação poderia ser consequência da fusão, segundo mecanismo, das células injetadas com células hospedeiras (Cossu, 2004; Abedi et al, 2004). Em terceiro, mas não menos importante, discute-se a capacidade de regeneração tecidual induzida por fatores secretados pelas células administradas diretamente no tecido: o mecanismo parácrino.

Nossos resultados nos fizeram chegar a hipótese que o processo de regeneração pode ter sofrido uma modulação por fatores liberados pelas células enquanto permaneceram no tecido, mesmo que por um curto tempo. É sabido que várias citocinas tem importante papel no processo de regeneração do tecido muscular esquelético. Hayashi et al (2004) investigaram o papel dos fatores de crescimento HGF, IGF-1 em um modelo de regeneração muscular e a análise de RT-PCR revelou que há uma expressão de HGF e IGF-1 durante o processo de regeneração. Além disso, análises de imunohistoquímica demonstraram que o HGF é expresso quase majoritariamente por mioblastos durante os primeiros estágios de regeneração e sua adição em cultura de mioblastos inibe a formação de miotubos, promovendo proliferação celular. O IGF-1 é expresso por macrófagos e mioblastos já em fase de fusão e formação de miotubos, influenciando no processo de diferenciação. Em adição

a esses fatos, a proteína c-met (receptor do HGF) está presente em células satélites (Cornelison & Wold 1997; Tatsumi et al, 1998) e a adição do HGF em cultura de células satélites promove a entrada das células em divisão celular (Tatsumi et al, 1998).

Kinnaird *et al* (2004a e 2004b) desenvolveram uma seqüência de trabalhos demonstrando que células mesenquimais da medula óssea contribuíam para o aumento de formação de vasos colaterais via liberação de várias citocinas como VEGF e bFGF. Nos dois trabalhos, os autores lançaram mão do modelo de isquemia de pata em camundongos e utilizaram células mesenquimais de medula óssea. As células foram isoladas de tibia e femur, foram plaqueadas (72hs) e a população aderente ao frasco de cultura foi utilizada. Depois de cultivadas e replicadas, as células aderentes foram purificadas através da retirada de células positivas para CD34 e CD45. Além disso, estas células eram positivas para proteínas presentes em células mesenquimais. (CD44, CD90 e CD105). No primeiro trabalho, a injeção de células aumentou a produção de VEGF e bFGF no tecido hospedeiro e conseqüentemente melhorou a perfusão tecidual analisada por laser-doppler (Kinnaird, 2004a). Surpreendentemente, as poucas células encontradas no tecido e identificadas pela incorporação de eGFP através de adenovírus, não estavam incorporadas a células endoteliais. Além disso, eles verificaram que no meio de cultura das células mesenquimais de medula óssea, condicionado por 24 horas, apresentavam estes fatores e induziam proliferação de células endoteliais e musculares lisas em cultura, ação que era bloqueada por anticorpo anti-VEGF. No mesmo ano (Kinnaird *et al.* 2004b), os autores testaram a ação do próprio meio de cultura no modelo de isquemia de pata. Vinte e quatro, 48 e 72 horas após a isquemia, os animais receberam meio condicionado por, também, 72hs. Quatro semanas após a injeção, a perfusão das patas dos animais tratados era maior e havia

um maior número de capilares no tecido. Além disso, os autores mostraram que o meio condicionado de células mesenquimais de medula óssea de humanos exibiu um perfil parecido de liberação de citocinas, indução de proliferação e migração de células endoteliais. Quando as células eram colocadas em hipóxia, FGF2 e 7, IL1 e 6, PGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, tinham suas concentrações aumentadas no meio de cultura. Esse desafio de hipóxia é o ambiente encontrado pelas células injetadas no nosso modelo de lesão e pode ter sido um estímulo para secreção de fatores angiogênicos e de ativação de células precursoras musculares residentes, visto que encontramos maior número de fibras em regeneração nos animais tratados. Em modelo de isquemia permanente de coração, nosso laboratório demonstrou que a injeção de meio condicionado em hipóxia de células mesenquimais de medula óssea induz um discreto aumento na pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, e nos índices de contratilidade e relaxamento ventriculares em ratos não anestesiados (Fidelis *et al*, 2008). No nosso conhecimento, ainda não foi publicado algum trabalho com AT-MSCs e lesões musculares. O pioneirismo nos limita a discutir a terapia com AT-MSCs em outros modelos. Neste sentido, Rehman *et al* (2004) corroboraram os resultados encontrados por Kinnaird *et al* (2004a e 2004b), e ainda demonstraram que havia secreção em altos níveis de HGF e VEGF pelas AT-MSCs no meio de cultura. Junto a isso, foi observado que o meio condicionado das células derivadas do tecido adiposo contribuiu para uma maior proliferação de células endoteliais em cultura e aumentou a taxa de sobrevivência, evidenciado pelo menor número de células em apoptose. Os autores constataram maior proliferação de células endoteliais e maior taxa de sobrevivência quando foi usado o meio condicionado gerado em condições de hipóxia.

Mazo et al (2008) desenvolveram um trabalho com transplante de AT-MSCs em modelo de infarto crônico gerado por ligadura permanente da artéria coronária. Os resultados mostram que houve uma melhora funcional evidenciada pelo aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo um mês após a injeção das células. Porém, nenhuma célula do doador foi identificada no tecido, o que aumenta as especulações sobre os mecanismos de reparo. Interessantemente, eles verificaram que uma semana após o transplante, os benefícios na função cardíaca já eram evidentes e que menos de 0.5% das células ainda permaneciam no tecido. Nosso grupo também se propôs a estudar a injeção de AT-MSCs em modelo de infarto cicatrizado (dados ainda não publicados). O tratamento com AT-MSCs 28 dias após a oclusão permanente aumentou os parâmetros de contratilidade miocárdica, tais como fração de ejeção, fração de encurtamento de área, pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e os índices de contratilidade e relaxamento do ventrículo esquerdo, após 6 semanas de tratamento. Assim como o presente estudo com lesão muscular, nós não fomos capazes de encontrar AT-MSCs, previamente marcadas com o corante nuclear Hoesct, nos corações hospedeiros.

Na mesma linha de investigações, Nakagami et al (2006), confirmaram os achados de Rehman *et al* e acrescentaram achados interessantes. A viabilidade de células endotéliais em cultura foi estatisticamente maior usando meio condicionado das AT-MSCs. Para examinar os efeitos dos fatores de crescimento em cultura na viabilidade e migração de células endoteliais, foram usados anticorpos contra VEGF e HGF. Os resultados vistos foram a diminuição da viabilidade e migração celular entre 25 e 48% quando só um fator foi bloqueado, e os valores chegaram a níveis basais quando os dois fatores foram bloqueados.

Acrescentando importantes informações sobre as AT-MSCs e a liberação de fatores de crescimento, Sadat et al (2007) desenvolveram um trabalho similar a Rehman e Nakagami, porém adicionando cultura de cardiomiócitos. Os achados confirmam as observações prévias, mostrando que a co-cultura de cardiomiócitos neonatos com AT-MSCs em condições de hipóxia e privação de soro diminui a taxa de apoptose dos cardiomiócitos. Em um próximo ensaio, foi adicionado shRNA do IGF-1 e VEGF a cultura de AT-MSCs, silenciando a expressão dos fatores. Os resultados corroboram os achados de Nakagami com células endoteliais, demonstrando que cardiomiócitos em co-cultura com AT-MSCs demonstram um decréscimo da taxa de apoptose de 65.9% para 25%. Se a expressão do IGF-1 é bloqueada, a taxa sobe novamente para 62,5%, e com o bloqueio da expressão do VEGF, para 34,2% respectivamente.

Com o objetivo de avaliar a contribuição específica do HGF no processo de revascularização Cai et al (2007) realizaram ensaios in vitro com AT-MSCs e shRNA para silenciar a expressão do HGF. As AT-MSCs tranfectadas com o shRNA secretaram 80% menos HGF, o que levou a uma redução na capacidade de promover sobrevivência, proliferação e migração de células endoteliais em co-cultura. A avaliação funcional refletiu o que foi encontrado nos resultado in vitro. A supressão do HGF influenciou negativamente na capacidade das AT-MSCs em promover reperfusão no modelo de isquemia de pata.

Assim, observamos que inúmeros relatos ressaltam a importância do mecanismo parácrino para proliferação e sobrevivência de alguns tipos celulares. Até o momento, pelo nosso conhecimento, nenhum trabalho demonstrou a influências de fatores liberados pelas AT-MSCs na proliferação e fusão de células satélites.

