



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas**

DÉBORA MORUECO PORTILHO

**“O papel da organização da membrana plasmática
e da via de sinalização Wnt/beta-catenina na
diferenciação muscular esquelética”**

**Tese de doutorado apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor, na área de Ciências
Morfológicas**

Orientadora: Profa. Cláudia dos Santos Mermelstein

**Rio de Janeiro
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dedicatória

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre. Umas porque nos apresentam projetos de sonho, outras porque vão nos ajudando na construção, e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.

Quando damos conta, já é tarde para lhes agradecer.

Aos meus pais, Luiz Eduálce Gomes Portilho e Martina Toro Morueco, pelo exemplo de dignidade e retidão de caráter e por terem me imprimido a sede do saber;

Aos meus irmãos Tita e Dani, pelo carinho, compreensão, paciência, incentivo, alegria, enfim, pela amizade e presteza que sempre dispensaram a mim;

Ao meu noivo Raul, que por anos compartilhou, ao meu lado, todas minhas preocupações e ansiedades, na busca incessante deste ideal, compreendendo-me e motivando-me com seu apoio, carinho e amor incondicional,

Com amor, dedico este trabalho.

Agradecimentos

- Aos professores Cláudia Mermelstein e Manoel Luís Costa, pela valiosa orientação, apoio e incentivo, os quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho;
- Aos professores José Garcia Abreu, Maria Isabel Rossi e Radovan Borojevic e aos amigos Fábio Mendes e Leandro Thiago, pelas várias sugestões dadas durante o curso de pós-graduação;
- As grandes amigas e companheiras do laboratório, Carolina, Cacau, Renata, Mariana, Juliana, Thais, Danielle, Laise, Maira e Rosana que conviveram diariamente comigo, compartilhando minhas alegrias e tristezas e estimulando-me sempre nos momentos de fraqueza;
- Aos meus avós, pelo exemplo de humildade e pelo carinho e amor dedicados durante toda a minha vida;
- Às Famílias Portilho e Morueco, as quais, mesmo longe, torceram pelo meu sucesso e incentivaram-me a nunca desistir de meus sonhos;
- A todos meus queridos amigos, Mateus, Paula, Luiza, Paloma, Aline, Clarissa, Sharon e Família Oliveira que me suportaram durante os anos de obsessiva pesquisa, em que minhas conversas, mesmo nos períodos de relaxamento, versavam quase que exclusivamente sobre a tese e suas conseqüências;
- À Família Peter, pelo amor, carinho e dedicação demonstrados;
- Aos Felinos Lelé, Lili, Boli, Gegê e Mimi, meus gatos de estimação que acompanharam “atentamente” a redação deste trabalho.

Folha de aprovação

PORTILHO, D. M. O PAPEL DA ORGANIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA E DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA NA DIFERENCIAÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

Débora Morueco Portilho

Banca Examinadora:

_____ - Orientadora

Prof.a. Cláudia dos Santos Mermelstein (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

_____ - Examinador

Prof. Radovan Borojevic (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

_____ - Examinador

Prof. Roger Chammas (Departamento de Radiologia - USP)

_____ - Examinadora

Prof.a. Russolina Zingali (Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ)

_____ - Suplente Interna e Revisora

Prof.a. Silvana Allodi (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

_____ - Suplente Externa

Prof.a. Thereza Fonseca Quírico Santos (Instituto de Biologia – UFF)

Rio de Janeiro

2009

Ficha catalográfica

Portilho, Débora Morueco

O PAPEL DA ORGANIZAÇÃO DA MEMBRANA PLASMÁTICA E DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA NA DIFERENCIAÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA . Rio de Janeiro, UFRJ, ICB, 2009.

xv, 143p.

Tese de Doutorado em Ciências Morfológicas.

Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Instituto de Ciências Biomédicas.

1- miogênese; 2- diferenciação muscular; 3- metil-beta-ciclodextrina; 4- colesterol; 5-via de sinalização Wnt/ β -catenina.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto, localizado no segundo andar do bloco F, na sala 19 do Instituto de Ciências Biomédicas, no Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-FAPERJ).

Resumo

A miogênese é um processo complexo que se inicia com o comprometimento de células precursoras mononucleadas que saem do ciclo celular. Esses mioblastos se alongam, enquanto se alinham uns com os outros, guiados pelo reconhecimento de suas membranas. Essa etapa é seguida da fusão celular e da formação de miotubos estriados e multinucleados. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente, que a retirada de colesterol membranar pela metil- β -ciclodextrina (MCD) induz a diferenciação muscular. O objetivo desta tese foi investigar os efeitos da retirada de colesterol na via de Wnt/ β -catenina durante a diferenciação muscular. Os resultados deste trabalho mostraram que a retirada de colesterol promove um aumento significativo na expressão de β -catenina, sua translocação para o núcleo e a ativação da via de Wnt. Além disso, a ativação da via de Wnt após a depleção de colesterol pode ser inibida pela proteína solúvel Frzb-1. Também foi demonstrado que o meio condicionado proveniente de uma cultura tratada com a MCD acelerou a miogênese de uma forma semelhante ao tratamento com MCD, sugerindo que os efeitos induzidos após a depleção de colesterol podem ser causados por fatores solúveis presentes no meio de cultura. A proteína Wnt-3 em uma forma solúvel aumentou significativamente no meio condicionado MCD. Um meio enriquecido com Wnt-3a induziu a diferenciação muscular tanto quanto o tratamento com a MCD, enquanto que um meio enriquecido com Wnt5a inibiu a fusão de mioblastos. Nós também mostramos que o tratamento com MCD aumentou a proliferação celular e induziu um aumento no número de células monucleadas positivas para desmina. O tratamento de células miogênicas com a substância anti-mitótica araC logo após a retirada de colesterol, bloqueou os efeitos da MCD na diferenciação. Ensaio de incorporação de 5 bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) mostraram mais células positivas para BrdU e para desmina em culturas tratadas com MCD. Estes resultados sugerem que alterações no conteúdo de colesterol membranar de células miogênicas podem ativar a proliferação e a diferenciação miogênica, e que o colesterol pode modular a via de sinalização de Wnt/ β -catenina nos estágios iniciais da diferenciação muscular esquelética.

Abstract

Skeletal muscle differentiation is a multi-step process that begins with the commitment of mononucleated precursors that withdraw from cell cycle. These myoblasts elongate while aligning to each other, guided by the recognition between their membranes. This step is followed by cell fusion and the formation of long and striated multinucleated myotubes. We have recently shown that cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (MCD) induces skeletal muscle differentiation. The objective of the present work was to study the effects of cholesterol depletion in the Wnt/ β -catenin signaling pathway during muscle differentiation. Our results showed that cholesterol depletion promoted a significant increase in the expression of β -catenin, its nuclear translocation and activation of the Wnt pathway. Moreover, the activation of the Wnt pathway after cholesterol depletion can be inhibited by the soluble protein Frzb-1. We also showed that MCD-conditioned media accelerates myogenesis in a similar way as MCD did, suggesting that the effects induced by MCD may be caused by soluble factors present in the culture medium. Soluble Wnt-3 protein was significantly enhanced in MCD-conditioned medium. Wnt-3a-enriched media induced myogenesis as much as MCD did, whereas Wnt-5a-enriched media inhibited myoblast fusion. In addition, MCD treatment enhanced cell proliferation and induced an increase in the number of desmin-positive mononucleated cells. Treatment of myogenic cells with the anti-mitotic reagent cytosine arabinoside right after cholesterol depletion blocked the MCD-induced effects on differentiation. Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assays showed more positive cells for BrdU and desmin in MCD-treated cultures. These findings suggest that rapid changes in the cholesterol content in myogenic cell membranes can activate myogenic proliferation and differentiation and that cholesterol can modulate the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the early steps of skeletal muscle differentiation.

Lista de abreviações

- APC – *adenomatous polyposis coli*
- AraC – do inglês “*cytosine arabinoside*”
- bHLH – proteínas básicas hélice-alfa-hélice
- BMP4 – proteína morfogênica óssea tipo 4
- BrdU - 5-bromo-2'-deoxiuridina
- BSS – solução salina balanceada
- Ca²⁺ – cálcio
- CamKII – proteína cinase tipo II dependente de calmodulina
 - CD 45 – grupo de diferenciação 45 (do inglês “*cluster of differentiation 45*”)
- CD 133 – grupo de diferenciação 133 (do inglês “*cluster of differentiation 133*”)
- cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
- cdk – gene que codifica a proteína quinase dependente de ciclina
- CMF – solução salina balanceada sem cálcio e sem magnésio
- CO₂ – dióxido de carbono
- Ct – células controle
- DABCO – 1,4-diazabicyclo-2-(2.2.2) octano
- DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindole dihidroclorato
- Dkk – proteína Dickkopf
- DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- dNTP - trifosfato de deoxiribonucleotídeo
- DTT – ditioneitol
- E-box – sequência presente em promotores de genes musculares
- EGTA – ácido tetraacético etilenoglicol
- FAK – cinase de adesão focal
- FITC – isotiocianato de fluoresceína

- FRMs – fatores regulatórios da miogênese
- Frzb1 – proteína inibidora de frizzled do tipo 1
- Fz – proteína frizzled
- GAPDH – dehidrogenase gliceraldeído 3-fosfato
- GM1 – gangliosídeo GM1
- GPI – glicosil fosfatidilinositol
- GSK-3 β – cinase glicogênio sintase 3 β
- HCl – ácido clorídrico
- HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine etanosulfônico
- HGF – fator de crescimento de hepatócito
- HLH – proteínas hélice-alfa-hélice sem o domínio básico
- If - imunofluorescência
- I-mfa – inibidor da família de MyoD do tipo a
- Ib – transferência de proteínas seguida de reação imunológica (do inglês “*immunoblotting*”)
- IgG – imunoglobulina G
- JKN – cinase N-terminal Jun
- LDL – lipoproteína de baixa densidade
- LRP-5/6 – proteína relacionada ao receptor de LDL do tipo 5/6
- MCD – metil-beta-ciclodextrina
- MEF-2 - fator estimulatório miocítico do tipo 2
- MEM – meio essencial mínimo
- MES – ácido etanesulfônico 2-(N-morfolino)
- MgCl – cloreto de magnésio
- MyHC – cadeia pesada de miosina
- M-MLV RT – transcriptase reversa de leucemia murina de Moloney
- NaCl – cloreto de sódio
- NP-40 - nonil fenoxilpolietoxiletanol
- pH – potencial hidrogenionico

- PBS – tampão fosfato com salina
- PBS/T – tampão fosfato com salina e com Triton X-100
- PCP – polaridade celular planar
- PCR – reação em cadeia da polimerase
- PKC – proteína cinase C
- PPD – para-fenilenodiamina
- Ptns - proteínas
- PVDF – polifluoreto de vinilideno
- Rb – proteína retinoblastoma
- RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
- SDS – dodecil sulfato de sódio
- sFRPs – proteínas secretadas relacionadas a frizzled
- TBS-T – tampão salino com Tris e com Tween 20
- TCF/LEF – fator de células T / fator estimulatório linfóide
- TGN – rede trans-Golgi
- Tm – temperatura de anelamento do *primer*
- Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano
- Triton X-100 – t-octilfenoxipolietoxietanol
- TRICT – isotiocianato de tetraetilrodamina
- UV – ultravioleta
- WIF-1 – fatores indutíveis de Wnt
- WISP-1 – proteína secretada induzida por Wnt do tipo 1
- Wls – proteína Wntless/Evi/Sprinter
- Wnt – família de genes de vertebrados homólogos ao fator de crescimento Wingless de *Drosophila*

Lista de figuras

- Figura 1 - Estrutura do músculo estriado esquelético_____02
- Figura 2 - Estrutura do sarcômero de uma célula muscular_____03
- Figura 3 - Etapas da diferenciação muscular esquelética_____07
- Figura 4 - Fatores regulatórios da miogênese_____09
- Figura 5 - Distribuição da proteína caderina na célula muscular esquelética__12
- Figura 6- Junção de adesão célula-célula_____13
- Figura 7- Modificações lipídicas e glicosilações na proteína Wnt_____15
- Figura 8 - Via clássica da sinalização Wnt/ β -catenina_____18
- Figura 9 - Composição dos microdomínios de membrana_____22
- Figura 10 - Efeitos da MCD na fusão de mioblastos_____26
- Figura 11 – Efeitos da MCD na proliferação celular_____27
- Figura 12 - Efeitos de MCD na diferenciação muscular_____28
- Figura 13 - O tratamento com MCD induz a translocação da β -catenina para o núcleo de mioblastos_____29
- Figura 14 - Esquema mostrando como os meios condicionados foram obtidos_33
- Figura 15 - Esquema mostrando como os meios condicionados filtrados foram obtidos _____34
- Figura 16 - O tratamento com MCD induz um aumento na expressão da proteína Pax3 em mioblastos_____56
- Figura 17 - O tratamento com MCD induz um aumento na expressão da proteína Pax7 em mioblastos_____57

- Figura 18 - O tratamento com MCD induz um aumento na expressão da proteína MyHC em culturas de músculo esquelético _____ 58
- Figura 19- Wnt 5a inibe diferenciação muscular esquelética _____ 59
- Figura 20- Culturas musculares expressam genes wnt 1, wnt 3a, wnt 5a e Lef 1 _____ 60
- Figura 21 - Modelo esquemático dos efeitos da retirada de colesterol em culturas musculares _____ 69

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Anticorpos primários _____ 37
- Tabela 2 - Anticorpos secundários e sondas _____ 38
- Tabela 3 - Primers _____ 44

Sumário

Resumo_____	vii
Abstract_____	viii
Lista de Abreviações_____	ix
Lista de Figuras_____	xii
Lista de Tabelas_____	xiv
1. Introdução_____	1
1.1. O Tecido muscular_____	1
1.2. Miogênese_____	5
1.3. Adesão e fusão de mioblastos_____	10
1.4. Via de sinalização Wnt/ β -catenina_____	13
1.5. Influências da via de Wnt na miogênese_____	18
1.6. Microdomínios de membrana_____	21
1.7. Justificativa para este trabalho de tese_____	25
2. Objetivos_____	30
2.1. Objetivos Gerais_____	30
2.2. Objetivos Específicos_____	30
3. Materiais e Métodos_____	31
3.1. Animais_____	31
3.2. Culturas primárias de músculo esquelético_____	31
3.3 Culturas primárias de fibroblastos_____	32
3.4. Tratamento com a substância metil-beta-ciclodextrina (MCD)_____	32
3.5. Obtenção de meios condicionados controle e MCD_____	33
3.6. Filtragem de meios condicionados pelos Centricons_____	34
3.7. Obtenção e tratamento de culturas musculares com meio condicionado enriquecido em Wnt 3a e Wnt 5a_____	34
3.8. Obtenção e tratamento de culturas musculares com meio condicionado enriquecido em Frzb-1_____	35
3.9. Microscopia de fluorescência_____	36
3.10. Ensaio de BrdU_____	36

3.11. Aquisição e processamento de imagens	39
3.12. Transfecção de plasmídeos e ensaio da atividade luciferásica	39
3.13. Preparo de amostras para eletroforese	40
3.14. Ensaio de imunoprecipitação	41
3.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida	41
3.16. <i>Immunoblotting</i> (Ib)	42
3.17. Extração de RNA total	43
3.18. Transcrição reversa do RNAm e amplificação dos cDNA	43
4. Resultados	45
5. Discussão	61
6. Conclusões	72
7. Bibliografia	74
8. Anexos	87

1. Introdução

1.1. O Tecido muscular

Os tecidos musculares dos vertebrados podem ser divididos em três tipos, levando em consideração suas características morfológicas e funcionais: o músculo liso, o músculo estriado cardíaco e músculo estriado esquelético. Os três tipos de tecidos musculares são constituídos por células contráteis (revisado por Cormack, 1996).

O músculo liso é formado por células fusiformes, mononucleadas, com o núcleo central e não possuem estriações. A contração dessas células é lenta e involuntária. Esse tecido está presente, por exemplo, nos vasos sanguíneos e no intestino.

O músculo estriado cardíaco é formado por células alongadas que são geralmente mononucleadas ou binucleadas e com o núcleo central, que se unem às células vizinhas através de junções celulares. Essas células são chamadas de cardiomiócitos e possuem estriações. A contração destas é rápida, rítmica e involuntária.

O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas longas chamadas de fibras musculares ou miotubos e apresentam estriações transversais. As fibras musculares são multinucleadas e os núcleos se localizam na periferia das fibras devido à presença de um citoesqueleto bem desenvolvido. Estas células têm contração rápida e voluntária.

A membrana que envolve as fibras musculares é chamada de sarcolema e o retículo endoplasmático é denominado de retículo sarcoplasmático. O citoplasma é chamado de sarcoplasma, e nele estão localizadas as miofibrilas (os elementos contráteis da célula). Elas são estruturas cilíndricas que correm longitudinalmente à fibra muscular e são geralmente tão longas como a própria fibra (**Figura 1**).

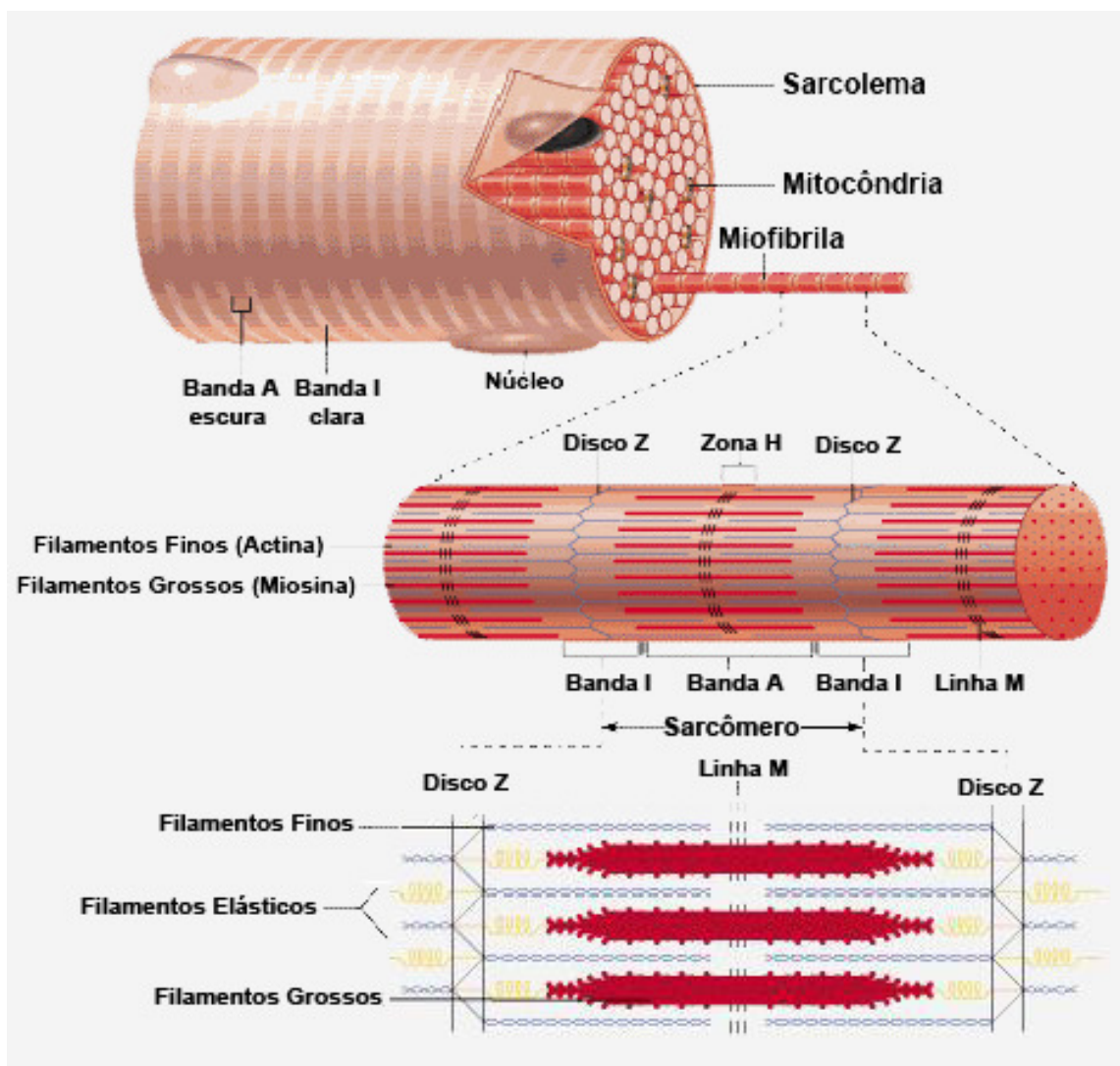


Figura 1 – Estrutura do músculo estriado esquelético.

(<http://www.apsu.edu/thompsonj/Anatomy.htm> - modificado)

Ao microscópio óptico, as miofibrilas aparecem como estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras. As faixas claras recebem o nome de bandas I, por serem isotrópicas ao microscópio de polarização, e as faixas escuras recebem o nome de bandas A, por serem anisotrópicas. No centro de cada banda I aparece uma linha transversal escura denominada de disco Z (**Figura 1**).

As miofibrilas são formadas por unidades que se repetem: os sarcômeros (**Figuras 1 e 2**). O sarcômero é a unidade morfofuncional da miofibrila. Cada

sarcômero é limitado por dois discos Z, logo, é formado por uma banda A e duas bandas I (cortadas ao meio pelo disco Z). No meio da banda A existe uma zona mais clara, denominada de zona H.

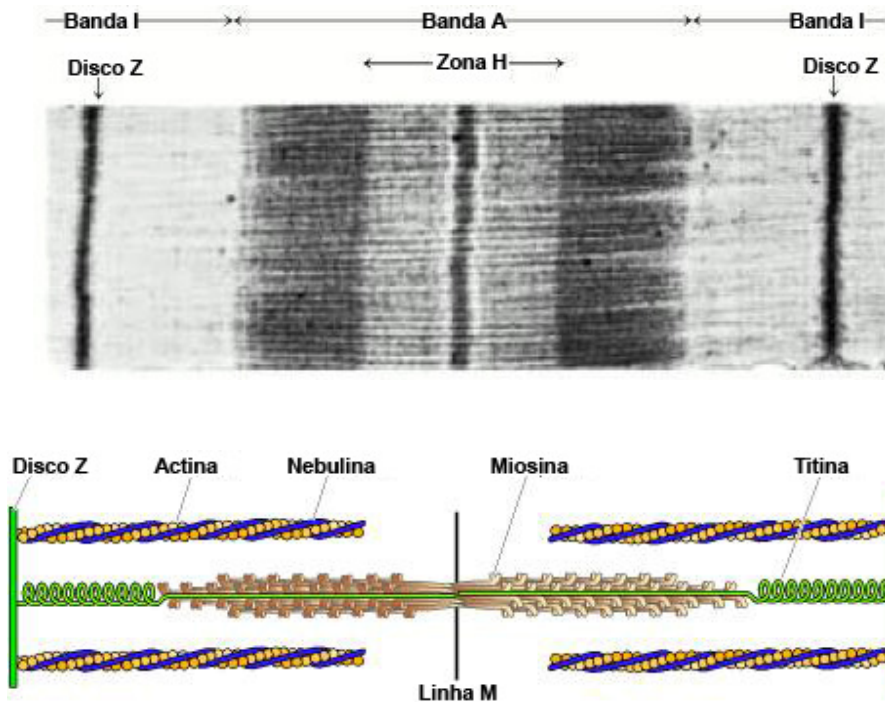


Figura 2 - Estrutura do sarcômero de uma célula muscular (Lodish et al., 2000 - modificado).

O bandejamento das miofibrilas é o resultado de sua composição protéica e da maneira com que elas se dispõem para formar os sarcômeros. As zonas H contêm um arranjo paralelo de filamentos grossos (150 \AA de diâmetro) de miosina dispostos hexagonalmente. As bandas I consistem de filamentos finos (70 \AA de diâmetro) de actina, igualmente em arranjo hexagonal, que se ancoram no disco Z. As áreas mais escuras nas extremidades de cada banda A correspondem aos pontos em que os dois tipos de filamentos interagem. Os filamentos finos são compostos por actina e pelas quatro proteínas acessórias: tropomiosina, troponina C, troponina T e troponina I. A actina é a molécula central dos filamentos finos, que, polimerizada, forma uma dupla hélice e contém os sítios de ligação com a miosina. A tropomiosina é uma molécula que se liga à actina de forma espiralada sobre a dupla hélice. Esta ligação impede a associação entre a actina e a miosina,

pois bloqueia o sítio de interação da actina com a miosina. As três subunidades de troponinas têm estruturas e funções específicas. A troponina T se associa à tropomiosina e forma assim um complexo tropomiosina-troponinas. A troponina I se liga à actina e mantém assim o complexo tropomiosina-troponinas estável. A troponina C tem afinidade por íons cálcio e induz uma mudança conformacional na troponina I.

As linhas ou discos Z são constituídos principalmente pelas proteínas alfa-actinina, desmina, actina e cap Z. A desmina é uma proteína de 52 kDa que faz parte da família de proteínas que constituem os filamentos intermediários do citoesqueleto. Esta proteína é específica de células musculares, tanto de músculo liso como estriado. Em músculo estriado, ela se localiza na região do disco Z do sarcômero, nos costâmeros (estruturas subsarcolemas que conferem sustentação e permitem a manutenção da integridade quando da contração muscular, resistindo ao estiramento), na junção miotendinosa e nos discos intercalares cardíacos. No músculo estriado maduro os filamentos de desmina estão presentes nos discos Z, nas miofibrilas, ao redor do núcleo e ao redor das mitocôndrias (Costa et al., 2004; Mermelstein et al., 2006). Estudos recentes mostram que a desmina liga o sarcolema ao envelope nuclear através de ligação à anquirina e lamina B (Capetanaki et al., 1997). Durante o desenvolvimento, a expressão de desmina antecede a de todos os genes estruturais específicos de músculo, como a miosina, a troponina, a nebulina, entre outras. Estes dados indicam que a desmina desempenha papel importante nas etapas iniciais da diferenciação muscular (Capetanaki et al., 1997). A alfa-actinina é outra proteína que está presente nos discos Z dos sarcômeros. Ela é uma proteína expressa de forma ubíqua, que pertence à família das proteínas associadas à actina e possui homologia estrutural com distrofina, espectrina e fimbrina (Izaguirre et al., 2001). Nas células musculares esqueléticas, a alfa-actinina está presente também nas adesões da célula à matriz extracelular e nas adesões intercelulares, onde se associa ao complexo caderina/cateninas.

Além dos filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina, existe um terceiro sistema de filamentos nos sarcômeros dos músculos estriados, que

são os filamentos elásticos (**Figuras 1 e 2**). Eles são constituídos por duas proteínas gigantes denominadas de titina e nebulina. Elas são responsáveis pelo componente elástico do músculo, que torna possível a estrutura toda contrair e relaxar (Clark et al., 2002).

Após a descrição acima das estruturas que compõem o aparato contrátil das células musculares, torna-se importante agora, entender como as células musculares se formam durante o desenvolvimento dos organismos vertebrados.

1.2. Miogênese

As fibras musculares esqueléticas são células multinucleadas e pós-mitóticas que possuem um aparato protéico altamente organizado que as tornam extremamente eficientes em contração.

A formação da fibra muscular esquelética (miogênese) envolve uma série de eventos sequenciais que vão do aparecimento de células precursoras mononucleadas (pré-mioblastos), até a formação de células longas multinucleadas e estriadas (miotubos). Estes eventos ocorrem ao longo do desenvolvimento embrionário em regiões específicas chamadas de somitos.

Os somitos se originam de estruturas bilaterais do mesoderma paraxial (revisado por Tam et al., 2000). No início, um somito é uma esfera sólida de células, a qual amadurece para uma bola de centro vazio, composta de epitélio colunar. A formação do somito ocorre de forma coordenada e definida, enquanto novas células de mesênquima entram no mesoderma paraxial como consequência da gastrulação. A velocidade em que ocorre a somitogênese é definida com precisão, de forma que o número de somitos é utilizado, com freqüência, para avaliar a fase de desenvolvimento do embrião.

Alterações posteriores nos somitos resultam na formação do esclerótomo na parte ventral, o qual origina os condroblastos que geram o esqueleto (Wiltin et al., 1994). A parte dorsolateral do somito origina o dermomiótomo, o qual amadurece em miótomo (Pourquie, 2000). No miótomo, as células progenitoras musculares chamadas de pré-mioblastos expressam os fatores de transcrição Pax3 e Pax7. Estas células mononucleadas são comprometidas com a linhagem

muscular e altamente proliferativas. Este tipo de célula precursora pode expressar proteínas das etapas iniciais da diferenciação muscular esquelética, tais como MyoD e Myf5 (Yun & Wold, 1996).

Os genes da família Pax, principalmente Pax3 e Pax7, são fatores importantes na regulação da miogênese. Epstein e colaboradores em 1995 mostraram que a expressão de Pax3 bloqueia a diferenciação de mioblastos, sugerindo que Pax3 está relacionado com etapas iniciais de proliferação, especificação e migração de células precursoras musculares. Camundongos *Knockout* para Pax7 apresentam uma enorme perda muscular (Kuang et al., 2006).

Há duas linhagens miogênicas distintas no miótomo. A parte medial do miótomo origina a linhagem que supre células para os músculos epaxiais, das costas, enquanto o miótomo lateral produz os músculos hipaxiais, como os torácicos e abdominais (Christ & Brand-Saberi, 2002). Os músculos dos membros são derivados da parte lateral do dermomiótomo que se desintegra para liberar células miogênicas precursoras não-diferenciadas, as quais são capazes de proliferar e migrar individualmente (Williams & Ordahl, 1994).

Quando se inicia a expressão da desmina, os pré-mioblastos passam a ser chamados de mioblastos, param irreversivelmente de proliferar, tornando-se bipolares. Nesta etapa, eles iniciam a transcrição de genes miofibrilares, que geram isoformas específicas de várias proteínas que irão formar os sarcômeros das miofibrilas (Holtzer et al., 1986). Filamentos de actina, por exemplo, serão montados a partir de monômeros de actina-G e desta forma, irão compor sarcômeros de proporções definidas (**Figura 3**).

Quando saem do ciclo celular, os mioblastos alongam-se, tornando-se bipolares e podem ser chamados também de miócitos. Os mioblastos bipolares se alinham com outros mioblastos e este alinhamento é guiado pelo reconhecimento mútuo entre componentes de membranas plasmáticas de mioblastos vizinhos. Após este reconhecimento, ocorre o processo de fusão de mioblastos que resulta na formação de células longas e multinucleadas, chamadas de miotubos (**Figura 3**).

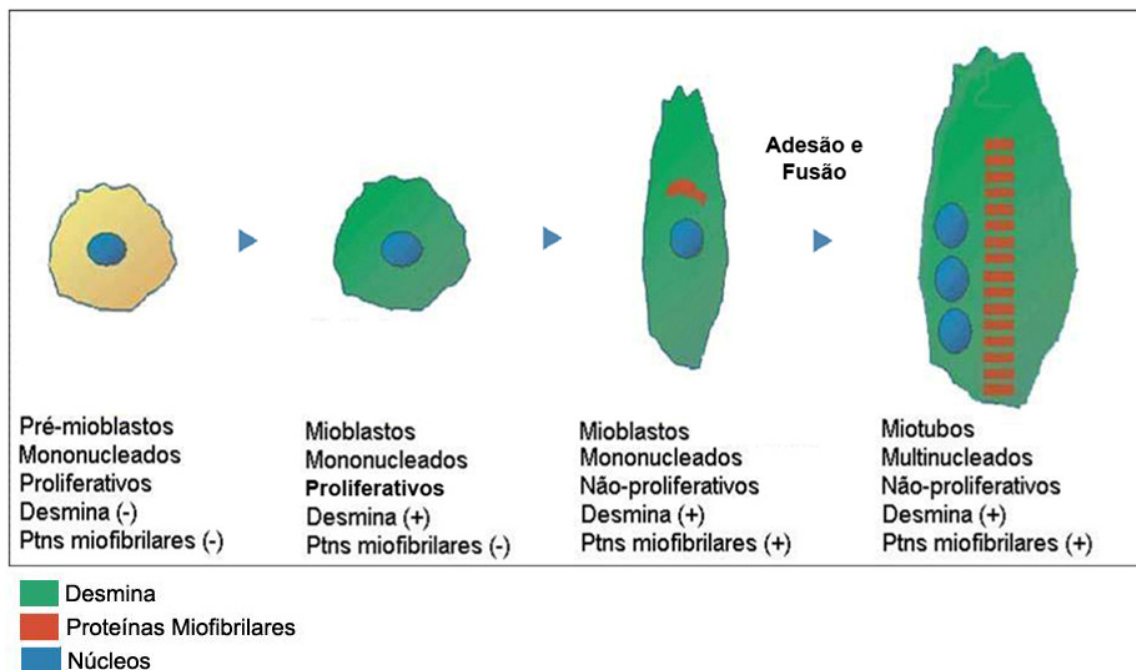


Figura 3 - Etapas da diferenciação muscular esquelética.

A descoberta dos Fatores Regulatórios de Miogênese (FRMs) trouxe novas perspectivas para os estudos do processo de miogênese. Os FRMs são quatro fatores de transcrição das famílias de proteínas básicas hélice-alfa-hélice (bHLH: MyoD, Myf-5, miogenina e MRF4) (**Figura 4**), os quais se ligam ao DNA através do sítio de ligação conhecido como E-box, controlando assim vários eventos da miogênese (Pownall et al., 2002). A expressão dos fatores de transcrição bHLH, junto com outros fatores estimuladores, ativa o programa de diferenciação através da indução da transcrição de genes músculo-específicos, tanto regulatórios quanto estruturais.

O gene MyoD é chamado de gene *master switch* (chave geral), uma vez que ele controla a expressão de vários outros genes do programa de diferenciação muscular. Quando o gene MyoD é transfectado em células não miogênicas, como condrócitos e células epiteliais, observa-se a conversão destas à linhagem miogênica (Choi et al., 1990).

Os FRMs interagem com um segundo tipo de regulador da miogênese, os fatores estimulatórios miocíticos tipo 2 (MEF-2) (Molkentin & Olson, 1996). Embora

MEF-2 não seja restrito à musculatura esquelética (aparece primeiro na diferenciação do miocárdio), sua expressão junto com os FRMs é necessária para uma determinação e diferenciação estável das células precursoras.

Existem diferenças importantes entre os FRMs quanto à expressão no local e no tempo, sendo que podemos considerá-los em dois grupos: os FRMs primários, incluindo MyoD e Myf-5, são necessários para a determinação dos pré-mioblastos e mioblastos, enquanto os FRMs secundários, miogenina e MRF4, agem mais tarde no programa, como fatores de diferenciação. MyoD e Myf-5 são expressos em pré-mioblastos em proliferação, durante o desenvolvimento embrionário, antes da diferenciação miogênica estar ativada, enquanto que miogenina e MRF4 são expressos em mioblastos e miotubos, células já fora do processo de mitose (**Figura 4**). O programa de miogênese inicia-se pela expressão de MyoD e Myf-5 quando as células precursoras musculares são recrutadas das bordas do dermomiótomo para formação do miótomo (Denetclaw & Ordahl, 2000). Em roedores, Myf-5 é o primeiro gene a ser expresso nos miótomos (Ott et al., 1991), mas a expressão de MyoD antecede à de Myf-5 nos somitos de aves (Pownall & Emerson, 1992).

Experimentos realizados em camundongos que tiveram o gene de MyoD ou Myf-5 anulados, não apresentaram defeitos no processo miogênico. No entanto, camundongos que tiveram o gene Myf-5 anulado apresentaram defeitos na formação dos músculos da costela. Quando MyoD é anulado, os níveis de expressão de Myf-5 aumentam, sugerindo que Myf-5 compensa a perda do gene MyoD. Quando os dois genes, MyoD e Myf-5 são anulados juntos no mesmo camundongo, não há formação de nenhum músculo (Rudnicki et al., 1993).

Experimentos que anularam o gene miogenina em camundongos mostraram a formação de uma população de mioblastos normais, entretanto a diferenciação terminal não foi efetiva. Quando o gene MRF4 foi anulado, nenhuma mudança foi observada na miogênese de camundongos, apenas anormalidades na formação de músculos da costela. Estes camundongos apresentaram ainda, um aumento no nível de miogenina, sugerindo que esta compensa a perda do gene MRF4 (Zhang et al., 1995).

Os reguladores de ciclo celular, como a proteína retinoblastoma (Rb), complexos ciclina/cdk e cdks inibitórias, desempenham importantes papéis na regulação da transição do estado proliferativo das células precursoras para entrada no programa de diferenciação muscular (**Figura 4**). A hipofosforilação de Rb é requerida para que pré-mioblastos saiam do ciclo celular e possam se diferenciar, formando miotubos. Rb interage diretamente com MyoD. Quando Rb está inativa por fosforilação ou alterações genéticas, ela não interage com MyoD, levando à inibição da miogênese (Brennan et al., 1991).

Existem vias regulatórias que inibem os FRMs. Um destes mecanismos envolve a expressão de Id, proteína HLH, que perdeu o domínio básico. Id dimeriza com a proteína E, e desse modo, sequestra FRMs, inibindo-os. A superexpressão de Id bloqueia a diferenciação de mioblastos (Jen et al., 1992).

A superexpressão de ciclina D1 também inibe o programa miogênico mediado por FRMs, possivelmente pela fosforilação de Rb que mantém ativo o ciclo celular. MyoD ativa o inibidor do complexo ciclina D1/cdk4, p21^{CIP1}, proteína implicada em promover a hipofosforilação de Rb, a saída do ciclo celular e a diferenciação terminal (Halevy et al., 1995).

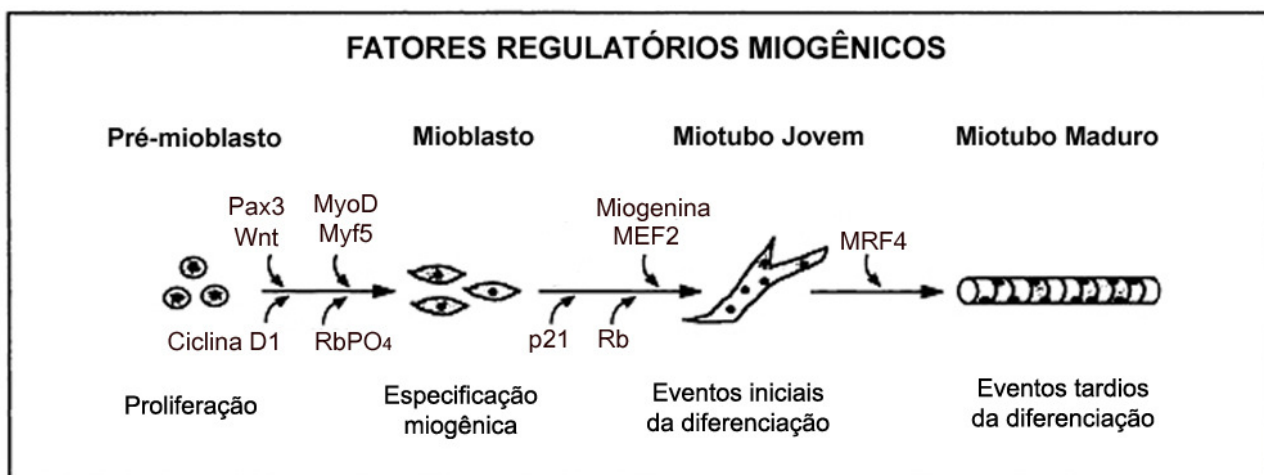


Figura 4 – Fatores regulatórios da miogênese (Ludolph & Konieczny, 1995 - modificado).

A miogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário e também em músculo adulto em regeneração. Após a injúria muscular, um mecanismo de reparo muscular é ativado, que envolve proliferação e diferenciação de células satélites. As células satélites são células quiescentes, indiferenciadas, mononucleares e que se localizam na lâmina basal que envolve miofibras individuais. Quando ocorrem lesões musculares, as células satélites são ativadas e saem da quiescência, proliferando (e mantendo o seu *pool* no indivíduo), e se diferenciando em miotubos, para recuperação da área degenerada (revisado por Charge & Rudnicki, 2004).

1.3. Adesão e fusão de mioblastos

Pelo exposto acima, a diferenciação muscular é um processo complexo, composto de várias etapas consecutivas e coordenadas, nas quais participam inúmeras proteínas. Estas etapas podem ser estudadas separadamente na tentativa de se entender melhor o todo. Algumas das etapas mais estudadas e, no entanto, ainda não compreendidas, são o alongamento, o alinhamento, o reconhecimento entre membranas e a fusão entre mioblastos. Muito já foi estudado, principalmente sobre a fusão, porém várias perguntas permanecem sem respostas.

Já foi demonstrado, por exemplo, por Shainberg e colaboradores em 1969, que a fusão de mioblastos é um processo dependente de íons cálcio. Holtzer e colaboradores (1975) mostraram que citocalasina B, uma droga que se liga à actina filamentosa e induz a sua despolimerização, bloqueia a fusão de mioblastos. Tunicamicina, um inibidor de glicosilação de proteínas, também inibe de fusão de mioblastos (Gilfix & Sanwal, 1980). Após os experimentos com tunicamicina, descobriu-se que a glicoproteína de membrana envolvida na fusão de mioblastos é a caderina (Hatta et al., 1986).

Também já foi demonstrado o envolvimento do lipídeo de membrana colesterol durante a fusão de mioblastos. Van der Bosch e colaboradores (1973) mostraram que colesterol adicionado a culturas de mioblastos impedia a fusão celular. Prives e Shinitzky (1977) mostraram que a concentração de colesterol membranar diminui em mioblastos competentes para fusão, aumentando assim a

fluidez da membrana e induzindo a fusão celular. Sekiya e colaboradores (1984) demonstraram através do uso da substância filipina (que tem alta afinidade por colesterol) que a fusão de mioblastos se dá pela justaposição de áreas livres de colesterol de cada membrana de células adjacentes. Nakanishi e colaboradores (2001) mostraram que é necessária uma diminuição de colesterol na membrana para ocorrer efetivamente à fusão de mioblastos. Entretanto, Cornell e colaboradores (1980) obtiveram resultados diferentes, demonstrando que a utilização de inibidores da síntese de colesterol, 25-OH-colesterol ou compactina, inibem a fusão de mioblastos e que a adição de colesterol é capaz de restaurar o reconhecimento e a fusão de mioblastos.