### 4.3 Impacto da terapia com AT-MSCs na formação de fibrose

Na tentativa de esclarecer se a terapia com AT-MSCs era capaz de reduzir a fibrose muscular, fizemos a avaliação do colágeno através da coloração de picrossírus. O protocolo de lesão apresentado no presente trabalho produz uma cicatriz fibrótica, com a predominância de colágeno com distribuição caracteristicamente miofibrilar e perivascular (figuras 6 e 7). Além disso, o conteúdo de colágeno permanece aumentado por até 28 dias após o protocolo injeção (gráfico 3), independente do tratamento.

Nós não conseguimos observar redução de área de fibrose, sugerindo que a melhora obtida na função se deu por outro mecanismo e não pela diminuição de fibrose. A ativação e proliferação de células satélites induzem a fusão em miotubos e regeneração tecidual (Charge & Rudnicki, 2004), evidenciada por fibras com núcleo central. Portanto, podemos sugerir que nosso tratamento induziu o aparecimento de um número maior de fibras com núcleo central, provavelmente pela ativação da regeneração muscular. No curso natural das lesões musculares, a fibrose residual, entre o tecido em regeneração, predispõe a uma próxima lesão e reduz a capacidade funcional, o que ainda é um contra-tempo para clínica. Após a lesão, a fase inicial da regeneração é suprimida ao longo do tempo pela reposição do tecido fibroso (Bedair et al, 2008). Em alguns casos, associados a uma lesão severa, a cicatriz cria uma barreira mecânica que restringe completamente a regeneração das fibras através da lesão gerada (Jarvinen et al, 2005).

Pesquisadores tem aceitado de uma forma ampla que o TGF- $\beta$ 1 é um potente estimulador da formação de fibrose em vários tecidos (Waltenberger et al, 1993; Border & Noble, 1994; Yamamoto et al, 1994; Lijnen et al, 2000), e também associado a

formação de fibrose muscular (Li et al, 2004). Níveis de TGF-  $\beta$ 1 se encontram elevados tanto em modelos de distrofia muscular quanto de lesões musculares severas (Bernasconi et al, 1995; Gosselin et al, 2004). Pesquisadores tem demonstrado que o TGF- $\beta$ 1 induz efetivamente a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, bem como a produção de suas proteínas específicas, como fibronectina ED, vimentina, actina- $\alpha$  de músculo liso além do colágeno tipo 1, aumentando a mecanotransdução entre as células e a matrix extracelular gerando assim o remodelamento do tecido fibroso (Tomasek et al, 2002; Li et al, 2004). É importante ressaltar que a produção autócrina do TGF-  $\beta$ 1 por fibroblastos é crucial para manutenção da atividade fibrogênica após o termino da fase inflamatória (Kim et al, 1990; Schmid et al, 1998). Juntamente a isso, Li e colaboradores (2004) observaram que o TGF-  $\beta$ 1 tem importante papel na indução da diferenciação de células miogênicas em miofibroblastos durante a lesão muscular. Diversas terapias têm se mostrado efetivas no objetivo de combater a formação de fibrose por lesão. A decorina, um proteoglicano da matrix extracelular responsável por se ligar ao TGF- $\beta$ 1 (Fukushima et al, 2001; Sato et al, 2003; Hwang et al, 2006; Zhu et al, 2007; Li et al, 2007), a suramina, originalmente criada como uma droga antiparasitica, com a capacidade de se ligar ao receptor do TGF-  $\beta$ 1 (Chan et al, 2003-2005; Nozaki et al, 2008), o interferon- $\gamma$ , um potente inibidor da sinalização do TGF-  $\beta$ 1 (Foster et al, 2003) e mais recentemente, a halofuginona, inibidor da fosforilação de smad3 (segundo mensageiro do TGF-  $\beta$ 1) (Turgeman et al, 2008) e o losartan (bloqueador do AT1, receptor de angiotensina 2) (Bedair et al, 2008), se mostraram eficazes no processo de reparo muscular tanto funcionalmente com histologicamente, por bloquear a ação do TGF-  $\beta$ 1. No entanto, é

incerto se o TGF-  $\beta$ 1 age sozinho ou necessita da interação com outros mediadores durante a formação de fibrose.

A miostatina ou GDF-8, que foi inicialmente identificada como um regulador negativo do desenvolvimento muscular. Em estudo recente, no qual o camundongo mdx teve o gene da miostatina silenciado, não só demonstrou uma melhora na regeneração muscular como mas também exibiu uma diminuição na formação do tecido fibroso quando comparado com o mdx normal (Wagner et al, 2002). Esses resultados sugerem que a miostatina tem um importante papel na fibrose muscular. Zhu *et al* (2007) confirmam haver uma interação entre a miostatina e o TGF-  $\beta$ 1. Foi mostrado que a miostatina estimulava a proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, tanto quanto suas proteínas como fibronectina ED, actina- $\alpha$  de músculo liso, vimentina , HSP 47 além de colágeno tipo 1 (Li et al, 2008) e a decorina, citada anteriormente, tem a capacidade de estimular a produção de folistatina, um antagonista da miostatina. Adicionalmente, foi observado que a miostatina interfere na quimiotaxia de macrófagos para o sítio da lesão, reduzindo a sua migração, o que está relacionado com o processo de regeneração (McCroskery et al, 2005). Comparado com um camundongo normal, o knock-out para miostatina (MSTN  $-/-$ ) tem um recrutamento aumentado de macrófagos logo no início da fase de regeneração acelerando o processo de diferenciação de mioblastos (McCroskery et al, 2005).

Como membros da mesma família de fatores de crescimento, TGF- $\beta$ 1 e miostatina compartilham várias similaridades como estrutura, sinalização intracelular e função, descrito recentemente. Os mecanismos pelo qual a miostatina aumenta a proliferação de fibroblastos parecem estar ligados à expressão de ciclina D1, proteína chave para ativação do ciclo celular, de uma maneira dose dependente (Li et al, 2008).

De maneira oposta, aumentando a degradação de ciclina D1, a miostatina impede a proliferação e diferenciação de células musculares (Yang et al, 2006). Ambos os mecanismos ocorrem via ligação com o seu receptor ActRIIB. Essa ligação ativa uma cascata de sinalização, iniciando pela fosforilação de smad3 – p38 MAPK– Akt – mTOR logo em sequencia (Yang et al, 2006).

Dentre os trabalhos com terapia celular e lesões musculares esqueléticas, Matziolis *et al* (2006) demonstraram que células mesenquimais derivadas da medula óssea contribuíram para a melhora nas propriedades contráteis em músculos soleus de ratos Sprague-Dawley. No entanto, não avaliaram nenhum parametro histológico, como número de diâmetro de fibras em regeneração e deposição de colágeno. Natsu et al (2004), constataram uma melhora na produção de força um mês após a injeção de células mesenquimais de medula óssea no músculo tibial anterior de ratos sprague-dawley. Porém, seus resultados foram inconclusivos quanto a diferenciação das células injetadas em tecido muscular, endotelial ou nervoso no músculo lesionado. Da mesma forma que Matziolis *et al*, (2006), eles não avaliaram o conteúdo de colágeno no tecido.

O G-CSF é capaz de mobilizar células-tronco da medula óssea para o sangue periférico (Werneck de Castro *et al*, 2006) e já foi largamente utilizado na terapia de infarto do miocárdio, com resultados positivos (Orlic *et al*, 2001, Harada *et al*, 2005) e negativos (Werneck de Castro *et al*, 2006 e Deten *et al*, 2005). Stratos *et al* (2007), investigaram o tratamento com G-CSF, durante 14 dias consecutivos, logo após a indução de lesão muscular, em músculos soleus de ratos Wistar. O tratamento aumentou o número de células em proliferação no tecido muscular, evidenciado pela marcação com brdU, que é incorporado ao DNA de células que passaram pela fase de mitose do ciclo celular. Essa proliferação intensa só foi demonstrada 4 dias após o

tratamento e voltou aos valores controles 7 e 14 dias. Entretanto, 14 dias após o tratamento, os animais tratados exibiram maiores valores de tensão desenvolvida comparados aos animais controles. Esses dados corroboram os nossos achados, a medida que observamos maiores fibras em regeneração e uma maior contratilidade muscular 14 dias pós tratamento. Infelizmente, Stratus *et al*, (2007) não avaliaram o tratamento em períodos maiores de tempo. Quanto à formação de fibrose, o tratamento com G-CSF falhou em diminuir o acúmulo de colágeno, semelhante aos nossos resultados, embora a extensão de tecido cicatricial tivesse sido maior no nosso presente estudo. Em 2003, nosso laboratório demonstrou que o tratamento com células mesenquimais de medula óssea em modelo de lesão muscular sucessiva em ratos, foi incapaz de diminuir a formação de fibrose, muito embora tenhamos observado melhora na contratilidade muscular dos músculos tratados (de Andrade *et al*, 2003).