Como dito anteriormente, sabe-se que as proteínas caderinas (**Figura 5**) estão envolvidas na adesão e fusão de mioblastos. As caderinas fazem parte de uma família de glicoproteínas dependentes de cálcio que participam da adesão célula-célula em tecidos de vertebrados, desta forma influenciando vários processos morfológicos ao longo do desenvolvimento e da manutenção dos tecidos (Taikichi, 1991). As primeiras caderinas descritas foram denominadas de acordo com o tecido onde foram encontradas: a caderina E, por exemplo, está presente em células epiteliais, a caderina N em células nervosas, a caderina M em células musculares e a caderina P em células da placenta e da epiderme.

Mioblastos pós-mitóticos e alongados, crescidos em cultura, expressam caderinas nas suas membranas durante as fases de alinhamento e reconhecimento intercelular que precedem a fusão (**Figura 5**). O domínio extracelular da caderina é o responsável pelo reconhecimento homofílico que ocorre na adesão entre células. Já o domínio intracelular das caderinas se associa às proteínas alfa e beta-cateninas, permitindo sua interação com o citoesqueleto de actina (**Figuras 5 e 6**).

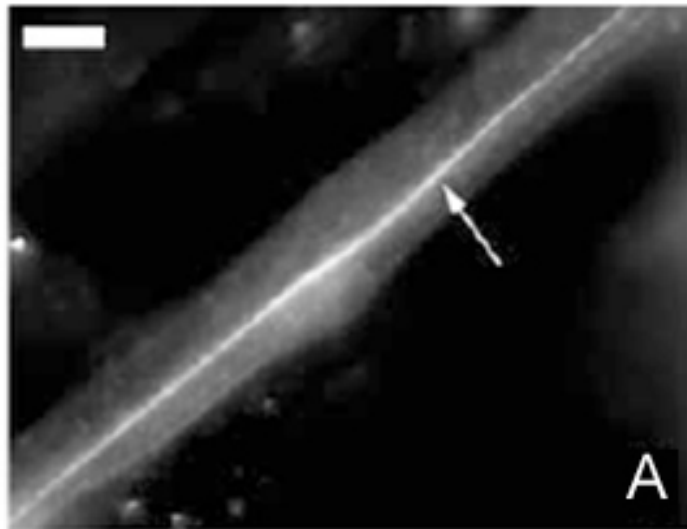


Figura 5 – Distribuição da proteína caderina na célula muscular esquelética. A proteína caderina se localiza nas regiões de adesão entre mioblastos adjacentes (setas). Imunofluorescência de mioblastos de embriões de galinha crescidos em cultura e marcados com anticorpo contra pan-caderina seguidos de anticorpos secundários fluorescentes. Barra = 10 μm (Mermelstein e Portilho et al., 2005).

Na diferenciação terminal de músculo esquelético de mamíferos, dois membros da família das caderinas, a caderina M e a caderina N, foram identificados. A caderina M está presente nos mioblastos e, na fase embrionária, ela só é expressa em células da linhagem miogênica. Em músculo adulto normal, a caderina M está presente nas células satélites, podendo também ser identificada em células miogênicas em regeneração. Esses dados apontam para uma função específica da caderina M na morfogênese e no desenvolvimento do músculo (Zeschnigk et al., 1995).

O trabalho de Charlton e colaboradores (1997) mostrou que mioblastos de camundongos crescidos em cultura ou *in vivo* e sem a expressão de caderina N (*null cells*) são capazes de se fundir normalmente, sugerindo que a caderina N não é essencial no processo de fusão em mioblastos de camundongos. Já mioblastos de galinha crescidos em cultura podem ter sua fusão inibida por um anticorpo anti-caderina N ou por um peptídeo sintético contendo a sequência H-A-V, sugerindo possíveis funções diferentes para as caderinas em diferentes espécies animais.

Goichberg e colaboradores (2001) mostraram que durante o processo de reconhecimento e adesão entre as membranas de mioblastos, a β -catenina é recrutada para junção adesiva, sugerindo sua importância nas etapas iniciais da diferenciação muscular esquelética.

Além de sua localização em regiões de adesão na membrana, a β -catenina também pode se localizar em dois outros compartimentos celulares: no núcleo e em proteassomas.

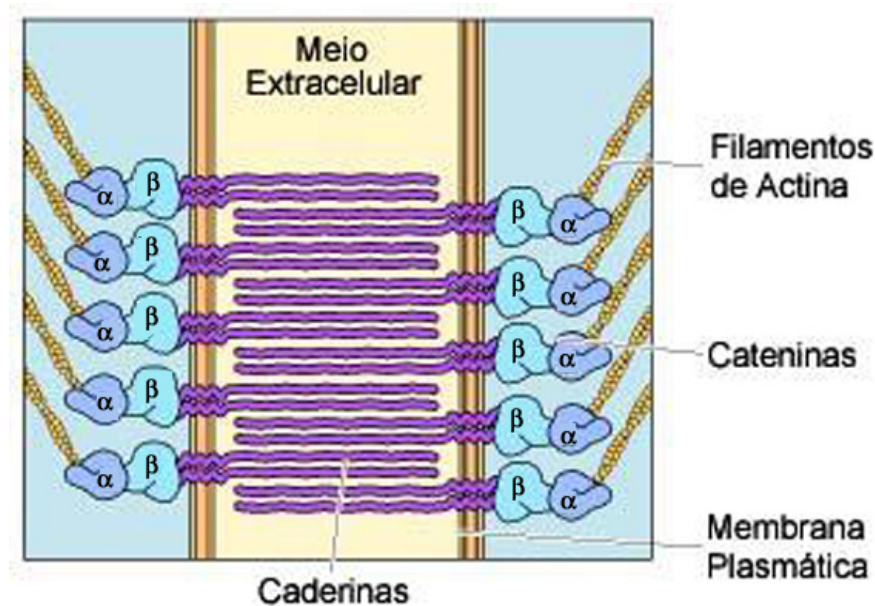


Figura 6 - Junção de adesão célula-célula (Cooper, 2000 - modificado).

1.4. Via de Sinalização Wnt/ β -catenina

A descoberta da homologia existente entre a β -catenina de vertebrados e a proteína armadillo de *Drosophila melanogaster* (70% da sequência de aminoácidos é idêntica) foi a primeira evidência do envolvimento da β -catenina em vias de transdução de sinais e no desenvolvimento embrionário. A similaridade de β -catenina e armadillo se estende além da homologia das sequências de aminoácidos. Assim como a β -catenina, a armadillo forma complexos com caderinas em *Drosophila*, se localiza nas junções de aderência de células

epiteliais, e ainda atua na cascata de sinalização de Wingless, uma proteína homóloga ao fator de crescimento Wnt de vertebrados (Peifer et al., 1993).

Wnts são glicoproteínas sinalizadoras que influenciam múltiplos processos no desenvolvimento animal. Existem 19 genes de *wnt* (além de vários receptores também) no genoma de mamíferos, e a diversidade de suas funções é exemplificada pelas mutações que levam à anomalia no desenvolvimento variando de perdas de células-tronco a defeitos nos sistema renal e reprodutor (Nelson & Nusse, 2004). As proteínas Wnt sofrem duas modificações pós-traducionais já descritas na literatura, a glicosilação e a palmitoilação. Foi sugerido que estas modificações podem estar envolvidas na sinalização da molécula de Wnt para a correta via exocítica e que isso poderia influenciar a difusão de Wnt no meio extracelular (Tanaka et al., 2002). Wnts são morfógenos e, portanto sua difusão é essencial para sua função. De acordo com a sequência de aminoácidos, as proteínas Wnt deveriam ser solúveis, porém, elas não apresentam esta propriedade. A proteína Wnt1 extracelular, em *Drosophila*, está associada com a superfície celular e a matriz extracelular (Reichsman et al., 1996). Willert e colaboradores (2003) mostraram que Wnt3a recebe no retículo endoplasmático uma molécula de ácido palmítico no resíduo conservado cisteína (Cis-77). Depois desta modificação, Wnt se ancora na membrana, localizando-se preferencialmente em regiões ricas em colesterol (microdomínios) (Zhai et al., 2004). Também foi visto por Takada e colaboradores (2006) que Wnt3a sofre outra modificação lipídica no resíduo conservado Ser209, através da adição de uma molécula de ácido graxo insaturado, o ácido palmitoleico (**Figura 7**).

As modificações lipídicas são cruciais para que Wnt desempenhe seu papel corretamente. A acilação da Ser209 é necessária para sinalizar Wnt intracelular para a via exocítica (Takada et al., 2006), enquanto a acilação de Cis77 parece ser requerida para a atividade de sinalização de Wnt já secretado (Willert et al., 2003). A Porcupina aciltransferase é a enzima responsável por catalizar as adições dos grupos acil tanto nos resíduos Cis77 (Takada et al., 2006), quanto nos resíduos Ser209 (Willert et al., 2003).

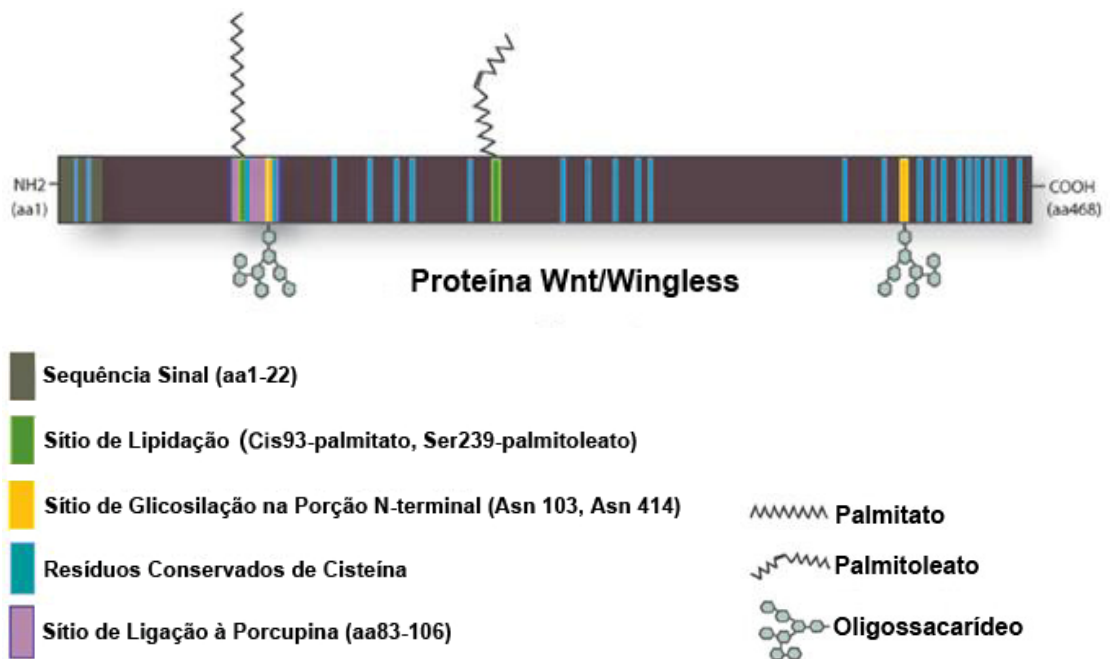


Figura 7 - Modificações lipídicas e glicosilações na proteína Wnt/Wingless (Nusse et al., 2008 - modificado).

Wnts são secretadas para o meio extracelular com a ajuda da proteína multipasso transmembrana Wntless/Evi/Sprinter (Wls). Essas proteínas são responsáveis por permitir o tráfego de vesículas contendo Wnts da rede trans-Golgi (TGN) para a membrana plasmática (Banziger et al. 2006). Foi descrito em 2005 que Wnt secretado pode se associar a partículas de lipoproteínas em *Drosophila melanogaster*. Essas partículas podem formar multímeros e servir como veículo para levar Wnt a longas distâncias (Panakova et al., 2005).

Enquanto a grande maioria da β -catenina está engajada em um papel estrutural nas junções aderentes, ligando membros da família das caderinas ao citoesqueleto de actina, na ausência de sinalização Wnt, a β -catenina não juncional é rapidamente degradada via ubiquitinação pelo sistema proteossômico. Um complexo formado pelas proteínas Axina, o supressor tumoral APC (*adenomatous polyposis coli*) e a proteína GSK-3 β (cinase glicogênio sintase 3 β), regula o *turnover* da β -catenina (**Figura 8**). Este sistema de degradação é muito

ativo e mantém um nível baixo de β -catenina citoplasmática pela fosforilação dela pela GSK-3 β nos resíduos específicos de serina na cadeia N-terminal. Maher e colaboradores (2009) mostraram que as caderinas são responsáveis pela fosforilação, na porção N-terminal, da β -catenina. Dessa forma, as adesões célula-célula mediadas pela caderina limitam a ativação da via de Wnt por sinalizar a β -catenina para degradação.

Na ausência da sinalização de Wnt, os genes-alvo estão silenciados por proteínas regulatórias, como por exemplo, a proteína Groucho. Quando a via de Wnt é ativada, a β -catenina libera Groucho e medeia a transcrição dos genes-alvo através de sua interação com a família de co-ativadores TCF/LEF, resultando na transcrição de alguns genes como *ciclina D1*, *c-myc* e *wisp-1* (Howng et al., 2002) (**Figura 8**).

Quando existe a presença de Wnt no meio extracelular, a sinalização Wnt/ β -catenina é iniciada pela ligação desta a duas moléculas receptoras, a proteína transmembranar com sete passagens na membrana Frizzled e a proteína correceptora LRP-5/6 (proteína relacionada ao receptor de LDL) (Nelson & Nusse, 2004).

Em resposta ao sinal Wnt, os receptores Frizzled (Fz) ativam a fosfoproteína Dishevelled, a qual inibe a função de GSK-3 β , responsável por fosforilar β -catenina. Esta inibição leva ao acúmulo de β -catenina hipofosforilada no citoplasma e a sua redistribuição para o núcleo (Barth et al., 1997) (**Figura 8**).

A fosfoproteína Dishevelled inibe a atividade de GSK-3 β , mais provavelmente pela disjunção do complexo Axina-APC- β -catenina, levando à hipofosforilação da β -catenina e inibição de seu *turnover*.

A inativação deste complexo proteico resulta no acúmulo extrajuncional da β -catenina e sua translocação nuclear onde ela está envolvida na ativação transcricional de genes-alvo em complexo com TCF/LEF. A competição entre diferentes parceiros citoplasmáticos e nucleares da β -catenina por um “pool” limitado de β -catenina pode determinar se sua função será na adesão ou na transativação (Ben-Ze’ev et al., 2000). A sinalização nuclear pela β -catenina está envolvida na regulação de vários eventos celulares durante o desenvolvimento

embrionário e a ativação aberrante da transativação mediada por esta molécula pode contribuir na progressão do câncer por causar o aumento da proliferação celular (Zhurinsky et al., 2000).

A sinalização de Wnt suscita uma ampla variedade de respostas dependentes e independentes da β -catenina, incluindo regulação da proliferação, crescimento e sobrevivência celular, estabelecimento do eixo dorso-ventral em embriões, remodelamento do citoesqueleto para definir polaridade e motilidade celular (Zhurinsky et al., 2000).

As vias de Wnt independentes de β -catenina são chamadas de vias não-canônicas. Há relatos de interação entre as vias de Wnt canônica e não-canônica e um possível papel antagônico entre elas. O gene *Wnt5a* é um representante da via não-canônica dependente de cálcio e é caracterizado como antagonista da via de Wnt/ β -catenina, estando presente em diversos tecidos normais e câncer (Taki et al., 2003). As vias de Wnt não-canônicas incluem a via de Wnt/ Ca^{2+} , mediada pela PKC e CamKII, a via de Wnt/PCP (Planar Cell Polarity), que induz a ativação de GTPases rhoA e rac1, cdc42 e JKN que regula rearranjos do citoesqueleto, morfologia celular e eventos migratórios, e a via de Wnt-4, que regula a motilidade celular através de FAK (Cohen et al., 2002). Em vertebrados, estas vias são responsáveis por controlar movimentos de gastrulação, morfologia de células epiteliais, indução para formação do coração, determinação do padrão dorso-ventral, separação dos tecidos, migração neuronal e câncer (Veeman et al., 2003).

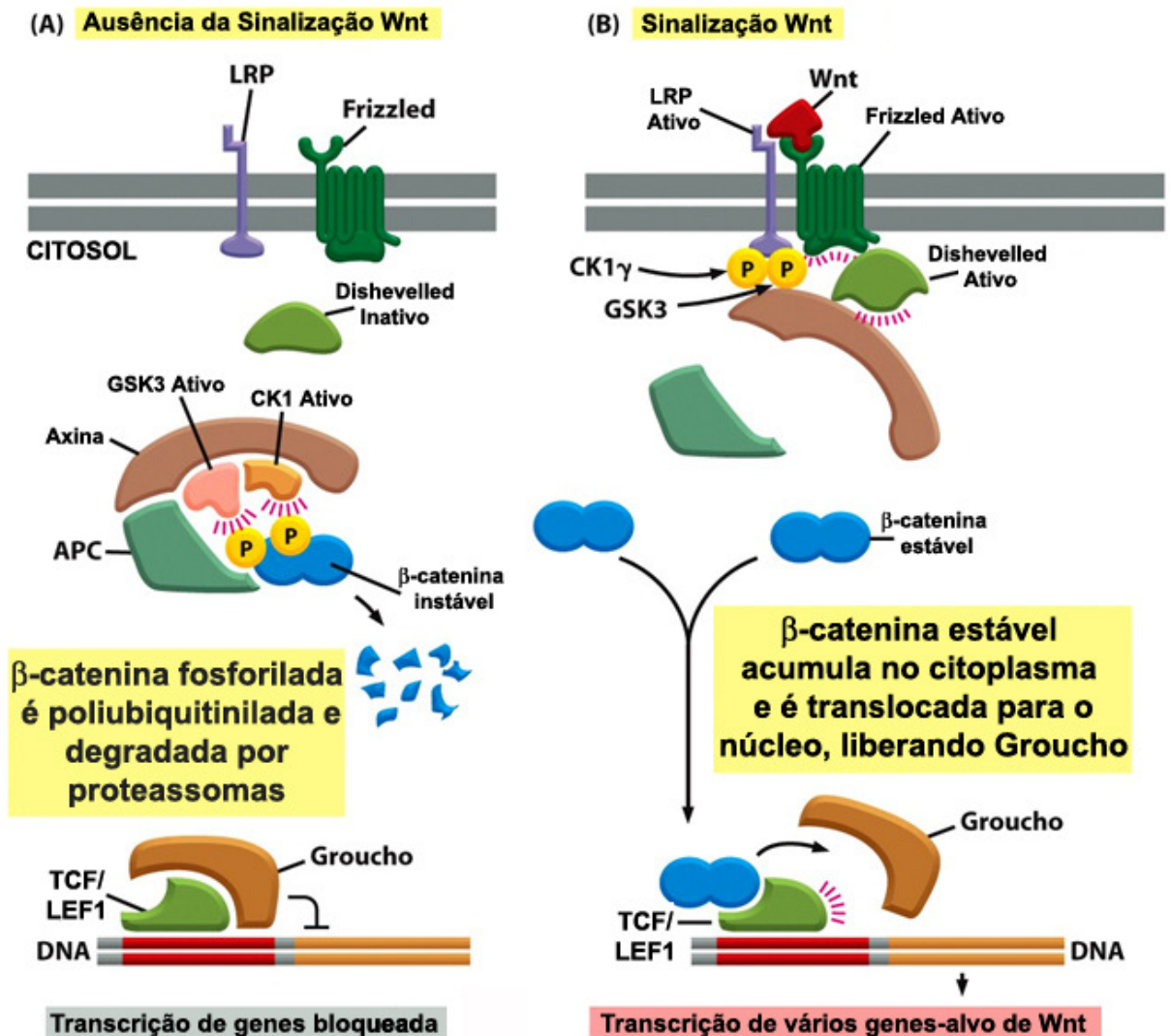


Figura 8 – Via clássica da sinalização Wnt/β-catenina (Alberts et al., 2009 - modificado).

1.5. Influências da via de Wnt na miogênese

O desenvolvimento das fibras musculares inicia-se nos somitos embrionários em resposta a moléculas sinalizadoras produzidas por tecidos vizinhos, como o tubo neural, notocorda e ectoderma dorsal. Moléculas candidatas para desempenhar essa atividade sinalizadora complexa pertencem à família de proteínas Wnts, Sonic hedgehog, como ativadores positivos e BMP4, como um possível inibidor (Cossu & Borello, 1999).

Membros da família de Wnt (Wnt1, Wnt3 e Wnt4), produzidos pelo tubo neural dorsal, são requeridos para ativar e estabilizar efetivamente o programa muscular na parte dorsal dos somitos (Cossu et al., 1996).

Experimentos com a dupla anulação de Wnt1 e Wnt3 mostraram que o compartimento medial do dermomiótomo não se forma e que há uma diminuição significativa na expressão de Myf5 (Ikeya & Takada, 1998).

Em somitos recém formados de camundongos, Fz1 é expresso ao longo da membrana das células, e estudos sugerem sua interação preferencial com Wnt1, o qual é produzido pelo tubo neural dorsal adjacente. Também foi descrita a interação preferencial de Fz7 com Wnt7 (Cossu & Borello, 1999).

Wnt1 é expresso pelo tubo neural dorsal, atua na via clássica Wnt/ β -catenina e ativa a transcrição de Myf5, enquanto Wnt7 é expresso pelo ectoderma dorsal, atua em uma via independente de β -catenina e induz a ativação de MyoD (Tajbakhsh et al., 1998). Este fato permite especular que Wnt1 e Wnt7 atuam em vias intracelulares diferentes, mas induzem a ativação direta ou indireta de fatores regulatórios miogênicos em células precursoras musculares que podem interagir entre si, como por exemplo, Myf5 podendo ativar MyoD.

Wnt7 induz a miogênese nos somitos de aves, ativando MyoD. Esta atividade pode ser inibida por BMP4, como prevenção de uma diferenciação muscular prematura (Hirsinger et al., 1997). Tajbakhsh e colaboradores em 1998, mostraram também que Wnt4, Wnt5a e Wnt6 ativam Myf5 e MyoD da mesma forma no mesoderma paraxial.

Uma nova classe de genes identificada é a das proteínas solúveis relacionadas com Fz (sFRPs) que podem regular a sinalização de Wnt (Leyns et al., 1997). Essas moléculas são secretadas e apresentam grande homologia com o domínio extracelular de Frizzled. Frzb1 é um membro desta família que inibe totalmente a miogênese em culturas de mesoderma pré-somítico e somitos recém formados, entretanto não apresenta nenhum efeito sobre somitos maduros.

A adição de sFRP1 ou sFRP2 em culturas de células de músculo esquelético C2C12 ou em culturas primárias de células satélites inibe a formação de miotubos, mas não afeta o ciclo celular nem a apoptose destas células. Além

disso, a remoção dos sFRPs do meio de cultura durante a diferenciação restaura a formação de miotubos, sugerindo que os sFRPs atuam prevenindo os mioblastos de entrarem no processo de diferenciação terminal (Descamps et al., 2008).

Galli e colaboradores (2004) mostraram que explantes de somitos de galinha cultivados em meio condicionado enriquecido em Wnt3a mantêm a expressão de Pax3 e Pax7 (fatores de transcrição envolvidos na proliferação de células musculares) e embriões transfectados com Wnt3a apresentaram uma expansão do dermomiótomo e miótomo, sugerindo um envolvimento de Wnt3a na proliferação de somitos de aves.

A superexpressão de proteínas Wnt1, Wnt3a ou Wnt5a aumenta a proliferação de células satélites, enquanto a superexpressão de Wnt4 ou Wnt6 inibe esse processo (Otto et al., 2008). Entretanto, Takata e colaboradores (2007) mostraram que a superexpressão de Wnt4 em células C2C12 induz a proliferação e a diferenciação muscular.

A sinalização de Wnt/ β -catenina controla o número de mioblastos diferenciados, enquanto Wnt5a e Wnt11 interferem na proporção de fibras musculares lentas e rápidas durante a diferenciação muscular esquelética em galinha (Anakwe et al., 2003). Também foi demonstrado que Wnt6 ativa a diferenciação muscular dos membros de aves via Pax3-Myf5, entretanto inibe a ativação de MyoD (Gueetha-Loganathan et al., 2005).

No estágio 12 do desenvolvimento de galinha, a β -catenina é expressa em todos os somitos, porém o gene *myoD* só é detectado em somitos mais anteriores, mais diferenciados, indicando que a β -catenina é expressa anteriormente a MyoD (Schmidt et al., 2000).

Células C2C12 em cultura que não expressam β -catenina não conseguem se diferenciar em miotubos, pois a β -catenina nuclear é capaz de interagir diretamente com MyoD e aumentar sua atividade transcricional, induzindo a miogênese (Kim et al., 2008). Pan e colaboradores (2005) mostraram que a β -catenina, que se acumula durante a sinalização de Wnt canônica de células-tronco embrionárias de carcinoma P19, se liga a I-mfa (inibidor da família de MyoD) diminuindo o efeito supressor deste sobre a atividade transcricional de MyoD.

A sinalização de Wnt/ β -catenina na miogênese não parece estar ativada exclusivamente durante o desenvolvimento embrionário. Proteínas Wnts também atuam na miogênese de células-tronco adultas de camundongo e positivas para CD45 durante a regeneração muscular. Foi mostrado que o antagonista da via de Wnt, sFRP2/3 quando injetado em músculos em regeneração, reduziu a proliferação e a diferenciação de células-tronco positivas para CD45 (Polesskaya et al., 2003).

Células-tronco positivas para CD133 derivadas de sangue periférico de seres humanos, quando cocultivadas com fibroblastos de camundongos que secretam Wnt7a, se fundiram e se diferenciaram em miotubos, expressando marcadores miogênicos. Entretanto, quando as mesmas foram cocultivadas com fibroblastos que secretam Wnt1, as células permaneceram arredondadas e não expressavam nenhum tipo de FRMs (Torrente et al., 2004).

Rochat e colaboradores (2004) demonstraram que a insulina e a via de Wnt/ β -catenina induzem a ativação de células satélites e causam hipertrofia muscular. Coculturas de mioblastos com fibroblastos que secretam Wnt1 induzem a expressão de MyoD e miogenina em células satélites. Eles demonstraram que estas células satélites ativadas se fundem com miotubos pré-existentes, proporcionando o aumento da fibra muscular.

1.6. Microdomínios de membrana

Uma vez que a membrana plasmática é a parte mais externa da célula, parece evidente que elementos dela estejam envolvidos na adesão e fusão de mioblastos. Recentemente, o modelo de organização de membranas plasmáticas foi repensado em função de descobertas sobre regiões diferenciadas de membranas, os chamados microdomínios (**Figura 9**) ou “*rafts*” (do inglês: balsas, plataformas). Estes microdomínios são regiões enriquecidas em colesterol e esfingolipídeos que fazem com que sejam menos fluidas e mais espessas do que o resto da membrana (Galbiati et al., 2001). Acredita-se que estas balsas podem se mover na membrana e servem para organizá-la em uma série de microdomínios discretos, participando assim, de várias funções celulares, tais

como tráfego intracelular de vesículas e transdução de sinais (Simon e Ikonen, 1997).

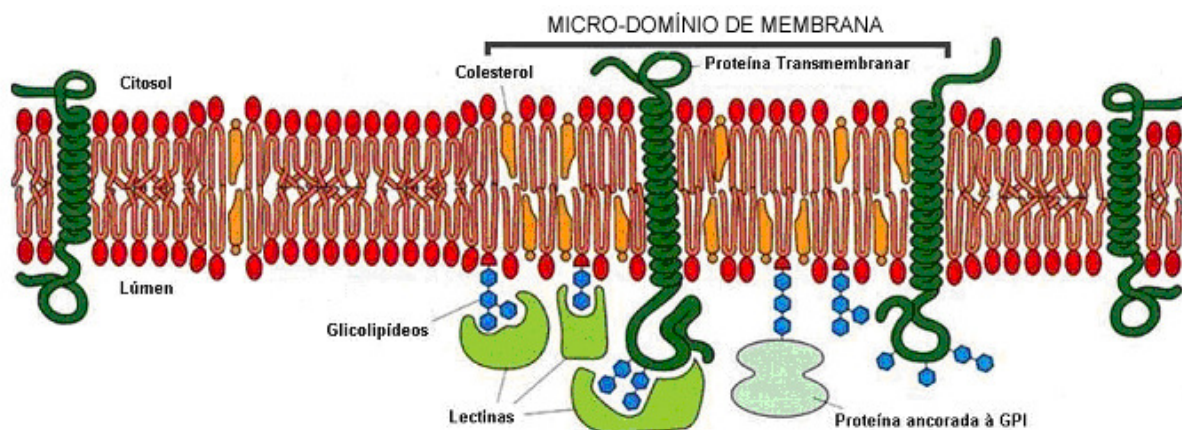


Figura 9 - Composição dos microdomínios de membrana (Alberts et al., 2002 - modificado).

Os microdomínios comportam vários tipos de proteínas como: proteínas com regiões transmembranares mais longas, proteínas ancoradas à GPI (glicosil fosfatidilinositol) e tirosina cinases. Proteínas podem ser seletivamente incluídas ou excluídas destes microdomínios, e mais ainda, algumas dependem de colesterol ou de esfingolipídeos para sua atividade (Klein et al., 1995).

O colesterol influencia a interação entre lipídeos e proteínas através do aumento da espessura da membrana nos microdomínios e confere ainda uma diminuição da fluidez de moléculas desta região quando comparada ao restante da membrana (Nguyen et al., 2004). O colesterol permite a formação de uma fase líquida organizada, que determina as propriedades físicas gerais dos microdomínios (revisado por Pike, 2004). A formação dos microdomínios é dependente da concentração de colesterol e sua presença regula a expressão de proteínas ancoradas à GPI na superfície celular (Cerneus et al., 1993) e de glicolipídeos de membrana (Ilangumaran et al, 1998).

Além destes lipídeos (colesterol e esfingolipídeos), os microdomínios também expressam glicolipídeos específicos, como os gangliosídeos GM1 (Gómez-Moutón et al., 2004), e âncoras de GPI (Mukai et al., 2009) que são utilizados em diversos trabalhos como marcador de “rafts” lipídicas.

Além das proteínas citadas anteriormente, os microdomínios de membrana podem ser enriquecidos em caveolina, componente protéico estrutural (integral na membrana) que provoca diferenças na morfologia e/ou na função do microdomínio, e caracterizam estruturas chamadas de cavéolas (Razani, et al., 2002).

Acredita-se que as cavéolas também participam no tráfego de vesículas (endocitose), na transcitose, no transporte de colesterol para membrana, e nos processos de transdução de sinais, por atuarem na organização e concentração de lipídeos e proteínas específicas dentro das membranas caveolares (Razani & Lisanti, 2001). Outra hipótese é a de que os microdomínios não-caveolares representam os precursores das cavéolas, por facilitarem a inserção de certas proteínas nestas regiões de membrana.

A família de genes de caveolina de mamíferos consiste de caveolina-1, -2 e -3. As caveolinas-1 e -2 são coexpressas e estão presentes em muitos tipos celulares, enquanto a expressão de caveolina-3 é específica de músculos estriados (cardíaco e esquelético) e liso (Smart et al., 1999).

Descobriu-se que a presença de caveolina-1 (a primeira caveolina descoberta) determina a formação de cavéolas. As cavéolas encontram-se principalmente em fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e células musculares estriadas e lisas (Smart et al., 1999).

A proteína caveolina-1 foi descrita como marcadora de células quiescentes musculares, pois não é expressa em miofibras maduras (Volonte et al., 2005). Durante a regeneração muscular de camundongos ocorre uma diminuição da expressão de caveolina-1 nas células quiescentes para entrada destas no programa de diferenciação muscular. Esta regulação negativa é feita pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF), produzido logo após a injúria ao tecido muscular. Por outro lado, a superexpressão de caveolina-1 inibe o mecanismo de reparo muscular tanto *in vitro* como *in vivo*.

A proteína caveolina-3 é expressa durante a diferenciação de mioblastos esqueléticos e se localiza no sarcolema, onde forma um complexo com a proteína distrofina e se associa a glicoproteínas (Mermelstein et al., 2007; Sotgja et al.,

2000). Uma mutação na sequência do gene da caveolina-3 humana está relacionada à distrofia muscular pélvica escapular (Galbiati et al., 2001). Volonte e colaboradores (2003) mostraram que a superexpressão de caveolina-3 em camundongos induz um fenótipo semelhante ao da distrofia muscular de Duchenne, inibindo a fusão de mioblastos, com miotubos finos e áreas de degeneração muscular. Por outro lado, a anulação do gene de caveolina-3 provocou um aumento da fusão de mioblastos e a formação de miofibras muito mais espessas que as de animais-controle.

Trabalhos recentes indicam que os lamelipódios de células miogênicas contêm sítios competentes para fusão que são enriquecidos em microdomínios de membrana. Esses microdomínios agrupam proteínas de adesão como a caderina M, β -catenina e catenina p120, que promovem a adesão entre os mioblastos. No momento da fusão, ocorre uma dispersão destas *rafts* nos lamelipódios, diminuindo a concentração de colesterol, promovendo a fusão e formação de miotubos. Esses resultados sugerem que os microdomínios de membrana apresentam um papel importante na regulação da miogênese (Mukai et al., 2009).

1.7. Justificativa para este trabalho de tese

Inúmeros estudos examinaram a influência do colesterol nas propriedades físicas e funcionais dos microdomínios de membrana. Diferentes métodos que reduzem os níveis de colesterol celular foram utilizados em cultura de células como a inibição da biossíntese de colesterol pela compactina (Rothberg et al., 1990), lovastatina, pravastatina ou sinvastatina (Gadbut et al., 1995), a depleção de colesterol pela oxidação da colestenoína (Smart et al., 1994), ou a inativação do colesterol por agentes que se ligam a ele, como a filipina, estreptolisina-O, digitonina, nistatina (Xie & Low, 1995) ou saponina (Cerneus et al., 1993). Existe também uma substância chamada de metil- β -ciclodextrina (MCD) que retira seletivamente moléculas de colesterol da membrana plasmática (Bodin et al., 2001). Uma vez que microdomínios são enriquecidos em colesterol, esta droga tem sido usada para desorganizá-los, e desta forma testar as relações deles em eventos celulares específicos. Nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos da depleção de colesterol com MCD em células musculares esqueléticas de embriões de galinha crescidas em cultura (Mermelstein et al., 2005, 2007; Portilho et al., 2007). Nestes estudos observamos um aumento: no índice de fusão de mioblastos (**Figura 10**), na proliferação celular (**Figura 11**), na diferenciação muscular (**Figura 12**), além da translocação nuclear da β -catenina após a depleção de colesterol (**Figura 13**). Estes resultados nos instigaram a investigar o possível envolvimento da via de Wnt/ β -catenina nos eventos observados após a retirada de colesterol membranar pela MCD em culturas de células musculares esqueléticas.

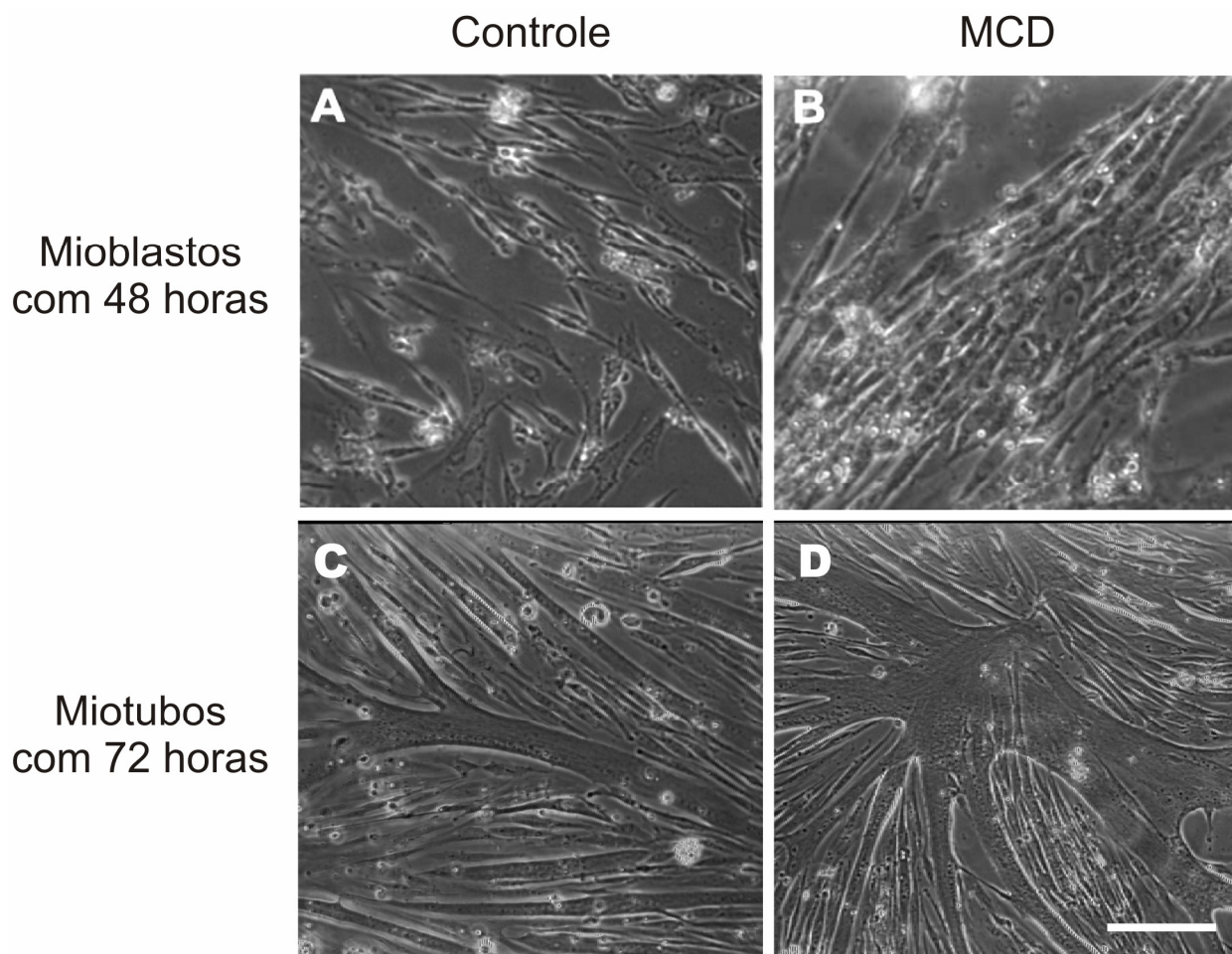


Figura 10 - Efeitos da MCD na fusão de mioblastos. Microscopia óptica de contraste de fase de células de músculo esquelético de embriões de galinha crescidos em cultura. A- culturas-controle com 48 horas; B- culturas tratadas com MCD com 48 horas; C- culturas-controle com 72 horas; D- culturas tratadas com MCD com 72 horas. O tratamento com MCD leva a um recrutamento maior de mioblastos para adesão (B), além de levar à formação de miotubos mais espessos (D) que os encontrados nas culturas controle (C). Barra = 100 μ m.

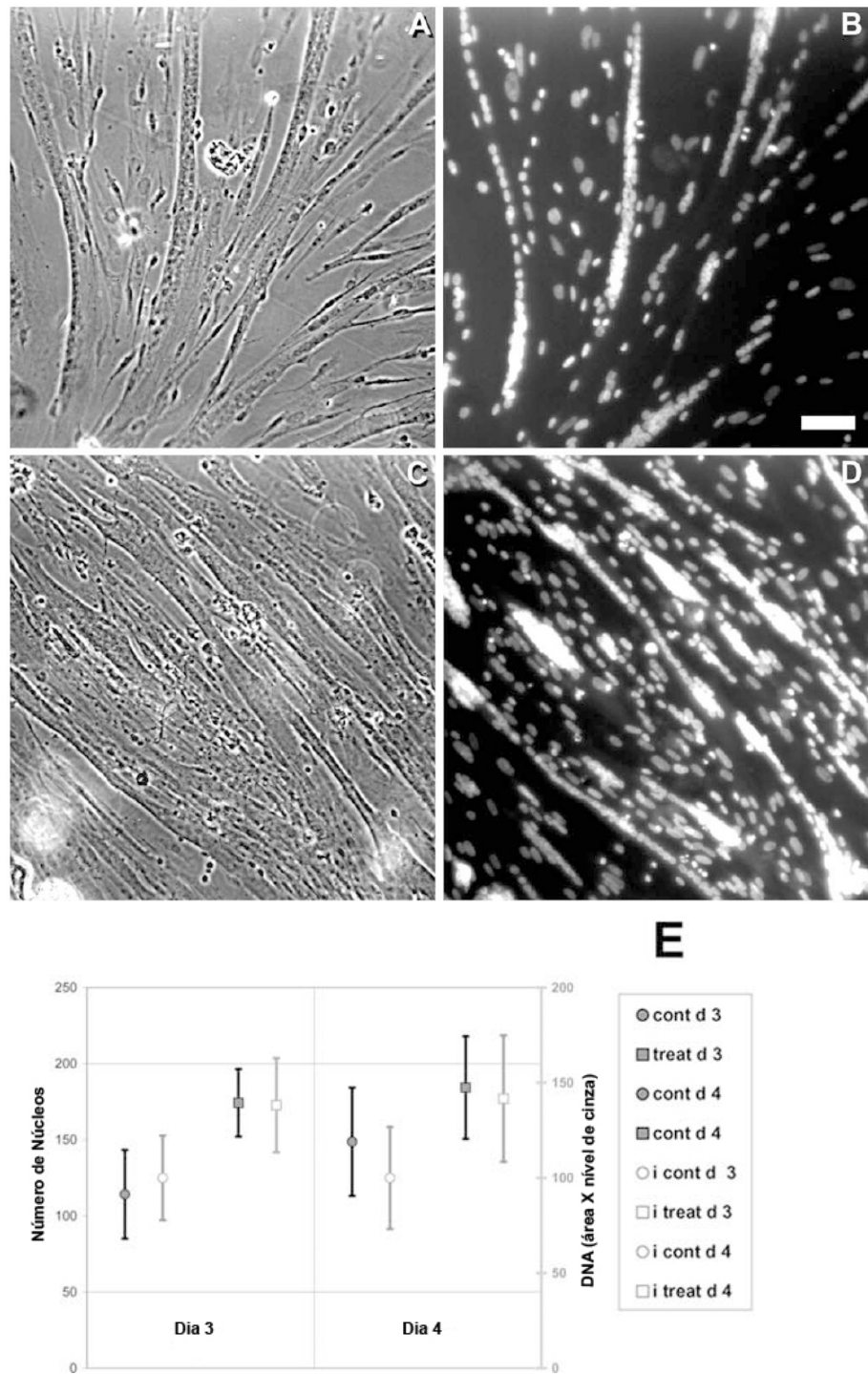


Figura 11 - Efeitos da MCD na proliferação celular. Culturas tratadas com MCD (C e D) apresentam um número de núcleos por campo maior que as culturas não tratadas (A e B) (Mermelstein & Portilho et al., 2005). Barra = 50 μ m.