Portanto, os dados do nosso laboratório e os achados da literatura com terapia celular em lesões musculares nos levam a sugerir que o tratamento com células AT-MSCs pode acelerar o processo de regeneração muscular, provavelmente por mecanismos parácrinos. Entretanto, a terapia parece ser incapaz de reverter os estímulos para a formação de tecido cicatricial induzidos pela lesão muscular esquelética.

## 5. Conclusões

- O modelo de lesão por laceração foi efetivo, causando um decréscimo na produção de força e deposição de colágeno no tecido nos tempos avaliados.
- A injeção das AT-MSCs gerou um aumento na produção de força no tempo de 14 dias em 50 Hz, porém não foi encontrado diferença no tempo de 28 dias após a injeção.
- A injeção das AT-MSCs causou um aumento no número de fibras em regeneração, ou seja, fibras com núcleo centralizado no tempo de 14 dias e novamente o valores foram similares entre grupo do tempo de 28 dias pós-injeção, confirmando a aceleração da regeneração.
- Não foi observada diferença na deposição de colágeno entre os grupos em todos os tempos analisados.
- Após a injeção as células, a detecção só foi possível no tecido muscular em tempos mais recentes como 3 horas, 24 horas e 72 horas, e não conseguimos detectar em 14 e 28 dias pós-injeção.

## 6. PERSPECTIVAS

Buscando elucidar algumas questões citadas, nossas perspectivas são:

- Realizar um controle das lesões por análise ultrasonográfica.
- Analisar por morfometria a evolução do processo inflamatório e o diâmetro de fibras em regeneração.
- Analisar por microscopia confocal se há integração das células injetadas com o tecido muscular
- Analisar se o meio condicionado das AT-MSCs é capaz de modificar o processo de reparo do tecido muscular
- Injetar um fator capaz de bloquear a fibrose muscular causada pelas lesões.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABEDI, M.; GREER, D.A.; COLVIN, G.A.; DEMERS, D.A.; DOONER, M.S.; HARPEL J.A.; WEIER, H.U.; LAMBERT, J.F.; QUESENBERRY, P.J. Robust conversion of marrow cells to skeletal muscle with formation of marrow-derived muscle cell colonies: a multifactorial process. *Exp Hematol*. May;32(5):426-34, 2004.

ALLEN, D.G.; LA"NNEREGREN, J.; WESTERBLAD, H. Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Exp Physiol* 80:497–527, 1995.

ANDERSON, J.E. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *J Exp Biol*, 209(Pt 12):2276-92, 2006.

ASAKURA, A.; SEALE, P.; GIRGIS-GABARDO, A.; RUDNICKI, M.A. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 159(1): 123-134, 2002.

AHTIKOSKI A.M.; KOSKINEN S.O.; VIRTANEN P.; KOVANEN V.; TAKALA TE. Regulation of synthesis of fibrillar collagens in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 172(2):131-40, 2001.

ALISON, M.R.; POULSOM, R.; FORBES, S.; WRIGHT, N.A. An introduction to stem cells. *J Pathol*. 197(4):419-23, 2002.

AUST, L.; DEVLIN, B.; FOSTER, S.J.; HALVORSEN, Y.D.; HICOK, K.; DU LANEY, T.; SEN, A.; WILLINGMYRE, G.D.; GIMBLE, J.M. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, 6(1):7-14. 2004.

AYE, M.T.; HASHEMI, S.; LECLAIR, B.; ZEIBDAWI, A.; TRUDEL, E.; HALPENNY, M.; FULLER, V.; CHENG, G. Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured

endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). *Exp Hematol.* 20(4):523-7, 1992.

BACOU, F.; EL ANDALOUSI, R.B.; DAUSSIN, P.A.; MICALLEF, J.P.; LEVIN J.M.; CHAMMAS, M.; CASTEILLA, L.; REYNE, Y.; NOUGUÈS, J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 29(2):218-26. 2004.

BARTON-DAVIES, E.R.; SHOTURMA, D.I.; SWEENEY, H.L. Contribution of satellite cells to IGF-I induce hypertrophy of skeletal muscle. *Acta physiol scand*, 167: 301-305, 1999.

BARRY, F.P.; BOYNTON, R.E.; HAYNESWORTH, S.; MURPHY, J.M.; ZAIA, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 265(1):134-9, 1999.

BEAUCHAMPS, J.R., MORGAN, J.E. ; PAGEL, C.N. ; PARTRIDGE. T.A. Quantitative studies of efficacy of myoblast transplantation. *Muscle Nerve.* 18(Suppl.):261. 1994.

BEUCHAMP, J.R.; MORGAN, J.E.; PAGEL, C.N.; PATRIDGE, T.A. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *The journal of Cell Biology*, 144 (6): 1113-1121, 1999.

BEUCHAMP, J.R.; HESLOP, L.; YU, D.S.W.; TAJBAKHS, S.; KELLY, R.G.; WERNIG, A.; BUCKINGHAM, M.E.; PATRIDGE, T.A.; ZAMMIT, P.S. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *The journal of Cell Biology* 151 (6):1221-1233, 2000.

BEDAIR, H.S. ; KARTHIKEYAN, T. ; QUINTERO, A.; LI, Y.; HUARD, J. Angiotensin II receptor blockade administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal skeletal muscle. *Am J Sports Med*;36(8):1548-54. Epub 2008 Jun 11, 2008.

BERNASCONI, P.; TORCHIANA, E.; CONFALONIERI, P.; BRUGNONI, R.; BARRESI, R.; MORA, M.; CORNELIO, F.; MORANDI, L.; MANTEGAZZA, R. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest*;96(2):1137-44, 1995.

BHAGAVATI, S.; XU, W. Isolation and enrichment of skeletal muscle progenitors cells from mouse bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 318: 119- 124, 2004.

BILLINGTON, L. Reinnervation and regeneration of denervated rat soleus muscles. *Muscle & Nerve*, 20:744-746, 1997.

BISCHOFF, R. Regeneration of single skeletal muscles fibers in vitro. *Anat. Rec.*, 182: 215-236, 1970.

BISCHOFF, R. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *The journal of Cell Biology*, 111: 201-207, 1997.

BISCHOFF, R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Development* 109: 943-952, 1990.

BISCHOFF, R. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *The Journal of Cell Biology*, 111: 201-207, 1990.

BISCHOFF, R. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Develop. Biol*, 115: 140-147, 1986.

BOELSTERIL, U.A. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. *Drug Saf*, 25:633-648, 2002.

BOGDANOVICH, S.; KRAG, T.O.B.; BARTON, E.R.; MORRIS, L.D.; WHITTEMORE, L.A.; AHIMA, R.S.; KHURANA, T.S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, 420: 418- 421, 2002.

BONDESEN, B.A., MILLS, S.T., KEGLEY, K.M., AND PAVLATH, G.K. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C475, 2004.

BORDER, W.A.; NOBLE, N.A. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 10; 331: 1286- 1292, 1994.

BOSSOLASCO P.; CORTI S.; STRAZZER S.; BORSOTTI C.; DEL BO R.; FORTUNATO F.; SALANI S.; QUIRICI N.; BERTOLINI F.; GOBBI A.; DELILIERIS G.L.; PIETRO-COMI G.; SOLIGO D. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp Cell Res.* 295(1):66-78, 2004.

BRAZELTON, T.R.; NYSTROM, M.; BLAU, H.M. Significant differences among skeletal muscle in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Development Biology*, 262: 64-74, 2003.

BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat* 202: 59-68, 2003.

CAI, L.; JOHNSTONE, B.H.; COOK, T.G.; LIANG, Z.; TRAKTUEV, D.; CORNETTA, K.; INGRAM, D.A.; ROSEN, E.D.; MARCH, K.L. Suppression of hepatocyte growth factor

production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem cells*, 25:3234-3243, 2007.

CAMARGO, F.D.; GREEN, R.; CAPETENAKI, Y.; JACKSON, K.A.; GODELL, M.A. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature Medicine*, 9(12): 1520-1527, 2003.

CANTINI, M.; CARRARO, U. Macrophage-release factor stimulates selective myogenic cells in primary muscle culture. *Journal of Neurophathology and Experimental Neurology*, 54(1): 121-128, 1995.

CAO, B.; ZHENG, B.; JANKOWSKI, R.J.; KIMURA, S.; IKEZAWA, M.; DEASY, B.; CUMMINS J.; EPPERLY, M.; QU-PETERSEN, Z.; HUARD, J. Muscle stem cells differentiate into hematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nature Cell Biology*, 5(7): 640-646, 2003.