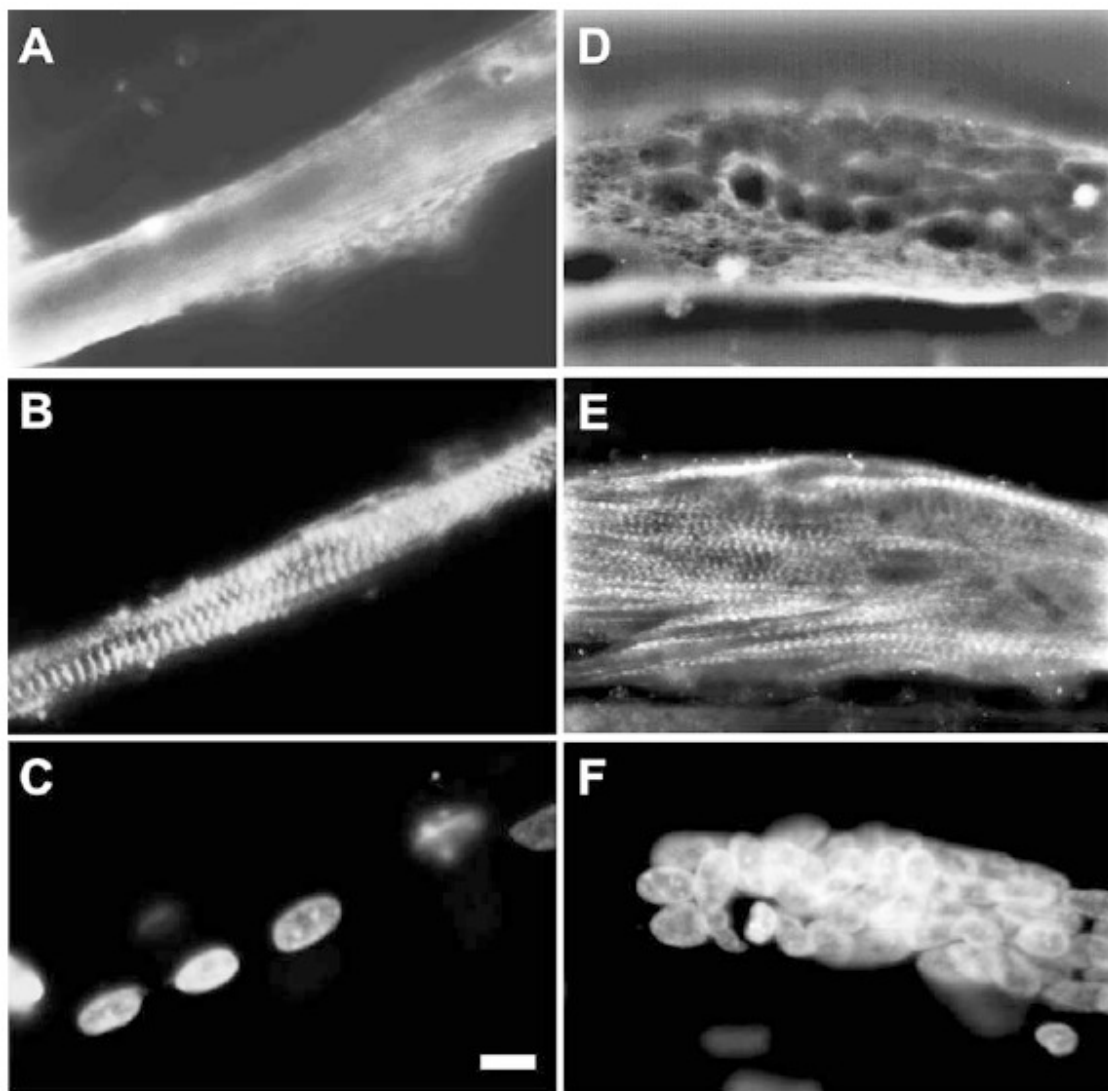


Figura 12 – Efeitos de MCD na diferenciação muscular. Cultura tratadas com MCD (D-F) apresentam miotubos mais espessos e com maior número de miofibrilas, que os controles (A-C). Pode-se observar a localização dos filamentos de desmina ao longo de todo o citoplasma de miotubos controle e tratados (A e D), da alfa-actinina nos discos Z dos sarcômeros (B e E) e dos núcleos marcados com DAPI (C e F) (Mermelstein & Portilho, 2005). Barra = 10 μ m.

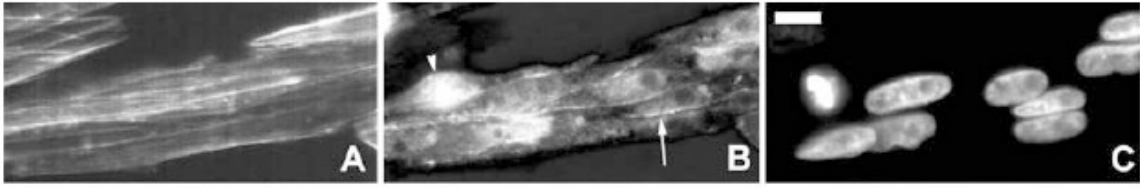


Figura 13 – O tratamento com MCD induz a translocação da β -catenina para o núcleo de mioblastos, além de estar presente também nas junções intercelulares (Mermelstein & Portilho et al., 2005). Barra = 10 μ m.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral investigar se a depleção de colesterol em células musculares pela metil-beta-ciclodextrina (MCD) interfere na via de sinalização Wnt/ β -catenina.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar e quantificar os efeitos morfológicos promovidos pela MCD em células musculares esqueléticas;
- Analisar a distribuição e a expressão da proteína de adesão β -catenina em células musculares tratadas com MCD;
- Quantificar os níveis de β -catenina presentes no núcleo e na membrana plasmática de células musculares;
- Verificar se a MCD é capaz de interferir na via de sinalização Wnt/ β -catenina em células musculares;
- Verificar se o inibidor da via Wnt/ β -catenina, Frzb-1, é capaz de inibir a ação da MCD;
- Verificar se os meios condicionados provenientes de culturas de células musculares tratadas com MCD induzem efeitos em culturas controle;
- Analisar os efeitos do tratamento com MCD na proliferação celular;
- Analisar e quantificar a expressão de marcadores de diferenciação muscular em células musculares tratadas com MCD;
- Analisar a expressão de genes relacionados com a via de Wnt/ β -catenina em células musculares tratadas com MCD.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Todos os procedimentos de utilização de animais desta tese foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (protocolo número DAHEICB 004), conforme documento presente no anexo desta tese.

3.2. Culturas primárias de músculo esquelético

Culturas primárias de músculo esquelético peitoral de embriões de galinha de 11 dias foram realizadas a partir de ovos provenientes da Granja Tolomei (Rio de Janeiro, RJ), de acordo com o descrito por Mermelstein e colaboradores (1996).

No fluxo laminar, cada ovo foi aberto e o embrião depositado sobre uma placa de Petri. O corpo do embrião foi transferido com o peito voltado para cima para outra placa contendo BSS (solução salina balanceada). Na lupa, cortou-se a região humeral do músculo e as inserções do esterno e da clavícula usando pinça de relojoeiro número 5. O músculo então foi retirado e transferido para uma placa de Petri de 35 mm. De volta ao fluxo laminar, o músculo foi picotado utilizando-se facas de microcirurgia e incubado por 15 minutos em uma estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ com CMF (solução salina balanceada sem cálcio e sem magnésio) e tripsina 0,25% para ajudar a dissociação das células. O conteúdo da placa foi colocado em um tubo juntamente com o meio de cultura 8-1-0,5 (80% de meio essencial mínimo, 10% de soro de cavalo e 0,5% de extrato de embriões de galinhas). O soro de cavalo inibe a ação da tripsina. Logo depois, a mistura foi centrifugada durante 5 minutos em centrífuga clínica, e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi ressuspendido com meio de cultura 8-1-0,5 e as células foram filtradas por um filtro de membrana de plâncton. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer e plaqueadas a uma densidade inicial de 5×10^5 células por placa de cultura de 35 mm (Descarplast, Brasil). Essas placas continham quadrados do plástico aclar (Pro-Plastics Inc., EUA) previamente

coberto com colágeno de rabo de rato. Em seguida, as células foram incubadas em uma estufa de células a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As células tiveram seus meios trocados todos os dias por 8-1-0,5 fresco.

Todos os reagentes utilizados nas culturas de células foram obtidos da Gibco (EUA).

3.3. Culturas primárias de fibroblastos

As culturas primárias de fibroblastos foram preparadas a partir do tecido conjuntivo que recobre o músculo peitoral de embriões de galinha com 11 dias. A camada de tecido conjuntivo foi picotada utilizando-se facas de microcirurgia e incubada por 15 minutos em uma estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ com CMF (solução salina balanceada sem cálcio e sem magnésio) e tripsina 0,25% para ajudar a dissociação das células. O conteúdo da placa foi colocado em um tubo juntamente com o meio de cultura 8-1-0,5. Logo depois, a mistura foi centrifugada durante 5 minutos em centrífuga clínica, e descartou-se o sobrenadante. O pellet foi ressuspendido com meio de cultura 8-1-0,5 e as células foram filtradas por um filtro de membrana de plâncton. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer e plaqueadas a uma densidade inicial de 5 X 10⁵ células por placa de cultura de 35 mm (Descarplast, Brasil). Essas placas continham quadrados do plástico aclar previamente coberto com colágeno de rabo de rato. Em seguida, as células foram incubadas em uma estufa de células a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As células tiveram seus meios trocados todos os dias por 8-1-0,5 fresco. Culturas subconfluentes de fibroblastos foram utilizadas após quatro passagens de tripsinização para a exclusão de possíveis mioblastos contaminantes.

3.4. Tratamento com a substância metil-beta-ciclodextrina (MCD)

As culturas primárias de músculo esquelético e de fibroblastos com 24 horas de vida foram tratadas com metil-beta-ciclodextrina (MCD) a 2 mM (a partir de um estoque de MCD a 500 mM feito em água destilada) por 30 minutos a 37 °C. Após o tratamento, as culturas continuaram crescendo em meio sem droga e

foram utilizadas com 3, 24, 48, 72 ou 96 horas em diferentes experimentos. Este tratamento foi empregado em todos os experimentos, com exceção de culturas transfectadas, as quais foram tratadas 24 horas após a transfecção (com 48 horas de vida).

3.5. Obtenção de meios condicionados controle e MCD

As culturas primárias de músculo esquelético e de fibroblastos com 24 horas de vida foram tratadas com MCD a 2 mM por 30 minutos a 37 °C. Após 3 horas do tratamento com a MCD foi recolhido o meio condicionado de culturas primárias (culturas com 27 horas e 30 minutos de vida). Este meio, denominado de meio condicionado MCD, foi adicionado a uma cultura controle com 24 horas e mantido por mais 48 horas. Em seguida, estas culturas foram analisadas por microscopia óptica de contraste de fase e imunofluorescência.

O meio condicionado controle foi obtido de culturas primárias-controle com 27 horas e 30 minutos de vida (porém, na presença de meio fresco apenas por 3 horas, assim como as culturas tratadas com MCD). Este meio-controle também foi adicionado à outra cultura-controle com 24 horas e mantido por mais 48 horas. Em seguida, estas culturas foram analisadas por microscopia óptica de contraste de fase e imunofluorescência (**Figura 14**).

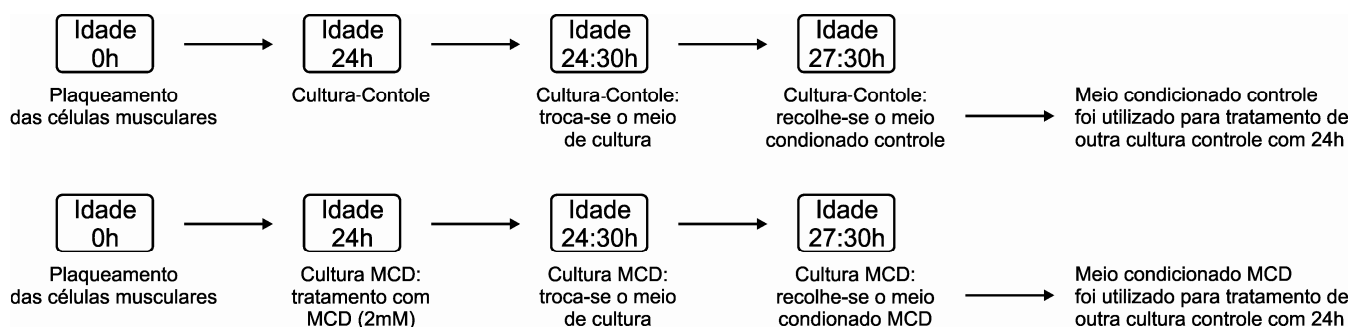


Figura 14 - Esquema mostrando como os meios condicionados foram obtidos.

3.6. Filtragem de meios condicionados pelos Centricons YM-30 e YM-50

Os meios condicionados de culturas-controle e de culturas tratadas com MCD foram recolhidos 3 horas após o tratamento com MCD (células com 27 horas e 30 minutos de vida) e centrifugados com os filtros centricons YM-30 e YM-50 por 100 minutos a 2000 rpm. Após a filtragem, os meios condicionados controle e MCD foram adicionados a culturas-controle com 24 horas de vida e mantidos por mais 48 horas (**Figura 15**). Após esse tempo as células foram fixadas e observadas à microscopia óptica de contraste de fase e preparadas para imunofluorescência.

Centricons (Millipore, EUA) são utilizados para filtrar substâncias com peso molecular menor do que seu limite nominal. Quando os Centricons YM-30 foram utilizados para filtrar os meios condicionados, foi produzido um meio condicionado somente com fatores solúveis com menos de 30 kDa e quando utilizou-se os Centricons YM-50, foi produzido um meio condicionado somente com fatores solúveis com menos de 50 kDa.

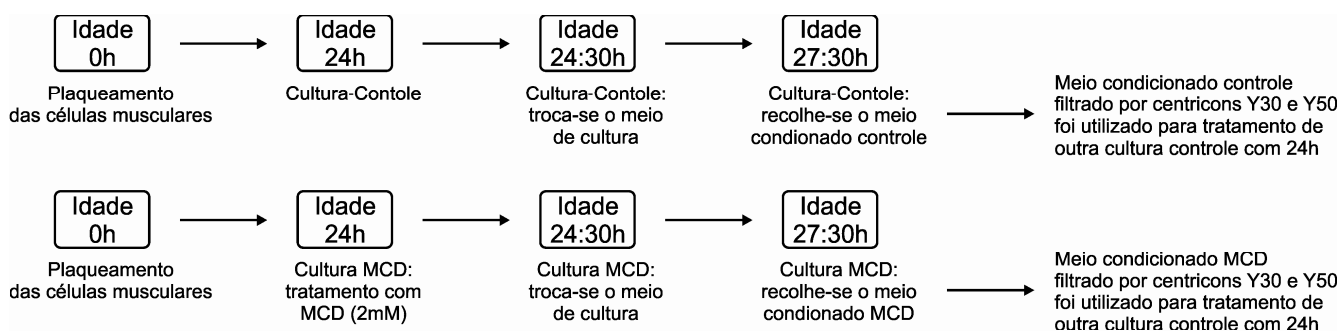


Figura 15 - Esquema mostrando como os meios condicionados filtrados foram obtidos.

3.7. Obtenção e tratamento de culturas musculares com meio condicionado enriquecido em Wnt 3a e Wnt 5a

Foram plaqueadas 5×10^4 células L de camundongo (meio condicionado controle), de células L Wnt 3a e células L Wnt 5a em garrafas de 75 cm^2 em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,4 mg/mL de G-418. Após

4 dias de crescimento, o meio foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 μm de porosidade (primeira batelada).

Na mesma cultura foi adicionado o mesmo meio de cultura fresco e após 3 dias, o meio foi recolhido e filtrado em membrana de 0,22 μm de porosidade (segunda batelada).

A primeira e a segunda batelada de meio foram misturadas na proporção 1:1, constituindo o meio condicionado enriquecido em Wnt 3a e Wnt 5a, que foi aliquotado e congelado.

As culturas-controle e as culturas recém tratadas com MCD com 24 horas cresceram na presença de meio condicionado enriquecido em Wnt 3a e Wnt 5a por mais 48 horas. Em seguida, elas foram analisadas por microscopia óptica de contraste de fase e preparadas para imunofluorescência conforme o item 3.9.

3.8. Obtenção e tratamento de culturas musculares com meio condicionado enriquecido em Frzb-1

Células de rim humanas (células 293T) cultivadas em DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino foram transfectadas com 10 μg do vetor pcDNA 3/Frzb-1, gentilmente cedido pelo Dr. De Robertis (Leyns et al., 1997). A transfecção foi realizada quando as células atingiram aproximadamente 60% de confluência pela técnica de fosfato de cálcio (Pera e De Robertis, 2000). O meio condicionado enriquecido em Frzb-1 foi obtido cultivando as células transfectadas em DMEM/F12/Iscove's sem os aminoácidos essenciais por 48 horas após a transfecção. A inibição da via de sinalização Wnt/ β -catenina por Frzb-1 foi testada bloqueando a atividade luciferásica de células 293T transfectadas com Top-Flash e Wnt (método descrito posteriormente).

As culturas-controle e as culturas recém tratadas com MCD (ambas com 24 horas) cresceram na presença de meio condicionado enriquecido em Frzb-1 por mais 24 horas. Em seguida, foram analisadas por microscopia óptica de contraste de fase, preparadas para imunofluorescência e submetidas a ensaios que avaliaram a ativação da via de Wnt/ β -catenina.

3.9. Microscopia de fluorescência

As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato com salina) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram permeabilizadas com PBS contendo Triton X-100 0,5% (PBS/T) por três vezes (de 10 minutos cada) à temperatura ambiente e sob agitação. As células foram então incubadas com os anticorpos primários (devidamente diluídos em PBS/T) por 1 hora a 37 °C, conforme a Tabela 1. Após as incubações, as células foram lavadas com PBS/T por três vezes (de 10 minutos cada) e incubadas com os anticorpos secundários (diluídos apropriadamente em PBS/T) por 1 hora a 37 °C, conforme a Tabela 2. Foram realizados experimentos-controle somente com os anticorpos secundários (omitindo-se a incubação com os anticorpos primários).

Após três lavagens com PBS/T, as células foram lavadas com NaCl 0,9% por 5 minutos e depois incubadas com a sonda fluorescente DAPI a 0,1 µg/ml em NaCl 0,9% para revelação dos núcleos celulares. As células foram montadas em lamínulas de vidro de 24 x 60 mm, utilizando-se como solução de montagem: glicerol a 60 %, PPD a 0,0025 %, N-Propil-Galato a 5 % e DABCO a 0,25 % pH 7,5.

3.10 Ensaio de BrdU

As células-controle e tratadas com MCD com 24:30 horas de vida foram incorporadas com 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma, EUA) a 3 µg/mL por 1 hora. Em seguida, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente e foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C por 15 minutos. Após as lavagens, as culturas foram incubadas com HCl a 2N por 30 minutos a 50°C, lavadas com tampão borato (pH 8,5) 0,1M por 10 minutos e lavadas mais uma vez com PBS. Em seguida, as células foram duplamente marcadas com anticorpos anti-desmina e anti-BrdU e a imunofluorescência foi analisada. Para a quantificação de células mononucleadas positivas para desmina e para BrdU, foram contados 50 campos de cada condição de cultura em três experimentos diferentes.

Tabela 1- Anticorpos primários

Anticorpos Primários	Tipo	Diluição Utilizada	Peso Molecular do antígeno reconhecido	Origem
anti- β -catenina	policlonal	If: 1:50 Ib: 1:4000	88 kDa	Sigma Chemical Co. (EUA)
anti- α -actina sarcomérica clone: 5C5	monoclonal	Ib: 1:500	43 kDa	Sigma
anti- β -actina	policlonal	Ib:2000	43 kDa	Sigma
anti- α -actinina sarcomérica clone: EA53	monoclonal	If: 1:50	100 kDa	Sigma
anti-desmina	policlonal	If: 1:100 Ib: 1:5000	52 kDa	Sigma
anti- α -tubulina clone: DM 1A	monoclonal	Ib:1:3000	55 kDa	Sigma
anti-caderina M clone: 5	monoclonal	Ib: 1: 1000	130 kDa	Transduction Laboratories Inc. (EUA)
Anti-Wnt3a	policlonal	Ib – 1:500	34 kDa	Zymed (EUA)
Anti-Ki67	policlonal	If: 50	359 kDa	Abcam (EUA)
Anti-BrdU clone: BU33	monoclonal	If: 50		Sigma
Anti-Pax3	monoclonal	Ib: 1:200	53 kDa	Devel. Studies Hybridoma Bank (DSHB, EUA)

Anti-Pax7	monoclonal	If: 1:25 Ib: 1:200	55 kDa	DSHB
Anti-Mf 20 (cadeia pesada de miosina)	monoclonal	Ib: 1:1000	200 kDa	DSHB

If: diluição utilizada para imunofluorescência.

Ib: diluição utilizada para *immunoblotting*.

Tabela 2- Anticorpos secundários e sondas

Anticorpos Secundários	Diluição Utilizada	Origem
anti-IgG de coelho-Alexa 488	1:50	Molecular Probes (EUA)
anti-IgG de camundongo-Alexa 488	1:50	Molecular Probes
anti-IgG de coelho-Alexa 546	1:200	Molecular Probes
anti-IgG de camundongo-Alexa 546	1:200	Molecular Probes
anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase	1:7000	Promega (EUA)
anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase	1:7000	Promega
DAPI	1:2000	Molecular Probes
Faloidina-FITC	1:100	Sigma

3.11. Aquisição e processamento de imagens

As células foram observadas em um microscópio óptico invertido Axiovert 100 (Carl Zeiss, Alemanha), com filtros seletivos apropriados para fluoresceína, rodamina, UV (DAPI), e contraste de fase. As imagens foram adquiridas com um processador de imagens Argus 20 (Hamamatsu Photonics, Japão) acoplado a uma câmera CCD integrada (Hamamatsu, Photonics, Japão), e transferidas através de uma interface SCSI a um computador Dell Optiplex GX270 computer (Dell Corporate, Round Rock, EUA). As pranchas foram montadas utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, EUA).

3.12. Transfecção de plasmídeos e ensaio da atividade luciferásica

As transfecções de plasmídeos e o ensaio de atividade luciferásica foram realizados em colaboração com o Professor José Garcia Abreu e seu aluno de doutorado Fábio Mendes do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ.

As células musculares foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas e quando atingiram 80% de confluência foram transfectadas com os plasmídeos pGal (para expressão de β -galactosidase) e TOP-Flash (gene repórter Luciferase com sítio de ligação à TCF/LEF), ou plasmídeos pGal e FOP-Flash (controle negativo, onde o gene repórter Luciferase está mutado no sítio de ligação TCF/LEF) (Korinek et al., 1997), utilizando PolyFect Transfection Reagent (Qiagen Inc., EUA). A mistura de DNAs foi mantida em temperatura ambiente por 20 minutos e depois diluída em MEM sem soro. Essa solução foi adicionada às células, e assim foram mantidas por aproximadamente 6 horas a 37 °C em meio sem soro. Após este tempo, as células cresceram em meio de cultura 8-1-0,5 (com soro) a 37 °C.

Algumas células com 48 horas de vida (24 horas após a transfecção), foram tratadas com MCD a 2 mM por 30 minutos e em seguida, foi adicionado meio 8-1-0,5. Após 24 horas (células com 72 horas de vida), as células foram lisadas com tampão de lise (Promega Corporation, Brasil). Cada experimento (transfecção de células controle com Fop, transfecção de células controle com Top, transfecção de

células tratadas com Fop e transfecção de células tratadas com Top) foi realizado em triplicatas.

Primeiramente, foi feita a quantificação da quantidade de β -galactosidase produzida pelos mioblastos, analisando, portanto, se a transfecção foi efetiva. A expressão da atividade de β -galactosidase foi medida pela adição de X-gal aos poços e lida em um leitor de microplacas Bio-rad, Benchmark a 415 nm.

Para medir a atividade da enzima luciferase, transferiu-se uma alíquota das células para uma placa especial do luminômetro Tecan-Genios e foi adicionado o substrato enzimático (Promega Corporation, Brasil). Para normalização dos resultados, a atividade luciferásica foi calculada dividindo-se o valor de cada poço obtido pelo luminômetro pelos valores de β -galactosidase correspondentes. Os gráficos foram feitos pelo programa Microsoft Excel 6.0 (Microsoft Corporation, Brasil) utilizando a média dos valores das triplicatas.

3.13. Preparo de amostras para eletroforese

As culturas primárias musculares controle e tratadas com MCD foram lavadas três vezes com PBS e depois tratadas com 150 μ L de tampão RIPA (Tris HCl 0,05 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, NP-40 1%, deoxicolato de sódio 0,25% e coquetel com inibidores de proteases). Com este tampão, as células foram raspadas e colocadas em tubos o'ring. Foi retirada uma alíquota para realização da dosagem de proteínas das amostras e o restante foi tratado com tampão de lise (SDS 4%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 20% e DTT 0,2 M) na proporção de 1:1 (amostra:tampão de lise) e congelado a -20°C .

Para o isolamento de frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 (Goichberg et al., 2001), o extrato de células foi extraído diretamente em Tampão MES pH 6,0 (MES 50mM, Triton X-100 0,5%, EGTA 2,5 mM, MgCl_2 5 mM e coquetel com inibidores de proteases) a 4°C . As frações solúveis foram coletadas após 2 minutos em contato com o Tampão MES. As frações insolúveis foram raspadas após 2 minutos em contato com Tampão MES e coletadas em tubo o'ring. Aliquotas idênticas das duas frações receberam o tampão de amostras

(SDS 4%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20% e DTT 0,2 M) e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.14. Ensaio de Imunoprecipitação

1 mL dos meios condicionados coletados de culturas controle e tratadas com MCD após 27 horas de cultivo (3 horas após o tratamento com a MCD) foi incubado *overnight* a 4°C com o anticorpo anti-Wnt3. No dia seguinte, esses meios condicionados foram incubados com 50 µL de proteína sefarose A CL-4B (Sigma) pH 7,4 por 1 hora a 4°C, com leve agitação. Após centrifugação a 3000 g por 2 minutos a 4°C, os complexos imunoprecipitados foram excessivamente lavados em tampão HEPES pH7,5 (HEPES 20mM, NaCl 150mM, Triton X-100 0,1% e glicerol 10%). As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e centrifugadas a 12000 g por 30 segundos à temperatura ambiente. As amostras de meio condicionado-controle e meio condicionado MCD imunoprecipitadas foram tratadas com tampão de amostras (SDS 4%, Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 20% e DTT 0,2 M), aplicadas num gel de poliacrilamida a 10% e transferidas para uma membrana de PVDF. Essa membrana foi então, incubada com anticorpo anti-Wnt3.

3.15. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As culturas primárias musculares controle e tratadas com MCD foram lavadas três vezes com PBS e depois tratadas com 1 volume de tampão de amostras e fervidas por 5 minutos a 100°C. As amostras foram conservadas a -20 °C. Géis de corrida desnaturantes de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) foram preparados e as amostras aplicadas nos poços das eletroforeses com a mesma quantidade de proteínas (60 µg). A quantidade de proteínas presente nas amostras foi avaliada através do método de Bradford (1976), usando-se a albumina de soro bovina como padrão. As eletroforeses foram realizadas a corrente constante (cerca de 12 mA) por cerca de 2 horas a 4°C.

3.16. Immunoblotting (Ib)

A revelação imunológica da transferência eletroforética de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida para folha de PVDF (Millipore, Brasil), ou *immunoblotting*, foi feita de acordo com o descrito por Towbin e colaboradores (1979), com algumas modificações.

Primeiramente, foi feita uma eletroforese unidimensional em gel desnaturante de poliacrilamida das amostras contra as quais se quis fazer um reconhecimento imunológico.

Ao final da eletroforese, o gel foi colocado no tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 191 mM e metanol 20%), por 20 minutos. A folha de PVDF foi ativada por 10 segundos em metanol 100% e lavada em água destilada por 5 minutos, sob agitação. A seguir, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para esta folha, durante 2 horas, a 60 mV (85 mA) e à 4 °C. Depois a PVDF foi corada pela solução de Vermelho de Ponceau (Vermelho de Ponceau 0,1% e ácido acético 5%) e a eficiência da transferência foi analisada.

As proteínas imobilizadas na membrana foram imediatamente bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente por uma solução de 5% de leite em pó desnatado Molico em tampão TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,2%, pH 8) e após, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos cada, com TBS-T. A PVDF então, foi incubada com o anticorpo primário (ver Tabela 1), diluído adequadamente neste mesmo tampão, durante a noite, a 4 °C e sob agitação. Após a incubação, a PVDF foi lavada mais 5 vezes, por 3 minutos cada, com TBS-T. A seguir, incubou-se com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase devidamente diluído (ver Tabela 2), por 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação. Após quatro lavagens de 10 minutos cada, com TBS-T, a PVDF foi submetida à revelação pelo Kit Super Signal West Pico (Pierce, EUA) e todo o procedimento foi feito segundo protocolo da Pierce. Para se normalizar os dados dos *immunoblots*, foram feitas também marcações das folhas de PVDF com o anticorpo contra α -tubulina, por esta ser uma proteína constitutiva. O valor da área da banda marcada com a proteína de interesse foi dividido pelo valor da banda da α -tubulina de culturas controle e tratadas com MCD. Desta forma foram feitas

quantificações (razão entre a proteína de interesse e a α -tubulina), que foram visualizadas em gráficos feitos no programa Microsoft Excel 6.0 (Microsoft Corporation, Brasil).

3.17. Extração de RNA total

A extração de RNA total e os RT-PCRs foram realizados em colaboração com o Professor Radovan Borojevic e seu aluno de doutorado Leandro Thiago do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ.

A extração de RNA total foi processada segundo o método do Trizol (Gibco BRL), de acordo com instruções do fabricante. As células foram tripsinizadas e ressuspendidas em Trizol (1 mL de Trizol para cada 100 mg de tecido) por 24 horas a -70°C . Adicionaram-se 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de Trizol homogeneizando-se e a solução permaneceu por 15 segundos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para tubos eppendorf novos. Adicionou-se álcool isopropílico para precipitação do RNA, por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C . O pellet foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 8.000 rpm por 5 minutos a 4°C . O pellet foi ressuspendido em água DEPC. Após a extração, verificou-se a qualidade do RNA pela leitura da quantidade de RNA total e de proteína em espectrofotômetro (CG Analítica) a 260 e 280 nm.

3.18. Transcrição reversa do RNAm e amplificação dos cDNA

Foram utilizadas 2 μg de RNA para síntese de cDNA. O RNA foi misturado ao Oligo DT 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubado a 68°C por 4 minutos. Em seguida, adicionou-se um mix contendo tampão 5X M-MLV RT, DTT 0,1 M, dNTPs 25 mM e M-MLV RT (200 unidades/mL). A amostra foi incubada a 38°C por 2 horas e logo depois, à 90°C por 10 minutos, obtendo-se assim o cDNA. Para amplificação do cDNA em reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), foi utilizado o termociclador Biometra (Alemanha) e as reações empregaram 20 μL da reação de transcrição reversa (1 pmol de *primer* senso e anti-senso (Gene link, EUA), tampão 10X,

MgCl₂ a 2 mM, dNTPs a 0,25 mM) e 1U de Taq polimerase (GIBCO, BRL). Os *primers* utilizados estão listados na **Tabela 3**. As reações foram colocadas no Termociclador com a seguinte programação: 20, 30 ou 45 ciclos de 96 °C por 1 minuto, 96 °C por 30 segundos, 57,5 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto, seguidos de 72 °C por 5 minutos. A eletroforese dos produtos amplificados foi processada em gel de agarose 1,6% a 100 V e visualizada por brometo de etídeo.

Como controle de carregamento de cDNA, foram amplificados fragmentos de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que serviram para quantificação da expressão dos genes de interesse.

Tabela 3 - Primers

Primers	Senso	Anti-senso	Tm
GAPDH	GACGTGCAGCAGGAACACTA	CTTGGACTTTGCCAGAGAGG	57,5 °C
Wnt 1	GGGGCTGCAGTGATAACATC	GGCCTCGTTGCGTTGTTGTGTAGGT	57,5 °C
Wnt 3A	CTCCGACTGAGAAGGACCTG	TCTCAGTCCTCGTAGTTGTGC	55,5 °C
Wnt 5A	GATAGTGCTGCTGCCATGAA	ATTGCGCATGCAGTAGTCAG	57,5 °C
TCF/LEF	CCAGCTATTGTAACACCTCA	TTCAGATGTAGGCAGCTGTC	57,5 °C

4. Resultados

A miogênese é um processo complexo que se inicia com o comprometimento de células precursoras mononucleadas que saem do ciclo celular e entram no programa de diferenciação muscular. Esses mioblastos se alongam, enquanto se alinham uns com os outros, guiados pelo reconhecimento de suas membranas. Essa etapa é seguida pela fusão celular, a qual acarreta a formação de miotubos longos, multinucleados e estriados. Nosso grupo de pesquisa mostrou recentemente que a depleção de colesterol membranar pela metil-beta-ciclodextrina (MCD) induz a diferenciação muscular, por proporcionar o aumento do reconhecimento e fusão dos mioblastos (Mermelstein & Portilho et al., 2005). Além disso, mostramos que ocorre a translocação nuclear da proteína beta-catenina após o tratamento das células musculares com MCD.

Para investigar se a β -catenina está envolvida em mecanismos moleculares e celulares associados a depleção de colesterol durante a diferenciação miogênica, culturas de músculo esquelético de embrião de galinha com 24 horas foram tratadas com MCD (2 mM) durante 30 minutos e cresceram em meio fresco por mais 3, 24, 48 ou 72 horas. Primeiramente, foi feita uma imunofluorescência para se estudar a localização celular da β -catenina nas culturas controle e tratadas com MCD (**Anexo 4, Figura 1**).

De acordo com o descrito na literatura, a β -catenina foi encontrada em sítios de adesão célula-célula, como linhas ao longo das membranas de mioblastos pré-fusão adjacentes (Goichberg et al., 2001) nas primeiras 48 horas em culturas controle, e tratadas com MCD (células crescidas por 24 horas, tratadas com MCD e crescidas por mais 24 horas).

Foi detectada também a presença de β -catenina dentro de núcleos de células depletadas de colesterol com 27 horas (células crescidas por 24 horas, tratadas com MCD e crescidas por mais 3 horas), assim como em células com 48 horas (células crescidas por 24 horas, tratadas com MCD e crescidas por mais 24 horas). Pré-mioblastos controle (crescidos por 27 horas) também apresentaram marcação para β -catenina dentro de seus núcleos, reafirmando o trabalho de

Goichberg e colaboradores (2001). Além disso, foi encontrado um aumento de 45% no número de pré-mioblastos positivos para β -catenina nuclear após 3 horas de tratamento com MCD.

Após 72 horas de cultura, quando a maioria dos mioblastos já fundiu, a β -catenina foi encontrada dispersa ao longo da membrana de miotubos multinucleados controle e que sofreram a depleção de colesterol. Entretanto, não foi detectada β -catenina nuclear nestas células.

Foi analisada também, a expressão de β -catenina nas culturas controle e tratadas com MCD por *immunoblotting* semi-quantitativo (**Anexo 4, Figura 2**). Mioblastos tratados com MCD com 48 horas de vida expressaram fortes níveis de β -catenina quando comparados com as células sem tratamento. Analisando a densidade óptica da banda de β -catenina detectada no *Western blot*, foi estimado uma expressão de β -catenina 2 vezes maior nos mioblastos depletados de colesterol, quando comparados com os controle.

Esses resultados sugerem que o tratamento com MCD induz a expressão de β -catenina e sua translocação para o núcleo durante a diferenciação muscular esquelética.

Para tentar quantificar a expressão de β -catenina presente dentro do núcleo de mioblastos e associada às membranas (nas junções célula-célula) em ambas as culturas controle e tratadas com MCD, foi feito um *Western blot* contra β -catenina utilizando frações solúveis e insolúveis em Triton X-100 (Goichberg et al., 2001) (**Anexo 4, Figura 3**).

A presença de β -catenina em frações insolúveis em Triton X-100, sugerem que esta proteína está associada ao citoesqueleto em complexos de adesão célula-célula, enquanto a presença em frações solúveis em Triton X-100, sugere que ela está enriquecida no núcleo. A β -catenina citosólica é rapidamente degradada.

Depois do tratamento com MCD, houve um aumento da expressão de β -catenina tanto na membrana, como também dentro dos núcleos destas células. As

culturas controle mostraram baixos níveis de β -catenina nos 2 compartimentos intracelulares.

De acordo com os resultados anteriores, onde foi demonstrada a presença de β -catenina dentro dos núcleos de mioblastos tratados com MCD e, uma vez que a β -catenina está envolvida na via de sinalização Wnt, decidiu-se investigar se havia ativação desta via por sua ligação a TCF/LEF no núcleo. Para isto, culturas controle e tratadas com MCD foram transfectadas com o plasmídeo Top-Flash, o qual se liga ao complexo TCF/LEF e emite uma luminescência (atividade luciferásica). O valor da luminescência emitida reflete a ativação da via de Wnt. Outras culturas foram transfectadas com o plasmídeo Fop-Flash, gene repórter semelhante ao Top-Flash, porém possui uma mutação no sítio de ligação a TCF/LEF e, portanto, não emite nenhuma luminescência (**Anexo 4, Figura 4**). Mioblastos controle transfectados com Top-Flash mostraram baixos níveis de atividade luciferásica (Top Ct), assim como as culturas transfectadas com Fop-Flash (controle negativo) (Fop). Entretanto, a atividade luciferásica foi muito alta em mioblastos depletados de colesterol e transfectados com Top-Flash (Top MCD), diferentemente do encontrado em mioblastos também depletados de colesterol, mas transfectados com Fop-Flash (dado não mostrado).

Este resultado indica que o tratamento de mioblastos com MCD induz a translocação da β -catenina para o núcleo pela ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina.

Para que a via de Wnt/ β -catenina seja ativada é necessário que haja moléculas de Wnt disponíveis no meio de cultura para as células. Portanto, decidiu-se investigar se a depleção de colesterol por MCD é seguida de secreção de Wnt, ou liberação deste da membrana plasmática para o meio de cultura, já que Wnt é descrito estando ancorado em regiões ricas neste lipídeo. Utilizando o mesmo protocolo do resultado anterior, células musculares controle foram transfectadas com Top-Flash e depois tratadas com meio condicionado coletado de uma outra cultura previamente tratada com MCD (cultura esta, crescida em meio sem droga por 3 horas após a depleção de colesterol) (**Anexo 4, Figura 4**).

Os resultados apresentados mostraram um aumento da atividade luciferásica das culturas transfectadas com Top-Flash tratadas com meio condicionado proveniente de mioblastos depletados de colesterol (Top MCD+cm), quando comparados a baixa atividade encontrada em culturas controle transfectadas com Top-Flash crescidas em meio normal (Top Ct).

Surpreendentemente, também foi encontrado um significativo aumento da atividade luciferásica nas culturas transfectadas com Top-Flash tratadas com meio condicionado proveniente de mioblastos controle (Top Ct+cm).

Estes dados sugerem que o tratamento de mioblastos com MCD possivelmente está induzindo a secreção ou a liberação da membrana de proteínas Wnt para o meio de cultura. É possível relacionar este fenômeno com a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina, a qual induz a translocação da β -catenina para o núcleo, vista nos resultados anteriores.

Para se confirmar mais uma vez que moléculas de Wnt estão presentes no meio de cultura de células tratadas com MCD, foi utilizado o receptor solúvel de Frizzled; Frzb-1 (**Anexo 4, Figura 4 e 5 e Anexo 5, Figura 7**). Frzb-1 é uma proteína secretada, que contém um domínio semelhante ao receptor de Wnt; Frizzled. Devido a isso, consegue se ligar a Wnt, inibindo sua via de sinalização (Leyns et al., 1997).

Células controle e depletadas de colesterol por 24 horas foram transfectadas com Top-Flash (como descrito acima) e depois tratadas com meio enriquecido em Frzb-1 por mais 24 horas. As culturas, transfectadas com Top-Flash e tratadas com meio enriquecido em Frzb-1 mostraram baixos níveis de atividade luciferásica, indicando o efeito inibitório de Frzb-1 na ativação da via de Wnt, após a depleção de colesterol.