CHAMBERLAIN, S.; LEWIS, D.M. Contractile Characteristics and innervation ratio of rat soleus motor units. *Journal of Physiology*, 412:1-21, 1989.

CHAN, Y.S.; LI, Y.; FOSTER, W.; FU, F.H.; HUARD, J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med*; 33(1):43-51, 2005.

CHAN, Y.S.; LI, Y.; FOSTER, W.; HORAGUCHI, T.; SOMOGYI, G.; FU, F.H.; HUARD, J. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *Journal of Applied Physiology*, 95: 771-780, 2003.

CHARGÉ, S.B.P.; RUDNICKI, M. Cellular and molecular of muscle regeneration. *Physiological Reviews*, 84:209-238, 2004.

CHAZAUD, B.; SONNET, C.; LAFUSTE, P.; BASSEZ, G.; RIMANIOL, A.C.; PORON, F.; AUTHIER, F.J.; DREYFUS, P.A.; GHERARDI, R.K. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *The Journal of Cell Biology*, 163(5): 1133-1143, 2003.

COOPER R.N.; TAJBAKHS, S.; COSSU, V.; MOULY, V.; BUCKINGHAM, M.; BUTLER-BROWNE, G.S. In vivo satellite cell activation via myf5 and myod in regeneration mouse skeletal muscle. *Journal of Cell Science*, 112: 2895-1901, 1999.

CORBEL, S.Y.; LEE, A.; DUENAS, J.; BRAZELTON, T.R.; BLAU, H.M.; ROSSI, F.M.V. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nature Medicine*, 9(12): 1528-1532, 2003.

CORNELISON, D.D.W.; FILLA, M.S.; STANLEY, H.M.; RAPRAEGER, A.C.; OLWIN, B.B. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Development Biology*, 239: 79-94, 2001.

CORNELISON, D.D.W.; WOLD, B.J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Development Biology*, 191, 270-283, 1997.

GOSELIN LE, WILLIAMS JE, DEERING M, BRAZEAU D, KOURY S, MARTINEZ DA. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve*;30(5):645-53, 2004.

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

CREUZET, S.; LESCAUDRON, L.L.; LI, Z.; FONTAINE-PERÚS, J. MyoD, miogenin, and desmin-nls-lacZ transgene emphasize the distinct patterns of satellite cell activation in growth and regeneration. *Experimental Cell Research*, 243: 241- 253, 1998.

CRISCO, J.J.; JOKL, P.; HEINEN, G.; CONNELL, M.D.; PANJABI, M.M. A muscle contusion injury model. *The American Journal of Sports Medicine*, 22(5): 702-710, 1994.

CUI, L.; YIN, S.; LIU, W.; LI N.; ZHANG, W.; CAO, Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*, 13(6):1185-95, 2007.

DAVIES, R.L.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-1000, 1987.

DEASY B.M.; JANKOWSKI, R.J.; HUARD, J. Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 27(5): 924-933, 2001.

DE ANDRADE, B, WERNECK DE CASTRO, JPS.; PEÇANHA, R, FORTES,FSA, CONSORTI,K, AYMORÉ,I.; SUDO,G.Z.; CAMPOS DE CARVALHO, A.C.; GOLDENBERG,R.C.S. Avaliação do potencial terapêutico das células do estroma da medula óssea em lesão muscular esquelética de ratos. *Dissertação de doutorado- IBCCF-UFRJ*, 2003.

DE ANGELIS L.; BERGHELLA L.; COLETTA, M.; LATTANZI, L.; ZANCHI, M.; CUSELLA-De ANGELIS, M.; PONZETTO, C.; COSSU, G. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic

markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol* 147(4): 869-877, 1999.

DETEN, A.; VOLZ, H.C.; CLAMORS, S.; LEIBLEIN, S.; BRIEST, W.; MARX, G.; ZIMMER, H.G. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res*, 65(1):52-63. 2005.

DE UGARTE, D.A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P.A.; ZHU, M.; DRAGOO, J.L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M.H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174(3):101-9. 2003.

DEZAWA, M.; ISHIKAWA, H.; ITOKAZU, Y.; YOSHIHARA, T.; HOSHINO, M.; TAKEDA, S.; IDE, C.; NABESHIMA, Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 8;309(5732):314-7, 2005.

DI ROCCO, G.; IACHININOTO, M.G.; TRITARELLI, A.; STRAINO, S.; ZACHEO, A.; GERMANI, A.; CREA, F.; CAPOGROSSI, M.C. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*, 15;119(Pt 14):2945-2952, 2006.

FAN, Y., MALEY, M.; BEILHARZ, M.; GROUNDS, M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve*. 19:853–860, 1996.

FEENSTRA, J.; GROBBEE, D.E.; MOSTERD, A.; STRICKER, B.H. Adverse cardiovascular effects of NSAIDs in patients with congestive heart failure. *Drug Saf*, 17:166-180, 1997.

FERRARI G.; CUSELLA-De ANGELIS, M.; COLETTA, M; PAOLUCCI E.; STORNAIUOLO, A; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530, 1998.

FIDELIS, P. Células multipotentes mesenquimais estromais de medula óssea secretam fatores solúveis capazes de promover cardioproteção in vivo e in vitro. Tese de doutorado-IBCCF-UFRJ, 2008.

FIELDING, R.A.; MANFREDI, T.J.; DING, W.; FIATARONE, M.A.; EVANS, W.J.; CANNON, J.G. Acute phase response in exercise III. Neutrophil and IL-1 $\beta$  accumulation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 34: R166-R172, 1993.

FISHER, B.D.; BARACOS, V.E.; SHNITKA, T.K.; MENDRYK, S.W.; REID, D.C. Ultrastructural events following acute muscle trauma. *Medicine and Science of Sports and Exercise*, 22(2):185-193, 1990.

FLOSS, T.; ARNOLD, H.H.; BRAUN, T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes & Development* 11: 2040-2051, 1997.

FOIDART, M.; FOIDART, J.M.; ENGEL, W.K. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol.* 38(3):152-7, 1981.

FOSTER W, LI Y, USAS A, SOMOGYI G, HUARD J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J Orthop Res*; 21(5):798-804, 2003.

FRANCIS-WEST, P.H.; ANTONI, L.; ANAKWE, K. Regulation of myogenic differentiation in the developing limb bud. *J. Anat* 202: 69-81, 2003.

FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA, J.F.; KULAGINA, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5):267-74, 1976.

FRIEDENSTEIN, A.J.; IVANOV-SMOLENSKI, A.A.; CHAJLAKJAN, R.K.; GORSKAYA, U.F.; KURALESOVA, A.I.; LATZINIK, N.W.; GERASIMOW, U.W. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp Hematol*, 6(5):440-4, 1978.

FUKUSHIMA K, BADLANI N, USAS A, RIANO F, FU F, HUARD J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med*. 29(4):394-402, 2001.

GARDNER, R. Stem cells and regenerative medicine: principles, prespects and problems. *C.R.Biologies*, 330:465-473, 2007.

GIMBLE, J.M. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 3(5):705-13, 2003.

GOLDRING, K.; PATRIDGE, T.; WATT, D. Muscle stem cells. *Journal of pathology*, 197: 457-467, 2002.

GROUND M.D. Towards Understanding skeletal muscle regeneration. *Path Res Pract*, 187:1-22, 1991.

GROUND, M.D.; WHITE, J.D.; ROSENTHAL, N.R.; BOGOYEVITCH, M.A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *The Journal of Histology & Cytochemistry*, 50(5): 589-610, 2002.

GU, L; ZHU, Y.J.; YANG, X.; GUO, Z.J.; XU, W.B.; TIAN, X.L. Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation. *Acta Pharmacol Sin*. 28(3):382-91, 2007.

GULATI, A.K.; REDDI, H.; ZALEWSKI, A.A. Changes in the basement membrane zone components during skeletal muscle fiber degeneration and regeneration. *The Journal of Cell Biology*, 97: 957-962, 1983.

GULATI, A.K. Pattern of skeletal muscle regeneration after reautotransplantation of regenerated muscle. *J Embryol Exp Morph* 92: 1-10, 1986.

GUSSONI, E.; SONEOKA, Y.; STRICKLAND, C.D.; BUZNEY E.A; KHAN M.K.; FLINT, A F.; KUNKEL, L.M.; MULLIGAN, R.C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394, 1999.

GUSSONI E.; BENNETT R.R.; MUSKIEWICZ K.R.; MEYERROSE T.; NOLTA J.A.; GILGOFF I.; STEIN J.; CHAN Y.M.; LIDOV H.G.; BONNEMANN C.G.; VON-MOERS A.; MORRIS G.E.; DEN J.T.; CHAMBERLAIN J,S., KUNKEL LM.; WEINBERG K. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *Clin Invest*. 110(6):807-14, 2001.

HARADA, M.; QIN, Y.; TAKANO, H.; MINAMINO, T.; ZOU, Y.; TOKO, H.; OHTSUKA, M.; MATSUURA, K.; SANO, M.; NISHI, J.; IWANAGA. K.; AKAZAWA, H.; KUNIEDA, T.; ZHU, W.; HASEGAWA, H.; KUNISADA, K.; NAGAI, T.; NAKAYA, H.; YAMAUCHI-TAKIHARA, K.; KOMURO, I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med*, 11(3):305-11. 2005

HAYASHI, S.; ASO, H.; WATANABE, K.; NARA, H.; ROSE, M.T.; OHWADA, S.; YAMAGUCHI, T. Sequence of IGF-1, IGF-2, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Histochem Cell Biol*.122:427-434, 2004.

HAWKE, T.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology*, 91: 534-551, 2001.

HERBISON G.J.; JAWEED, M.M.; DITUNNO, J.F. Muscle fiber atrophy after cast immobilization in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 59:301-305, 1978.

HIGUCHI I.; HORIKIRI T.; NIIYAMA T.; SUEHARA M.; SHIRAIISHI T.; HU J.; UCHIDA Y.; SAITO A.; NAKAGAWA M.; ARIMURA K.; OSAME M. Pathological characteristics of skeletal muscle in Ullrich's disease with collagen VI deficiency. *Neuromuscul Disord.* 13(4):310-6, 2003.

HILL, M.; WERNIG, A.; GOLDSPINK, G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *Journal of Anatomy*, 203: 89-99, 2003.

HIRSCHOWITZ, B.I.; LANAS, A. NSAID association with gastrointestinal bleeding and peptic ulcer. *Agents Actions Suppl.* 35:93-101, 1991.

HOLZER, N., HOGENDOORN, S., ZURCHER, L., GARAVAGLIA, G., YANG, S., KONIG, S., LAUMONIER, T., AND MENETREY, J. Autologous transplantation of porcine myogenic precursor cells in skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 237, 2005.

HONDA, H.; KIMURA, H.; ROSTAMI, A. Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. *Immunology*, 70:272-277, 1992.

HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.J.; KRAUSE, D.S.; KEATING, A.; THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5):393-5, 2005.

HUARD, J.; ROY, R.; GUÉRETTE, B.; VERREAULT, S.; TREMBLAY, G.; TREMBLAY, J.P. Human myoblast transplantation in immunodeficient and immunosuppressed mice: evidence of rejection. *Muscle Nerve*,17(2):224-34, 1994.

HU X, WANG J, CHEN J, LUO R, HE A, XIE X, [LI J](#). Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg*, 31(3):438-43. Epub Jan 17, 2007.

HURME, T.; KALIMO, H.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 23(7): 801-810,1991.

HWANG, J.H.; RA, Y.J.; LEE, K.M.; LEE, J.Y.; GHIL, S.H. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. *Arch Phys Med Rehabil*; 87(1):20-6, 2006.

IRINTCHEV, A.; LANGER, M.; ZWEYER, M.; THEISEN, R.; WERNIG, A. Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *Journal of Physiology*, 500: 775-785, 1997.

JANKOWSKI, R.J.; HALUSZCZAK, C.; TRUCCO, M.; HUARD, J. Flow cytometric characterization of myogenic cell populations obtained via preplate technique: Potential for rapid isolation of muscle-derived stem cells. *Human Gene Therapy*, 12: 619-628, 2001.

JANKOWSKI, R.J.; DEASY, B.M.; CAO, B.; GATES, C.; HUARD, J. The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *The Journal of Cell Science*, 115: 4361-4374, 2002.

JACKSON K.A; MI, T.; GOODELL, M.A Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc natl acad sci* 96 (25): 14482-14486, 1999.

JÄRVINEN, T.A.; JÄRVINEN, T.L.; KÄÄRIÄINEN, M.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*;33(5):745-64, 2005.

JENNISCHE, E.; SKOTTNER, A.; HANSSON, H.A. Satellite cells express the trophic factor IGF-I in the regenerating skeletal muscle. *Acta physiol scand*, 129: 9-15, 1987.

JOHNSTONE, B.; HERING, T.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M.; YOO, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 10;238(1):265-72, 1998.

KÄÄRIÄINEN, M.; KÄÄRIÄINEN, J.; TEPPONEN, L.N.; JÄRVINEN, N.; SIEVÄNEN, H.; KALIMO, H.; JÄRVINEN, M. Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *Journal Orthopedics Research*, 16(2): 197-206, 1998.

KABLAR, B.; KRASTER, K.; YING, C.; ASAKURA, A.; TAPSCOTT, S.J. MyoD and Myf5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development*, 124:4729-4738, 1997.

KASEMKIJWATTANA, C.; MENETREY, J.; SOMOGYI, G.; MORELAND, M.S.; FU, F.H.; BURANAPANITKIT, B.; WATKINS, S.C.; HUARD, J. Development approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplantation*, 7: 585-598, 1998.

KIM, S.J.; ANGEL, P.; LAFYATIS, R. Autoinduction of transforming growth factor  $\beta$ 1 is mediated by AP-1 complex. *Mol Cell Biol*, 10: 1492-1497, 1990.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S.; LEE, C.W.; BARR, S.; FUCHS, S.; EPSTEIN, S.E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*, 19; 94(5):678-85. Epub 2004 Jan 22.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S.; SHOU, M.; LEE, C.W.; BARR, S.; FUCHS, S.; EPSTEIN, S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. Mar 30;109(12):1543-9, Epub 2004. Erratum in: *Circulation*. Jul 26;112(4):e73, 2005.

KOVACS, E.; DiPIETRO, L. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *The FASEB Journal*, 8:854-860, 1994.

KNIPPENBERG, M.; HELDER, M.N.; DOULABI, B.Z.; SEMEINS, C.M.; WUISMAN, P.I.; KLEIN-NULEND, J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng*, 11(11-12):1780-8, 2005.

KULKARNI, A.B.; HUH, C.G.; BECKER, D.; GEISER, A.; LYGHT, M.; FLANDERS, K.C.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; WARD, J.M.; KARLSSON, S. Transforming growth factor  $\beta$ 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *PNAS*, 90: 770- 774, 1993.

KUREK, J.B.; BOWER, J.J.; ROMANELLA, M.; KOENTGEN, F.; MURPHY, M.; AUSTIN, L. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle & Nerve*, 20: 815-822, 1997.

LABARGE, M.A.; BLAU, H.M. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111: 589-601, 2002.

LAUNAY T.; ARMAND, A.S.; CHARBONNIER, F.; MIRA, J.C.; DONSEZ, E.; GALLIEN, C.L.; CHANOINE, C. Expression and neural control of myogenic regulatory factor genes during regeneration of mouse soleus. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(7): 887-899, 2001.

LAZERGES, C.; DAUSSIN, P.A.; COULET, B.; ANDALOUSI, R.B.; MICALLEF, J.P.; CHAMMAS, M.; REYNE, Y.; BACAU, F. Transplantation of primary satellite cells improves properties of reinnervated skeletal muscles. *Muscle Nerve*, 29: 218-226, 2004.

LEE J.Y.; QU-PETERSEN, Z.; CAO, B.; KIMURA, S.; JANKOWSKI, R.; CUMMINS, J.; USAS, A.; GATES, C.; ROBBINS, P.; WERNIG, A.; HUARD, J. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *The Journal of Cell Biology*, 150(5):1085-1099, 2000.

LEE, J.H.; KEMP, D.M. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochemical and biophysical research communications*, 341: 882-888, 2006.

LEFAUCHEUR, J.P.; SÉBILLE, A. Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor  $\beta$ 1 or insulin-like growth factor I. *Journal of Neuroimmunology*, 57: 85-91, 1995.

LEFAUCHEUR, J.P.; GJATA, B.; LAFONT, H.; SEBILLE, A. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, transforming growth factor  $\beta$ 1 or insulin-like growth factor I. *Journal of Neuroimmunology*, 70:37-44, 1996.

LEHTO M.; SIMS T.J.; BAILEY AJ. Skeletal muscle injury--molecular changes in the collagen during healing. *Res Exp Med* 185(2):95-106, 1985.

LI, Y.; HUARD, J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injury skeletal muscle. *American Journal of Pathology*, 161(3): 895-907, 2002.

LI, Y.; FOSTER, W.; DEASY, B.M.; CHAN, Y.; PRISK, V.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. Transforming Growth Factor-1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells

into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol*, 164(3):1007-19, 2004.