Também foi observado, os efeitos de Frzb-1 nas culturas controle e tratadas com MCD por microscopia óptica de contraste de fase (**Anexo 4, Figura 5**) e por imunofluorescência para desmina (**Anexo 5, Figura 7**). Células depletadas de colesterol, que cresceram na presença de Frzb-1, demonstraram uma inibição da diferenciação com miotubos muito finos, confirmando o efeito inibitório de Frzb-1, apesar de conseguir expressar a desmina.

Para explorar a possibilidade da ativação da via de Wnt/ β -catenina pela depleção de colesterol ser capaz de induzir a diferenciação muscular, foi analisada a expressão dos marcadores musculares α -actina sarcomérica (**Anexo 4, Figura 6**), caderina M (**Anexo 5, Figura 9**), MyHC (**Resultados Adicionais**) e desmina (**Anexo 6, Figura 5**) em culturas controle e tratadas com MCD por *immunoblotting* semi-quantitativo.

Culturas tratadas com MCD com 48 horas expressaram altos níveis de α -actina sarcomérica, caderina M, MyHC e desmina, quando comparados com as controle. Esses resultados corroboram com nosso trabalho anterior (Mermelstein & Portilho et al., 2005), onde se observou através de *Western Blot* um aumento significativo na expressão de outra proteína marcadora de diferenciação muscular; a TroponinaT. Estes dados sugerem que a depleção de colesterol da membrana de mioblastos induz a diferenciação muscular esquelética.

Para investigar se os efeitos celulares induzidos pela MCD são causados por fatores solúveis presentes no meio de cultura, decidiu-se investigar os meios condicionados coletados de culturas musculares controle e tratadas com MCD (**Anexo 5, Figura 1**).

As células musculares com 24 horas foram tratadas com meio condicionado coletado de culturas controle e de culturas tratadas com MCD (cultura esta, crescida em meio sem droga por 3 horas após a depleção de colesterol). As células que receberam o meio condicionado proveniente de culturas tratadas com MCD mostraram um aumento na diferenciação muscular, observado pela espessura dos miotubos, semelhantes aos miotubos de culturas tratadas com MCD.

Além disso, células musculares com 24 horas tratadas com meio condicionado proveniente de culturas controle mostraram miotubos mais finos, similares aos de culturas controle com a mesma idade.

Ainda realizou-se imunofluorescências de culturas controle, tratadas com MCD, tratadas com meio condicionado controle e MCD contra proteína α -actinina, para uma análise das estriações (**Anexo 5, Figura 4**). Os miotubos tratados com MCD e incubados com meio condicionado MCD apresentaram muitas

semelhanças, como por exemplo, a grande quantidade de miofibrilas e a desorganização dos núcleos.

A adição de meio condicionado de culturas tratadas com MCD levou a um aumento na espessura dos miofibrilos, assim como ocorre nas culturas tratadas com MCD, sugerindo que os efeitos produzidos pela MCD devem ser causados por fatores solúveis presentes no meio de cultura.

Para determinar a massa molecular dos fatores solúveis responsáveis por promover a diferenciação muscular nas culturas tratadas com MCD, foi analisado os efeitos dos tratamentos de culturas musculares controle com 24 horas, com os meios condicionados de culturas controle e tratadas com MCD depois de filtrados por Centricons Y-30 e Y-50 (**Anexo 5, Figura 2**).

Centricons (Millipore, EUA) são utilizados para filtrar substâncias com peso molecular menor do que seu limite nominal. Quando utilizou-se os Centricons Y-30 para filtrar os meios condicionados, foi produzido um meio condicionado somente com fatores com menos de 30 kDa e quando utilizou-se os Centricons Y-50, foi produzido um meio condicionado somente com fatores com menos de 50 kDa.

Os meios condicionados produzidos por centricons Y-50 induziram diferenciação muscular, diferentemente dos meios condicionados produzidos por Centricons Y-30, os quais inibiram a diferenciação muscular.

Estes dados sugerem que os fatores solúveis presentes no meio condicionado MCD apresentam pesos moleculares entre 30-50 kDa.

As proteínas da família Wnt têm sido amplamente relacionadas com a diferenciação muscular (Cossu e Borello, 1999, Tajbakhsh et al., 1998). Estas proteínas são relativamente pequenas, apresentando peso molecular entre 38-43 kDa. Estes valores estão dentro da margem de peso molecular encontrada no experimento anterior (30-50 kDa), sugerindo que possivelmente Wnts são esses fatores solúveis encontrados no meio condicionado MCD.

Devido a isso, resolveu-se investigar os efeitos da depleção de colesterol pela MCD, na presença de duas moléculas da família de proteínas Wnt descritas na miogênese: Wnt 3a e Wnt 5a.

Para testar esta hipótese, culturas controle e recém tratadas com MCD com 24 horas cresceram com meio enriquecido em Wnt 3a e Wnt 5a (**Anexo 5, Figura 3**). As culturas tratadas com meio enriquecido em Wnt 3a apresentaram miotubos muito grossos, semelhantes aos tratados com MCD. Entretanto, culturas que receberam o meio enriquecido em Wnt 5a apresentaram miotubos muito finos e este fenótipo não foi capaz de ser revertido com a adição de MCD (**Anexo 5 e Resultados Adicionais**).

Ainda realizou-se imunofluorescências de culturas controle, tratadas com MCD, tratadas com meio condicionado enriquecido em Wnt 3a e Wnt 5a contra a proteína α -actinina, para uma análise das estriações e a proteína desmina (**Anexo 5, Figura 5 e Resultados Adicionais**, respectivamente). De acordo com o resultado anterior de contraste de fase, os miotubos tratados com MCD e incubados com o meio enriquecido em Wnt 3a apresentaram muitas semelhanças, como por exemplo, a grande espessura dos miotubos e a desorganização dos núcleos.

Já as culturas tratadas com meio condicionado enriquecido em Wnt 5a com 72 horas, não apresentaram nenhuma estriação com a marcação com anticorpo anti- α -actinina (dados não mostrados), e apresentaram miotubos muito finos e com poucos núcleos. Entretanto, estes miotubos expressam desmina.

Estes resultados sugerem que Wnt 3a pode ser a responsável, pelo menos em parte, desta indução miogênica observada após a depleção de colesterol pela MCD.

Para testar se Wnt 3a está envolvido com os efeitos celulares observados após a depleção de colesterol, foi analisado a presença da proteína Wnt 3a no meio condicionado MCD e no meio condicionado-controle (**Anexo 5, Figura 8**). Os meios condicionados foram imunoprecipitados com o anticorpo policlonal anti-Wnt 3a. Foi observado um aumento de três vezes nos níveis de Wnt 3a no meio condicionado MCD, quando comparado com o meio controle. Uma possível explicação é de que a molécula Wnt 3a pode ter sido liberada para o meio condicionado após a depleção de colesterol e não fique associada à membrana plasmática.

Também foi analisada a expressão da proteína Wnt 3a nos extratos celulares, sem o meio de cultura, obtido de culturas miogênicas controle e tratadas com MCD (**Anexo 5, Figura 8**). As culturas tratadas com MCD expressam níveis similares de Wnt 3a que as culturas-controle, mostrando que o aumento de Wnt 3a solúvel no meio condicionado MCD (e não do Wnt 3a associado a membrana) é o responsável por induzir a proliferação e a diferenciação das células musculares.

A replicação de mioblastos é a primeira etapa da diferenciação muscular esquelética. A saída irreversível do ciclo celular é requerida para a progressão do alinhamento e a fusão dos mioblastos, culminando com a formação de miotubos multinucleados e estriados. Foi mostrado nos trabalhos anteriores que a depleção de colesterol pela MCD induz a proliferação e a diferenciação de células musculares (Mermelstein & Portilho et al., 2005), pela ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina (Mermelstein & Portilho et al., 2007), e que a molécula Wnt3a está envolvida neste processo (Portilho et al., 2007).

Devido a isso, foi analisado os efeitos da depleção de colesterol pela MCD nos eventos iniciais da miogênese, em especial na proliferação de mioblastos. Para isso, foi feito imunofluorescências para Ki67, marcador celular de proliferação presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), em células-controle e tratadas com MCD com 27 e 48 horas de vida (**Anexo 6, Figura 1**). De acordo com a quantificação do número de células positivas para Ki67, estimou-se um aumento de 60% e 40% de células Ki67 positivas após 3 e 24 horas do tratamento com MCD, respectivamente, em comparação com as culturas-controle. Isso permite concluir que a retirada de colesterol induz a proliferação em cultura de células de galinha.

Em seguida, analisou-se quando ocorrem os efeitos induzidos pela MCD na replicação: se logo após a depleção de colesterol ou 24 horas após o tratamento. Foi testado então, os efeitos do anti-mitótico AraC em culturas controle e tratadas com MCD (**Anexo 6, Figuras 2 e 3**). O tratamento de culturas com 24 horas com o AraC resultou em miotubos com um baixo índice de fusão (número de núcleos por miotubo), comparados com culturas que não receberam o AraC. Entretanto, nenhum efeito significativo foi observado no índice de fusão de celular em culturas

tratadas com MCD após 48 horas. Isso permite concluir que o experimento com AraC pode inibir os efeitos induzidos pela depleção de colesterol na proliferação somente logo após ao tratamento com MCD.

Em seguida, decidiu-se analisar se os efeitos na proliferação celular eram referentes a células mononucleadas musculares ou a fibroblastos. Culturas miogênicas com 27 e 48 horas foram imunomarcadas com anticorpo anti-desmina e com a sonda nuclear DAPI (**Anexo 6, Figura 4**). A desmina é uma das primeiras proteínas estruturais expressas em mioblastos. Através da quantificação do número de células mononucleadas positivas e negativas para desmina por campo estimou-se um aumento de 40% no número de células mononucleadas positivas para desmina após 3 e 24 horas do tratamento com MCD, quando comparadas com as culturas-controle. Contudo, não se observou diferenças em relação ao número de células mononucleadas negativas para desmina por campo após 3 ou 24 horas do tratamento com MCD, comparadas com culturas não tratadas. De acordo com esse resultado, pode-se concluir que a depleção de colesterol pela MCD aumenta o número de células mononucleadas positivas para desmina, ou seja, mioblastos, mas não interferem no número de células desmina negativas, os fibroblastos.

Para se investigar, mais uma vez, o tipo celular onde a proliferação foi induzida após o tratamento com MCD foi analisada a incorporação com BrdU em culturas miogênicas (**Anexo 6, Figura 6**). A sonda BrdU é um análogo da timidina, que se incorpora estavelmente no DNA durante a fase S da mitose, e permite quantificar as células em divisão. Células tratadas com MCD (logo após o tratamento) e controle com 24:30 horas foram marcadas com BrdU (3 µg/ml) por 1 hora, e duplamente marcadas com os anticorpos anti-BrdU e anti-desmina. Através da quantificação do percentual de células positivas para desmina e positivas para BrdU foi estimado um aumento de duas vezes no número de células após o tratamento com MCD. Núcleos positivos para BrdU foram encontrados dentro de mioblastos mononucleados positivos para desmina e células fibroblásticas negativas para desmina. Esses resultados mostram um aumento na proliferação de células positivas para desmina após a retirada de colesterol.

No seu conjunto, estes experimentos mostram que a depleção de colesterol membranar de células musculares promove a proliferação de mioblastos, levando a um aumento no número de células positivas para desmina.

Resultados Adicionais

Para investigar se a depleção de colesterol pela MCD é capaz de ativar células musculares quiescentes, foi examinada a expressão e distribuição das proteínas Pax3 e Pax7 em células controle e tratadas com MCD (**Figuras 16 e 17**). Pax3 e Pax7 estão relacionadas com etapas iniciais de proliferação, especificação e migração de células precursoras musculares (Epstein et al., 1995). Nossos resultados mostram que mioblastos tratados com MCD expressam altos níveis de Pax3, quando comparados com os mioblastos controle. Analisando a densidade óptica das bandas do *Western Blot*, pode-se estimar um aumento de aproximadamente 3,5 vezes nos níveis de expressão de Pax3 nas culturas tratadas com MCD (**Figura 16**).

Em relação à distribuição celular destes fatores de transcrição, pode-se observar a localização nuclear de Pax7 nas culturas de mioblastos controle e tratadas com MCD. No entanto, é interessante notar o grande número de mioblastos positivos para Pax7 nas culturas analisadas após 3 horas de tratamento com MCD, quando comparadas com as controle (**Figura 17**). Estes resultados sugerem que a depleção de colesterol ativa as células musculares quiescentes a proliferarem e diferenciarem.

Para explorar a possibilidade da ativação da via de Wnt/ β -catenina pela depleção de colesterol ser capaz de induzir a diferenciação muscular terminal, foi analisada a expressão da proteína sarcomérica miosina (cadeia pesada de miosina, MyHC) em culturas controle e tratadas com MCD por *immunoblotting* (**Figura 18**). Os resultados mostram um aumento nos níveis de expressão de MyHC nos extratos celulares de culturas tratadas com MCD. A análise da densidade óptica das bandas revelou um aumento de aproximadamente 75% na expressão de MyHC nas culturas depletadas de colesterol (**Figura 18**). Esse

resultado corrobora com os nossos outros trabalhos anteriores (Mermelstein et al., 2005, 2007), onde se observou um aumento significativo na expressão de outras proteínas marcadoras de diferenciação muscular; como a Troponina T e a α -actina sarcomérica. Estes dados sugerem que a depleção de colesterol da membrana de mioblastos induz a diferenciação muscular esquelética.

Para investigar a expressão gênica dos componentes da via de sinalização Wnt/ β -catenina, foi realizada a técnica de RT-PCR semi-quantitativo nas culturas controle e tratadas com MCD. Os resultados demonstram que as culturas de mioblastos com 27 horas (tanto as controle como as tratadas com MCD) expressam os genes Lef-1, Wnt1, Wnt3a, Wnt5 e GAPDH. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão dos diversos tipos de wnts nas culturas controle e tratadas com MCD (**Figura 20**). Estes dados são inéditos na literatura, visto que não há ainda nenhuma descrição da expressão destes genes em células musculares esqueléticas de embriões de galinha.

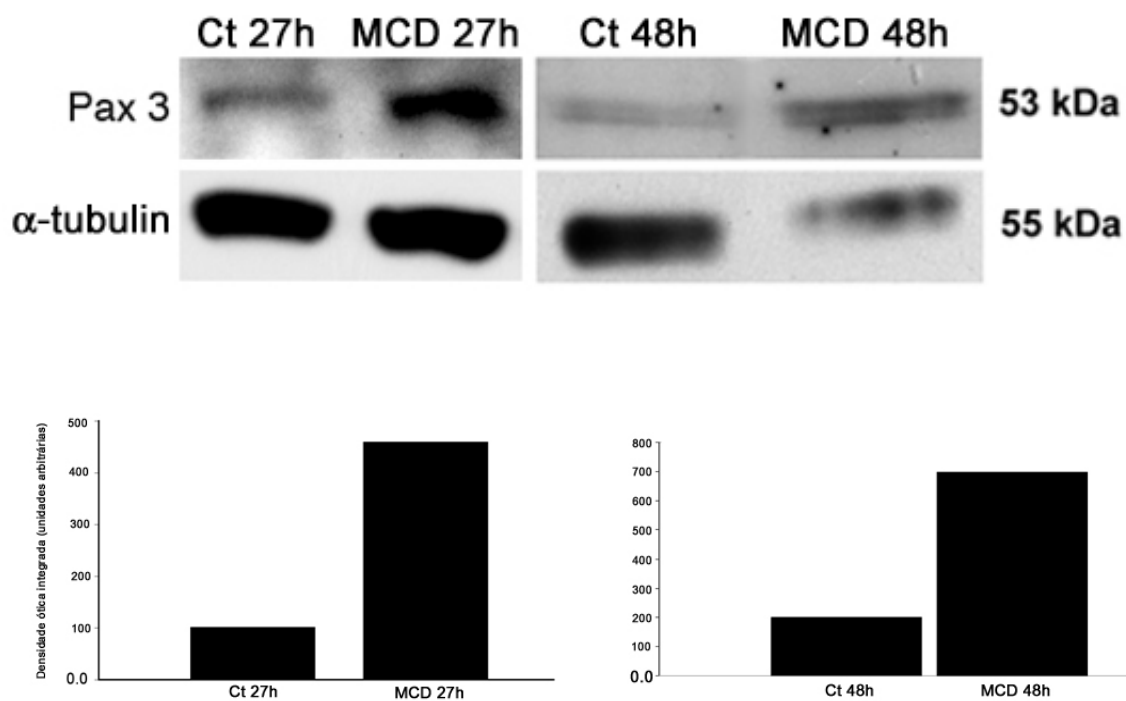


Figura 16 - O tratamento com MCD induz um aumento na expressão da proteína Pax3 em mioblastos. *Immunoblotting* de extratos de culturas de células musculares controle (Ct) e tratadas com MCD (MCD) com 27 e 48 horas para Pax3 (53 kDa) e a quantificação desta expressão. Note o aumento de 3,5 vezes nos níveis de Pax3 apresentados pelas culturas tratadas em comparação com as controle.

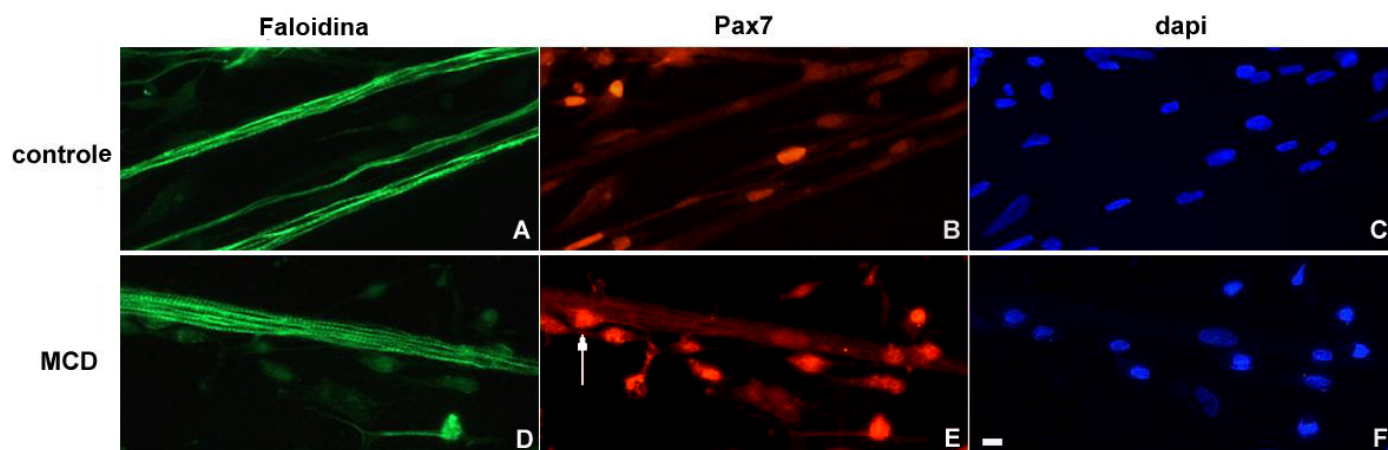


Figura 17 - O tratamento com MCD induz um aumento na expressão da proteína Pax7 em mioblastos. Imunofluorescências para Pax7 e para Actina filamentosa foram realizadas com cultura-controle e tratadas com a MCD, utilizando o anticorpo monoclonal anti-Pax7 e com a sonda Faloidina. Note o maior número de núcleos marcados em vermelho com anticorpo anti-Pax7 (seta), nas culturas tratadas com MCD, quando comparadas com as controle. Barra de escala corresponde a 10 μm .