LI, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. Muscle injury and repair. *Current Opinion in Orthopaedics*, 12: 409-415, 2001.

LI, Z.B.; KOLLIAS, H.D.; WAGNER, K.R. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem*, 11; 283(28):19371-19378, 2008.

LIGHT, N.; CHAMPION, A.E. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J*. 219: 1017- 1026, 1984.

LIJNEN, P.J.; PETROV, V.V. FAGARD, R.H. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*;71(1-2):418-35, 2000.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*, 25(4):402-8, 2001.

LOEFFLER, M.; BRATKE, T.; PAULUS, U.; LI, Y.Q.; POTTEN, C.S. Clonality and life cycles of intestinal crypts explained by a state dependent stochastic model of epithelial stem cell organization. *J Theor Biol*. 7;186(1):41-54, 1997.

MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; MURPHY, J.M.; BARRY, F.P.; CHICHESTER, C.O.; PITTENGER, M.F. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 4(4):415-28, 1998.

MACCONNACHIE H.F.; ENESCO M.; LEBLOND C.P. The mode of increase in the number of skeletal muscle nuclei in the postnatal rat. *Am J Anat*. 114:245-53, 1964.

MAJKA, S.M.; JACKSON, K.A.; KIENSTRA, K.A.; MAJSKY, M.W.; GOODELL, M.A.; HIRSCHI, K.K. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(1): 71-79, 2003.

MARKERT, CD.; MERRICK, M.A.; KIRBY, T.E.; DEVOR, S.T. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Arch Phys Med Rehabil*, 86(7):1304-10, 2005

MARSH, D.R.; HINDS, L.R.; LESTER, W.S.; REINKING B.E.; BOOTH, F.W. The force frequency relationship is altered in regenerating and senescent rat skeletal muscle. *Muscle and nerve*, 21: 1265-1274, 1998.

MATZIOLIS, G.; WINKLER, T.; SCHASER, K.; WIEMANN, M.; KROCKER, D.; TUISCHER, J.; PERKA, C.; DUDA, G. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Engineering*. 12(2):361-367, 2006.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle. *Journa of Biophysical Biochemistry Cytology*, 9: 493-496, 1961.

MAYNE, R.; SANDERSON, R.D. The extracellular matrix of skeletal muscle. *Collagen Rel. Res.* 5: 449-468, 1985.

MAZO M, PLANAT-BÉNARD V, ABIZANDA G, PELACHO B, LÉOBON B, GAVIRA JJ, PEÑUELAS I, CEMBORAIN A, PÉNICAUD L, LAHARRAGUE P, JOFFRE C, BOISSON M, ECAY M, COLLANTES M, BARBA J, CASTEILLA L, PRÓSPER F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*, 10(5):454-62, 2008.

MCCROSKERY S, THOMAS M, PLATT L, HENNEBRY A, NISHIMURA T, MCLEAY L, SHARMA M, KAMBADUR R. Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J Cell Sci.* 1;118(Pt 15):3531-41, 2005.

MCCROSKERY, S.; THOMAS M.; MAXWELL, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Cell Biol.* 162(6):1135-47, 2003.

McKINNEY-FREEMAN, S.; JACKSON, K.A.; CAMARGO, F.D.; FERRARI, G.; MAVILIO, F.; GODELL, M.A. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *PNAS* 99(3): 1341-1346, 2002.

MCLENNAN, I.S. Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. *Cell Tissue Res*, 272(1):193-6, 1993.

MCLENNAN, IS.; KOISHI, K. Cellular localisation of transforming growth factor-beta 2 and -beta 3 (TGF-beta2, TGF-beta3) in damaged and regenerating skeletal muscles. *Dev Dyn*, 208(2):278-89, 1997.

McLENNAN, I. Localization of transforming growth factor beta 1 in developing muscles: implications for connective tissue and fiber type pattern formation. *Development Dyamics*, 197: 281-290, 1993.

McLENNAN, I; KOISHI, K. Cellular localization of transforming growth factor-beta 2 and -beta3 (TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) in damaged and regenerating skeletal muscles. *Development Dyamics*, 208: 278-289, 1997.

McPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in myostatin gene . *PNAS* 94: 12457- 12461, 1997.

MEIER, T.; RUEGG, M.A. The role of dystroglycan and its ligands in physiology and disease. *News Physiological Science*, 15:255-259, 2000.

MENETREY J.; KASEMKIJWATTANA, C.; FU, F.; MORELAND, M.S.; HUARD, J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. *The American Journal of Sports Medicine*, 27(2): 222-229, 1999.

MENETREY J.; KASEMKIJWATTANA, C.; DAY, C.S.; BOSCH, P.; VOGT, M.; FU, F.H.; MORELAND, M.S.; HUARD, J. Growth factors improve muscle healing in vivo. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 82-B: 131-137, 2000.

MILLER, K.J.; THALLOOR, D.; MATTESON, S.; PAVLATH. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 278: C1740- C181, 2000.

MITCHELL, J.B.; MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S. FLOYD, Z.E.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; STORMS, R.W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J.M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 24(2): 376-85. 2006.

MIZUNO, H.; ZUK, P.A.; ZHU, M.; LORENZ, H.P.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells.. *Plast Reconstr Surg.*;109(1):199-209; discussion 210-1, 2002.

MOORE, K.L.; AND PERSAUD, T.V.N. "The Developing Human, Clinically Oriented Embryology, 5th ed." Philadelphia: W.B. Saunders, Co., pp 53-75, 1993.

MORGAN, J.E.; PATRIDGE, T.A. Muscle satellite cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 1151-1156, 2003.

MOSS F.P.; LEBLOND, C.P. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec*. 170(4):421-35, 1971.

MISSHRA, K.; FRIDÉN, J.; SCMITZ, M.C.; LIEBER, R.L. Anti-inflammatory medication after muscle injury. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 77-A: 1510-1518, 1995.

MUTSAERS, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G.L. Mechanism of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 29(1): 5-17, 1997.

NAKAGAMI, H.; MAEDA, K.; MORISHITA, R.; IGUCHI, S.; NISHIKAWA, T.; TAKAMI, Y.; KIKUCHI, Y.; SAITO, Y.; TAMAI, K.; OGIHARA, T.; KANEDA, Y. Novel Autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vas Biol*. 25:2542-2547, 2005.

NAKAGAMI, H.; MORISHITA, R.; MAEDA, K.; KIKUCHI, Y.; OGIHARA, T.; KANEDA, Y.J.; *Atheroscler Thromb*. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. 13 (2):77-81, 2006.

NATSU K, OCHI M, MOCHIZUKI Y, HACHISUKA H, YANADA S, YASUNAGA Y. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng*; 10(7-8):1093-112, 2004.

NEUBAUER, M.; HACKER, M.; BAUER-KREISEL, P.; WEISER, B.; FISCHBACH, C.; SCHULZ, M.B.; GOEPFERICH, A.; BLUNK, T. Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor in vitro. *Tissue Eng*, 11(11-12):1840-51, 2005.

NOONAN, T.J.; GARRETT, W.E. Muscle strain injury: diagnosis and treatment. *J. Am. Acad. Orthop. Surg*, 7: 262-269, 1999.

NOZAKI, M.; LI, Y.; ZHU, J.; AMBROSIO, F.; UEHARA, K.; FU, F.H.; HUARD, J. Improved Muscle Healing After Contusion Injury by the Inhibitory Effect of Suramin on

Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth. *Am J Sports Med.* 25, 2008 .[Epub ahead of print]

NUTTALL, M.E.; PATTON, A.J.; OLIVERA, D.L.; NADEAU, D.P.; GOWEN, M. Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res.* 13(3):371-82,1998.

OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; YOSHINAGA, K.; HAYASHI, S.; KUNISADA, T.; NAKAO, J.; KINA, T.; SUDO, T.; KODAMA, H.; NISHIKAWA, S. Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development,* 117(3):1089-98, 1993.

O'DRISCOLL, S.W. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am,* 80(12):1795-812, 1998.

OLIVARES EL, RIBEIRO VP, WERNECK DE CASTRO JP, RIBEIRO KC, MATTOS EC, GOLDENBERG RC, MILL JG, DOHMANN HF, DOS SANTOS RR, DE CARVALHO AC, MASUDA MO. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(2):H464-70, 2004.

ORCHARD, J.; BEST, T.M. The management of muscle strain injuries: an early return versus the risk of recurrence. *Clinical Journal of Sports medicine,* 12:3-5, 2002.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK, I.; QUAINI, F.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98(18):10344-9, 2001.

PALERMO, A.T.; LABARGE, M.A.; DOYONNAS, R.; POMERANTZ, J.; BLAU, H.M. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*,15;279(2):336-44, 2005.

PATRICK, C.W JR.; CHAUVIN, P.B.; HOBLEY, J.; REECE, G.P. Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng.* 5(2):139-51, 1999.

PATTEN, B.M. "Early Embryology of the Chick, 5th ed." New York: McGraw-Hill, Inc., pp 74, 87-90, 1971.

PENG H.; HUARD, J. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transplant Immunology* 12(3-4): 311-319, 2004.

PETROF, B.J. The molecular basis of activity-induce muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 179: 111-123, 1998.

PIERRE, B.A.; TIDBALL, J.G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *Journal of Applied Physiology*, 77(1): 290-297, 1994.

PINNEY D.; PEARSON-WHITE, S.; KONIECZNY, S.F.; LATHAM, K.E.; EMERSON C.P. Myogenic lineage determination and differentiation: evidence for a regulatory gene pathway. *Cell* 53(3): 781-793, 1988.

POLESSKAYA, A.; SEALE, P.; RUDNICKI, M.A. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45<sup>+</sup> adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113: 841-852, 2003.

PORTER J.D.; KHANNA S.; KAMINSKI H.J.; RAO J.S.; MERRIAM A.P; RICHMONDS C.R.; LEAHY P.; LI J.; GUO W.; ANDRADE FH. A chronic inflammatory response

dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 11(3):263-72, 2002.

POSTLETHWAITE AE, KESKI-OJA J, MOSES HL, KANG AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *Exp Med.* 165(1):251-6, 1987.

POWNALL, M.E.; GUSTAFSSON, M.K.; EMERSON, C.P. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18:747-83, 2002.

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. *The Journal of Cell Biology*, 157(5): 851-864, 2002.

RAWLS, A; VALDEZ M.R.; ZHANG, W.; RICHADSON, J.; KLEIN, W.H.; OLSON, E.N. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development* 125: 2349-2358, 1998.

REHMAN, J.; TRAKTUEV, D.; LI, J.; MERFELD-CLAUS, S.; TEMM-GROVE, CJ.; BOVENKERK, JE.; PELL, CL.; JOHNSTONE, BH.; CONSIDINE, RV;; MARCH, KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109:1292-1298, 2004.

RIVIER, F.; ALKAN, O.; FLINT, A.F.; MUSKIEWICZ, K.; ALLEN, P.D.; LEBOULCH, P.; GUSSONI, E. Role of bone marrow cell trafficking in replenishing skeletal muscle SP and MP cell populations. *Journal of Cell Science*, 117: 1979-1988, 2004.

RODRIGUEZ, A.M.; ELABK, C.; AMRI, E.Z.; AILHAUD, G;; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 87:125-128, 2005.

RODRIGUEZ, A.M.; PISANI, D.; DESHESNE, C.A.; CAREL, C.T.; KURZENNE, J.Y.;  
WDZIEKONSKI, B.; VILLAGEOIS, A.; BAGNIS, L.; BREITTMAYER, J.P.; GROUX, H.;  
AILHAUD, G.; DANI, C. Transplantation of a multipotent cell population from human  
adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx  
mouse. *JEM*, 201(9):1397-1405, 2005.

ROBERTSON, T.A.; GOUNDS, M.D.; PAPADIMITRIOU, J.M. Elucidation of aspects of  
murine skeletal muscle regeneration using local and whole body irradiation. *J anat*, 181:  
265-276, 1992.

ROBERTSON, T.A.; MALEY, M.A.L.; GROUNDS, M.D.; PAPADIMITRIOU, J.M. The  
role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to  
chemotaxis. *Experimental Cell Research*, 207: 321-331, 1993.

ROSENBLATT, J.D.; YONG, D.; PARRY, D.J. Satellite cell activity is required for  
hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle and nerve*, 17: 608-613, 1994.

RUDINICKI, M.; SCHNEGELSBERG, P.N.; STEAD, R.H.; BRAUN, T. ARNOLD, H.H.;  
JAENISCH, R. MyoD or Myf5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:  
1351-1359, 1993.

RUDINICKI, M.; BRAUN, T.; HINUMA, S.; JAENISH R. Inactivation of MyoD in mice  
leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf5 and results in apparently normal  
muscle development. *Cell* 71: 383-90, 1992.

RUSSELL, B.; DIX, D.J.; HALLER, D.L.; JACOBS-EL J. Repair of injured skeletal  
muscle: a molecular approach. *Medicine and Science of Sports and Exercise*, 24(2):  
189-196, 1992.

RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth facto  
activities. *Cell*, 64: 867-869, 1991.

SAVOLEINEN, J.; YAANANEN, K.; VIHKO, V.; PURAMEN, J.; TAKALA, T.E. Effect of immobilization on collagen synthesis in rat skeletal muscles. *Am J Physiol.* 252(5 Pt 2):R883-8, 1987.

SABOURIN, A; RUDNICK, M.A. The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics*, 57: 16-25, 2000.

SABOURIN, A; GIRGIS-GABARDO, A; SEALE, P.; ASAKURA, A; RUDNICK, M.A. Reduced differentiation potential of primary MyoD <sup>-/-</sup> myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 144(4): 637-643, 1999.

SADAT, S.; GEHMERT, S.; SONG, Y.H.; YEN, Y.; BAI, X.; GAISER, S.; KLEIN, H.; ALT, E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*; 363(3):674-9. Epub Sep 24, 2007.

SAKAGUCHI, Y.; SEKIYA, I.; YAGISHITA, K.; MUNETA, T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 52(8):2521-9, 2005.

SATO, K.; LI, Y.; FOSTER, W.; FUKUSHIMA, K.; BADLANI, N.; ADACHI, N.; USAS, A.; FU, F.H.; HUARD, J. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve*, 28: 365-372, 2003.

SCHMALBRUCH, H.; HELLHAMMER, U. The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec*,189(2):169-75, 1977.

SCHMID, P.; ITIN, P.; CHERRY, G.; BI, C.; COX, D.A. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol*; 152(2):485-93, 1998.

SEALE, P.; ASAKURA, A.; RUDINICK, M.A. The potential of muscle stem cells. *Development Cell* 1:333-342, 2001.

SEALE, P.; SABOURIN, L.A.; GIRGIS-GABARDO, A.; MANSOURI, A.; GRUSS, P.; RUDICKI, M.A. Pax7 is require for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102: 777-786, 2000.

SEALE, P.; RUDNICKI, M.A. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Development Biology*, 218: 115-124, 2000.

SEALE, P.; ASAKURA, A.; RUDNICKI, M.A. The potential of muscle stem cells. *Development Cell*, 1: 333-342, 2001.

SHEN, W.; LI, Y.; TANG, Y.; CUMMINS, J. ; HUARD, J. NS-398, a Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol*, 167(4):1105-1117, 2005.

SIMMONS, P.J.; GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A.; OHTA, S.; GRAVES, S. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res*, 389:271-80. 1994.

SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*, 332: 217-219, 1988.

STAUBER, W.T.; MILLER, G.R.; GRIMMET, J.G.; KNACK, K.K. Adaptation of rat soleus muscles to 4 wk of intermittent strain. *Journal of Applied Physiology*, 77(1):58-62, 1994.

STAUBER, W.T.; SMITH, C.A.; MILLER, G.R.; STAUBER, F.D. Recovery from 6 weeks of repeated strain injury to rat soleus muscles. *Muscle & Nerve*, 23:1819-1825, 2000.

STAUBER, W.T.; SMITH, C.A. Cellular responses in exertion-onduce skeletal muscle injury. *Molecular and Cellular Biochemistry* 179: 189- 196, 1998.

STOCKDALE F.E.; HOLTZER H. DNA synthesis and myogenesis. *Exp Cell Res.*, 24:508-20, 1961.

STRATOS, I.; ROTTER, R.; EIPEL, C.; MITTLMEIER, T.; VOLLMAR, B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *J Appl Physiol*, 103:1857-1863, 2007.

STREM, B.M.; HICOK, K.C.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; SCHREIBER, E.; FRASER, J.K.; HEDRICK, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*, 54 (3): 132-141, 2005.

SUMMERBELL D.; HALAI, C.; RIGBY, P.W.J. Expression of the myogenic regulatory factor Mrf4 precedes or is contemporaneous with that of Myf5 in the somatic bud. *Mechanism of Development* 117: 331-335, 2002.

TAJBAKHSH, S.; ROCANCOURT, D.; COSSU, G.; BUCKINGHAM, M. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf5 act upstream of MyoD. *Cell* 89: 127-138, 1997.

TAKALA, T.E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 10(6):321-5, 2000.

TAMAKI, T.; AKATSUKA, A.; ANDO, A.; NAKAMURA, Y.; MATSUZAWA, H.; HOTTA, T.; ROY, R.; EDGERTON, V.R. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 157 (4): 571-577, 2002.

TATSUMI, R.; ANDERSON, J.E.; NEVORET, C.J.; HALEVY, O.; ALLEN, R.E. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*; 1;194(1):114-28, 1998.

TEIXEIRA, C.F., CHAVES, F., ZAMUNER, S.R., FERNANDES, C.M., ZULIANI, J.P., CRUZ-HOFLING, M.A., FERNANDES, I., GUTIERREZ, J.M. Effects of neutrophil

depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with Bothrops jararaca snake venom. *Int. J. Exp. Pathol.* **86**, 107, 2005.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth functions by inhibiting myoblast proliferation, *Journal of Biological Chemistry*, 275: 40235- 40243, 2000.

THAYER M.J.; TAPSCOTT, S.J.; DAVIES, R.L.; WOODRING, E.W.; LASSAR, A.B.; WEINTRAUB, H. Positive autoregulation of the myogenic determination gene myod1. *Cell*, 58: 241-248., 1989.

TIDBALL, J.G.; ST PIERRE, B.A. Apoptosis of macrophages during the resolution of muscle inflammation. *J Leukoc Biol*, 59(3):380-8, 1996.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* 288, R345, 2005.

TORRENTE Y, TREMBLAY JP, PISATI F, BELICCHI M, ROSSI B, SIRONI M, FORTUNATO F, EL FAHIME M, D'ANGELO MG, CARON NJ, CONSTANTIN G, PAULIN D, SCARLATO G, BRESOLIN N. Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol.* 152(2):335-48, 2001.

TOMASEK, J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nature.* (3):349-363, 2002.

TURGEMAN T, HAGAI Y, HUEBNER K, JASSAL DS, ANDERSON JE, GENIN O, NAGLER A, HALEVY O, PINES M. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul Disord*; 18(11):857-68. Epub 2008 Jul 30.

VRACKO, R.; BENDITT, E.P. Basal lamina: The scaffold for orderly cell replacement. *The Journal of Cell Biology*, 55: 406-419, 1972.

VIGNAUD, A.; NOIREZ, P.; BESSE, S.; RIEU, M.; BARRITAU, D.; FERRY, A. Recovery of slow skeletal muscle after injury in the senescent rat. *Experimental gerontology*, 38: 529-537, 2003.

WADA, M.R.; INAGAWA-OGASHIWA, M.; SHIMIZU, S.; YASUMOTO, S.; HASHIMOTO, N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development*, 129: 2897-2995, 2002.

WAGNER KR, MCPHERRON AC, WINIK N, LEE SJ. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol*; 52(6):832-6, 2002.

WAHL S.H.; HUNT, D.A.; WAKEFIELD, L.M.; McCARTNEY-FRANCIS, N.; WAHL, L.M.; ROBERTS, A.B. SPORN, M.B. Transforming growth factor type  $\beta$  induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *PNAS*, 84: 5788-5792, 1987.

WAKITANI, S.; SAITO, T.; CAPLAN, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18(12):1417-26, 1995.

WALL, ME.; BERNACKI, S.H.; LOBOA, E.G. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 13(6):1291-8, 2007.

WALSH, F.S.; CELESTE, A.J. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochemical Society Transactions*, 33(6):1513-1517.

WALTENBERGER, J.; LUNDIN, L.; OBERG, K.; WILANDER, E.; MIYAZONO, K.; HELDIN, C.H.; FUNA, K. Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. *Am J Pathol*;142(1):71-8, 1993.

WANEK, L.J.; SNOW, M.H. Activity-Induce fiber regeneration in the rat soleus muscle. *The Anatomical Record*, 258: 176-185, 2000.

WARDEN, S.J. A new direction for ultrasound therapy in sports medicine. *Sports Medicine*, 33(2): 95-107, 2003.

WATCHKO, J.F.; O'DAY, T.L.; HOFFMAN, E.P. Functional characterization of dystrophic skeletal muscle: insights from animals model. *Journal of Applied Physiology*, 93:407-417, 2002.

WERNECK-DE-CASTRO, J.P.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; DE OLIVEIRA, P.F.; PINHO-RIBEIRO, V.; MELLO, D.B.; PEÇANHA, R.; MATTOS, E.; OLIVARES E.L.; MAIA, A.C.; MILL, J.G.; DOS SANTOS GOLDENBERG, R.C.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C. G-CSF does not improve systolic function in a rat model of acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 101(6):494-501, 2006.

WINCHESTER, P.K.; DAVIS, M.E.; ALWAYS, S.E.; GONYEA, W.J. Satellite cell activation in the stretch-enlarged anterior latissimus dorsi muscle of the adult quail. *American Journal of Physiology*, 260(Cell Physiol, 29): C206-C212, 1991.

WOKKE, J.H.; VAN DEN OORD, C.J.; LEPPINK, G.J.; JENNEKENS, F.G. Perisynaptic satellite cells in human external intercostal muscle: a quantitative and qualitative study. *Anat Rec*, 223(2):174-80, 1989.

WRIGHT, A.; SLUKA, K.A. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. *The Clinical Journal of Pain*, 17: 33-46, 2001.

WRIGHT, W.E.; SASSOON, D.A.; LIN, V.K. Myogenin a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56: 607- 617, 1989.

YAMAMOTO, T.; NOBLE, N.A.; MILLER, D.E.; BORDER, W.A. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int*;45(3):916-27, 1994.

YAN, Z.; CHOI, S.; LIU, S.; ZHANG, M.; SCHAGEMAN, J.J.; LEE, S.Y.; HART, R.; LIN, L.; THURMOND, F.A.; WILLIAMS, R.S. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 8826- 8836, 2003.

YANG, W. ; ZHANG, Y. ; LI, Y. ; WU, Z. ; ZHU, D. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem*, 9;282(6):3799-808, 2006.

YAÑES, R.; LAMANA, M.L.; GARCÍA-CASTRO, J.; COLMENER, J.; RAMÍREZ, M.; BUEREN, J.A. Adipose Tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 24; 2582-2591, 2006.

YOON, Y.S.; CHAI, M.; SHIN, D.W. Football injuries at asian tournaments. *The American Journal of Sports Medicine*, 32(Suppl 1): 36S- 42S.

YOSHIMURA, H.; MUNETA, T.; NIMURA, A.; YOKOYAMA, A.; KOGA, H.; SEKIYA, I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue res*, 327(3): 449-462, 2006.

YOUNG, H.E.; CEBALLOS, E.M.; SMITH, J.C.; MANCINI, M.L.; WRIGHT, R.P.; RAGAN, B.L.; BUSHELL, I.; LUCAS, P.A. Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 29A(9):723-36, 1993.

YOUNG, H.E.; MANCINI, M.L.; WRIGHT, R.P.; SMITH, J.C.; BLACK, A.C. Jr.; REAGAN, C.R.; LUCAS, P.A. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn*, 202(2):137-44, 1995.

YUKSEL, E.; WEINFELD, A.B.; CLEEK, R.; WAUGH, J.M.; JENSEN, J.; BOUTROS, S.; SHENAI, S.M.; SPIRA, M.; De novo adipose tissue generation through long-term, local delivery of insulin and insulin-like growth factor-1 by PLGA/PEG microspheres in an in vivo rat model: a novel concept and capability. *Plast Reconstr Surg*.105(5):1721-9. 2000.

ZAMMIT, P.S.; HESLOP, L.; HUDON, V.; ROSENBLATT, J.D.; TAJBAKHSI, S.; BUCKINGHAM M.E.; BEUCHAMP, J.R.; PATRIDGE, T. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Experimental Cell Research*, 281: 39-49, 2001.

ZAMMIT, P.; BEUCHAMP, J. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation*, 68(4-5):193-204, 2001.

ZEMPER, E.D. Track and field injuries. *Med Sport Sci*,48:138-51, 2005.

ZENG, Q.; LI, X.; BECK, G.; BALIAN, G.; SHEN, F.H. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro. *Bone*, 40(2):374-81, 2007, Epub 2006 Oct 27.

ZHU, J.; LI, Y.; SHEN, W.; CHUNPING, Q.; AMBROSIO, F.; LAVASANI, M.; NOZAKI, M.; BRANCA, M.F.; HUARD, J. Relationships between TGF- $\beta$ 1, Myostatin, and decorin: Implications for skeletal muscle fibrosis. *The Journal of biological chemistry*, 31;282(35):25852-63, 2007.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7 :211-228, 2002.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2):211-28, 2001.

# 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](#)