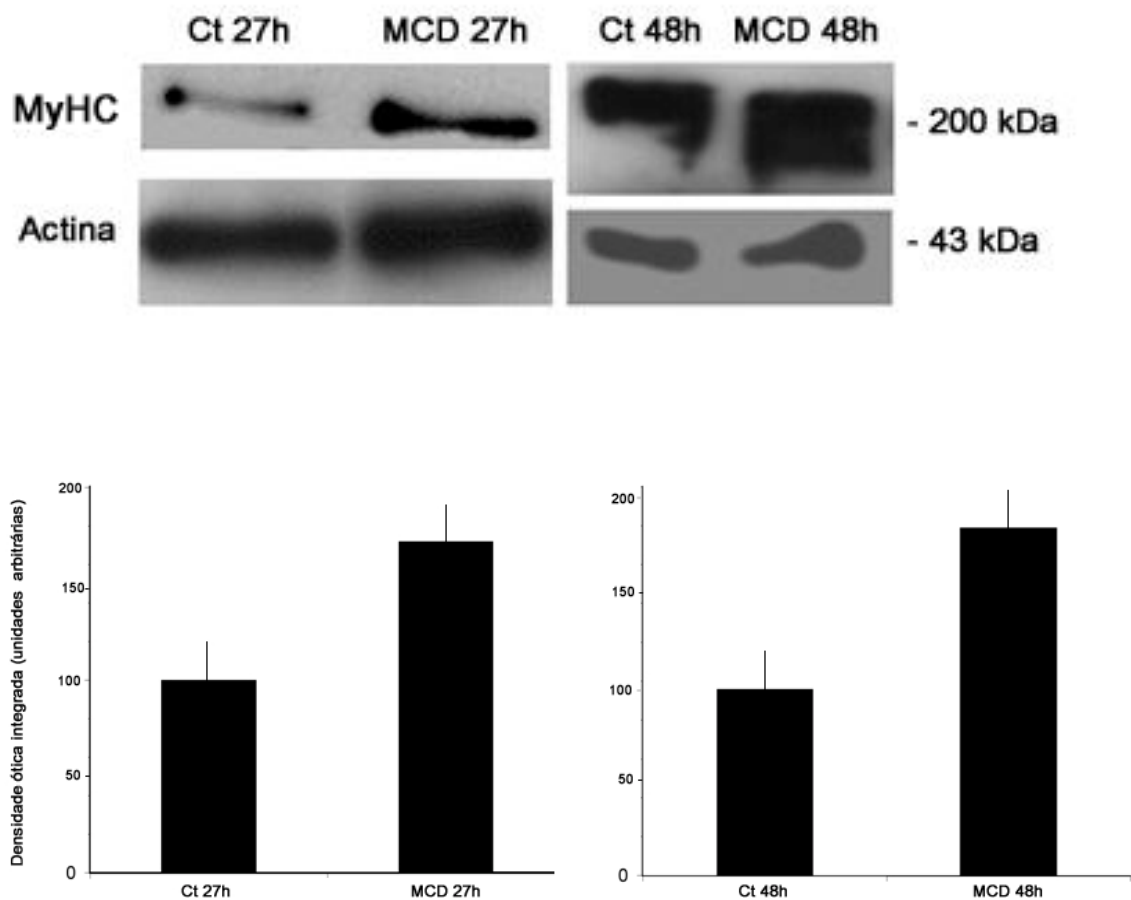


Figura 18 - O tratamento com MCD induz um aumento na expressão da proteína MyHC em culturas de músculo esquelético. *Immunoblotting* de extratos de culturas de células musculares controle (Ct) e tratadas com MCD (MCD) com 27 e 48 horas para MyHC (200 kDa) e a quantificação desta expressão. Note o aumento de aproximadamente 75% nos níveis de MyHC apresentados pelas culturas tratadas em comparação com as controle. Três experimentos independentes foram usados para esta quantificação.

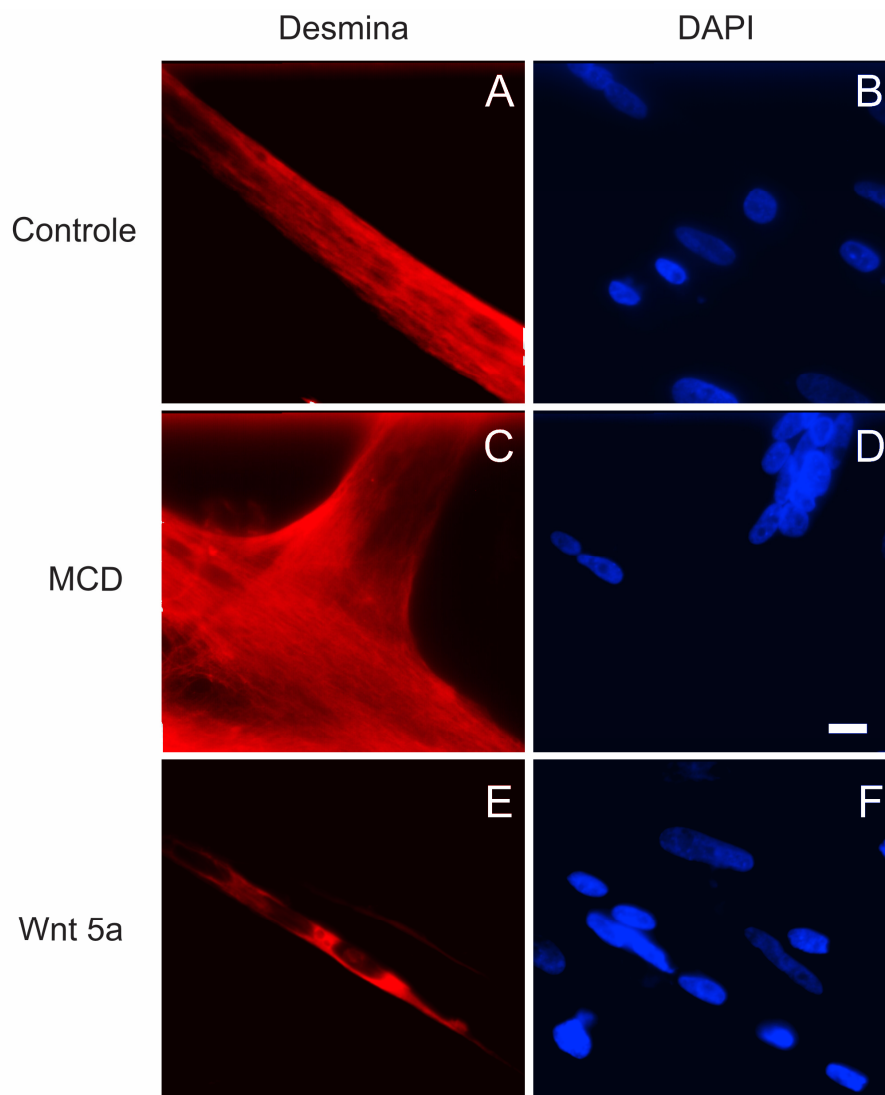


Figura 19 – Wnt 5a inibe diferenciação muscular esquelética. A - Cultura controle com 72 horas marcada com anticorpo anti-desmina; B - Núcleos correspondentes a figura A marcados com a sonda DAPI; C- Cultura tratada com MCD com 72 horas, marcada com anti-desmina; D- Núcleos correspondentes a figura C marcados com DAPI; E- Cultura que recebeu meio condicionado enriquecido em Wnt 5a, com 72 horas, marcada com anti-desmina; F- Núcleos correspondentes a figura E marcados com DAPI. Note como as culturas que receberam o meio condicionado enriquecido em Wnt 5a apresentaram miotubos muito finos, e com muitos fibroblastos (células com núcleos grandes e negativas para desmina). A barra de escala corresponde a 10 μ m.

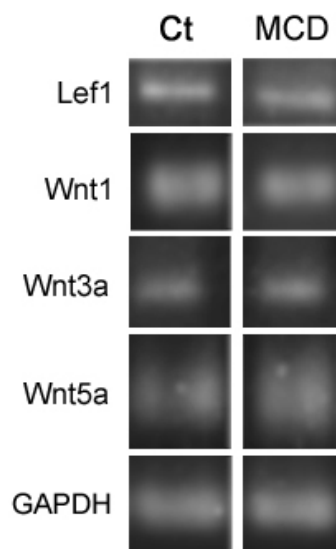


Figura 20 - Culturas musculares expressam os genes Lef 1, Wnt1, Wnt3a e Wnt5a. RT-PCR de culturas-controle e tratadas com MCD. GAPDH foi utilizada como controle de expressão nestes experimentos.

5. Discussão

Recentemente, nosso grupo mostrou que a depleção de colesterol pela substância metil-beta-ciclodextrina (MCD) induz a proliferação celular, o aumento da fusão de mioblastos e a diferenciação terminal de células musculares esqueléticas (Mermelstein e Portilho et al., 2005).

Muitos trabalhos estudaram a importância do colesterol durante a miogênese, mas existem muitas idéias contraditórias. Van der Bosch e colaboradores (1973) mostraram que colesterol adicionado a culturas de mioblastos impedia a fusão celular. Sekiya e colaboradores (1984) demonstraram através do uso da substância filipina (que tem alta afinidade por colesterol) que a fusão de mioblastos se dá pela justaposição de áreas livres de colesterol de cada membrana de células adjacentes. Nakanishi e colaboradores (2001) mostraram que é necessária uma diminuição de colesterol membranar em mioblastos competentes para fusão, aumentando assim a fluidez da membrana e induzindo a fusão celular. Entretanto, Cornell e colaboradores (1980), obtiveram resultados diferentes, demonstrando que a utilização de inibidores da síntese de colesterol, 25-OH-colesterol ou compactina, inibem a fusão de mioblastos e que a adição de colesterol é capaz de restaurar o reconhecimento e a fusão de mioblastos. As estatinas, também conhecidas como inibidoras da síntese de colesterol, impedem a diferenciação muscular, causando rabdomiólise, atrofia muscular e apoptose em mioblastos e miotubos (Johnson et al., 2004; Sacher et al., 2005).

Uma possível explicação para o resultado que mostra a facilitação da fusão de mioblastos com a depleção de colesterol membranar é que, com a desorganização dos micro-domínios, a membrana plasmática se torna mais fluida e moléculas de adesão, como as caderinas, podem formar complexos competentes para a fusão.

Entretanto, os trabalhos de Causeret e colaboradores em 2005 e Taulet e colaboradores em 2009 mostraram que a desorganização de microdomínios de membrana pela MCD e pela anfotericina B (quelante de colesterol), respectivamente, inibem a miogênese de células musculares C2C12. Além de ser

uma linhagem celular de outra espécie (camundongo), este trabalho utilizou uma concentração de 4 mM de MCD durante 6 horas, o qual pode remover moléculas específicas de adesão de forma permanente, como a N-caderina e a catenina p120, interferindo na adesão mioblasto-mioblasto e na fusão. Já no presente trabalho de tese, o tratamento com MCD foi durante apenas 30 minutos na concentração de 2 mM e na etapa de pré-fusão de mioblastos de galinha, o suficiente para remover o colesterol temporariamente e aumentar a fluidez da membrana, facilitando o processo de fusão.

Existe também a possibilidade da internalização de microdomínios enriquecidos em colesterol ser necessária para ocorrer a fusão de mioblastos. Utilizando microscopia eletrônica de criofratura, Kalderon e Gilula em 1979 observaram regiões livres de colesterol nos sítios pré-fusão nas membranas de mioblastos e vesículas próximas à superfície intracelular da membrana plasmática, podendo ser consequência da internalização de microdomínios. Não podemos descartar a hipótese de que esteja ocorrendo uma internalização de microdomínios de membrana após a retirada de colesterol membranar.

De qualquer forma, qualquer que seja o processo envolvido na depleção de colesterol membranar, nossos dados indicam a participação de vias de sinalização. Durante o período embrionário, cascatas de sinalização atuam no comprometimento de células indiferenciadas com a linhagem muscular e promovem o surgimento de células precursoras miogênicas que são capazes de proliferar até entrarem no programa de diferenciação. Após a parada do ciclo celular, esses mioblastos começam a se alinhar, guiados pelo reconhecimento de suas membranas e aderem uns aos outros. Essa etapa é seguida pela fusão destes mioblastos, formando células multinucleadas chamadas de miotubos. As vias de sinalização descritas que mais interferem na miogênese são as vias de Sonic Hedgehog (Borychi et al., 1999) e Wnt/ β -catenina (Cossu et al., 1996).

Como a via de Wnt/ β -catenina desempenha um papel crucial durante o início da miogênese (Linker et al., 2003) e no comprometimento de células precursoras com a linhagem muscular e na diferenciação destas (Cossu & Borello, 1999; Ridgeway et al., 2000; Petropoulos & Skerjanc, 2002), esse trabalho foi

direcionado para o estudo desta via de sinalização Wnt/ β -catenina durante a miogênese, e seu envolvimento com o colesterol membranar.

Os resultados apresentados mostram que a retirada do colesterol das culturas de mioblastos de galinha pela MCD provocou um aumento da expressão de β -catenina, sua translocação para o núcleo e ativação da via de Wnt/ β -catenina. Além disso, o tratamento com MCD levou a um aumento na expressão das proteínas miofibrilares α -actina sarcomérica, desmina, cadeia pesada de miosina e troponina T. Esses resultados sugerem que uma diminuição do colesterol subsarcolemal pode ser um mecanismo regulatório para o início da diferenciação muscular esquelética.

A proteína β -catenina pode participar de adesões celulares mediadas pelas caderinas nas membranas plasmáticas e servir como fator regulatório de transcrição, quando associada ao fator Lef/TCF no núcleo (Nelson and Nusse, 2004). Petropoulos & Skerjanc (2002) sugerem funções diferentes para a β -catenina, de acordo com as etapas da miogênese. Primeiramente, a β -catenina seria expressa no núcleo em resposta à ativação da via de Wnt, com a finalidade de ativar a transcrição de genes envolvidos com o comprometimento com a linhagem muscular das células precursoras. Em uma etapa posterior, já em mioblastos bipolares, ela seria expressa nas junções aderentes para promover a adesão e posterior fusão celular (Goichberg et al., 2001). Neste trabalho, a presença da β -catenina no núcleo e nas junções aderentes após a depleção de colesterol sugere que esta proteína está atuando nos dois compartimentos celulares, de células precursoras (no núcleo) e de mioblastos (na membrana), com a finalidade de promover a miogênese.

Uma questão importante que surge neste trabalho é como a depleção de colesterol pode ativar a via de Wnt/ β -catenina nas culturas musculares. Trabalhos recentes mostram que as proteínas Wnt sofrem modificações lipídicas pós-traducionais através da adição de moléculas de palmitato, como o ácido palmitoiléico e o ácido palmitato (Willert et al., 2003). Foi descrito por Zhai e colaboradores em 2004, que Wnts palmitoilados tem preferência por ancorar em regiões ricas em colesterol, como os microdomínios de membrana. Como a

depleção de colesterol muda a composição e a estrutura da membrana, desorganizando as *rafts* lipídicas, pode-se especular que o tratamento com MCD pode liberar Wnts ancorados nestes microdomínios para o meio de cultura, aumentando sua disponibilidade para se ligar aos receptores Frizzled presentes nas células musculares. Células musculares quiescentes podem ser ativadas para proliferar e se diferenciar após a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina. Corroborando com esta hipótese, neste trabalho de tese foi possível observar-se um grande número de células arredondadas e mononucleadas com a β -catenina nuclear, sugerindo que estas células seriam precursores musculares.

Este trabalho sugere a hipótese de que fatores solúveis, como por exemplo, Wnts podem ser as moléculas responsáveis pela indução de diferenciação após a retirada de colesterol. Devido a este resultado, decidiu-se analisar os componentes solúveis presentes nos meios condicionados controle e tratados com MCD. A diferenciação muscular foi induzida apenas pela adição de meio condicionado proveniente de uma cultura de mioblastos previamente tratada com MCD (meio condicionado MCD), a uma cultura controle com 24 horas, sugerindo que isso ocorre devido à presença de fatores solúveis no meio de cultura. Esses fatores solúveis indutores presentes no meio condicionado MCD apresentaram um peso molecular na faixa de 30-50 kDa, semelhante ao peso molecular das glicoproteínas Wnt que possuem peso molecular na faixa de 38-43 kDa.

A via de sinalização de Wnt/ β -catenina pode ser antagonizada por fatores secretados, dos quais podemos destacar as proteínas secretadas relacionadas com Frizzled (Sfrps), cerberus, dickkopfs (Dkks) e fatores induzíveis de Wnt (WIF-1). A família das Sfrps, como por exemplo, Frzb-1, contém o domínio N-terminal semelhante à Frizzled, que se liga a Wnt, bloqueando a via (Leyns et al., 1997). Dkk1 e Dkk4 se ligam diretamente ao correceptor de Wnt, LRP6, e bloqueiam a sinalização via β -catenina (Mao et al., 2001). WIF-1 também é um antagonista da via e trabalhos sugerem que ele se liga diretamente à Wnt (Hsieh et al., 1999).

Neste trabalho também foi investigado o efeito inibitório de Frzb-1 na indução da diferenciação muscular e na ativação da via de Wnt após o tratamento com a MCD. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da translocação da

β -catenina para o núcleo acontecer de forma independente da ligação de Wnt à Frizzled. Seria relevante determinar que proteínas Wnt e que receptores Frizzled estão envolvidos com a sinalização iniciada após a depleção de colesterol nas células miogênicas.

Para determinar que tipo de Wnt estaria participando dos efeitos causados pela MCD, foi utilizado meio de cultura enriquecido com a proteína Wnt 3a, o qual induziu a diferenciação muscular de maneira similar, tanto ao tratamento com MCD, como pela adição de meio condicionado MCD. Entretanto, quando mioblastos cresceram em meio de cultura enriquecido em Wnt 5a, proteína componente da via não canônica de Wnt, a miogênese foi inibida.

Foi analisada então, a presença da proteína Wnt3 nos meios condicionados-controle e nos meios condicionados após o tratamento com MCD. O meio condicionado MCD apresentou cerca de três vezes mais Wnt3 quando comparado ao meio controle. A possível explicação é que, após a retirada de colesterol, moléculas de Wnt3 que estariam ancoradas a membrana, através das caudas de palmitato, seriam liberadas para o meio extracelular. Também foi feita a análise da expressão de Wnt3 nos extratos celulares, entretanto, não houve diferenças nos níveis de expressão da proteína. Esses resultados sugerem que Wnt 3a solúvel é um dos fatores responsáveis pela indução da miogênese após a retirada de colesterol.

Um ponto interessante deste trabalho é o fato das proteínas Wnt não estarem sendo superexpressadas nos mioblastos. O aumento de proteínas Wnt3 solúveis e ativas no meio de cultura condicionado é um resultado do tratamento de MCD, o qual interfere na disponibilidade de Wnt solúvel no meio de cultura. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de os efeitos causados pela depleção de colesterol envolver outras moléculas sinalizadoras, além de Wnt3, como outros tipos de Wnt e outros componentes associados às membranas plasmáticas.

Galli e colaboradores (2004) mostraram que a expressão ectópica de Wnt 3a no tubo neural de embrião de galinha via eletroporação promoveu um aumento no tamanho do miótomo devido a um aumento na proliferação celular. Em um estudo anterior do nosso grupo, foi observado que a quantidade de DNA (medida pela

fluorescência do marcador nuclear DAPI) foi significativamente maior nas culturas tratadas com MCD do que nas culturas controle (Mermelstein e Portilho et al., 2005). Neste trabalho, decidiu-se investigar os efeitos da depleção de colesterol na proliferação de culturas musculares, pela proteína Ki67 e pela incorporação de BrdU. Ki67 é um marcador celular de proliferação e está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas não na fase G0. Enquanto o BrdU é um análogo da timidina, que se incorpora estavelmente no DNA durante a fase S da mitose, permitindo assim, a quantificação de células em divisão. Utilizando ambos os marcadores foi visto um aumento significativo na proliferação celular após o tratamento com MCD.

De acordo com o trabalho anterior desenvolvido pelo laboratório em 2005 (Mermelstein et al., 2005), este trabalho de tese também investigou a diferenciação muscular utilizando-se marcadores miogênicos como, as proteínas da família Pax, a M-caderina, a α -actina sarcomérica, α -actinina sarcomérica, a MyHC e a desmina. Além disso, também foi calculado o índice de fusão das culturas-controle tratadas com MCD. A M-caderina é uma proteína descrita como marcadora de células-satélite, está envolvida na fusão de mioblastos e continua sendo expressa em miotubos diferenciados (Kramerova et al., 2006). A desmina faz parte da família de proteínas que constituem os filamentos intermediários do citoesqueleto. Esta proteína é específica de células musculares e se localiza na região de linha Z do sarcômero, nos costâmeros, ao redor dos núcleos, na junção miotendinosa e nos discos intercalares cardíacos. (Costa et al., 2004; Mermelstein et al., 2006). As proteínas α -actina sarcomérica, α -actinina sarcomérica e a MyHC compõe o sarcômero das células musculares, formando os filamentos finos e grossos. Já os fatores de transcrição Pax3 e Pax7 são expressos em etapas mais iniciais da miogênese e garantem o comprometimento de células precursoras com a linhagem muscular.

Todas as proteínas estudadas tiveram um aumento significativo nos níveis de expressão após a depleção do colesterol membranar, indicando um aumento na diferenciação celular quando comparadas com as culturas-controle. Esse resultado foi ainda, confirmado pelo cálculo do índice de fusão que revelou cerca

de duas vezes mais núcleos por miotubo nas culturas tratadas com MCD.

Modelos *in vitro*, como culturas primárias musculares de galinha, se apresentam de forma heterogênea (Holtzer et al., 1991), compostas por miotubos multinucleados, mioblastos mononucleados arredondados e bipolares, pré-mioblastos mononucleados replicantes, células satélites arredondadas mononucleadas e quiescentes e fibroblastos. Para analisar se os fibroblastos eram os responsáveis pelos efeitos de MCD, culturas primárias de fibroblastos foram tratadas com MCD 2 mM e após 3 horas do tratamento, seu meio condicionado foi recolhido e transferido para uma cultura miogênica com 24 horas de crescimento. Nenhum efeito na proliferação e na diferenciação muscular foi observado nem por ensaio de BrdU, nem por análise do índice de fusão e nem em *immunoblottings* para proteínas marcadoras de diferenciação. Estes dados sugerem que os efeitos induzidos pela depleção de colesterol não estão relacionados com fibroblastos presentes nas culturas primárias musculares, mas sim, relacionados às células musculares.

Este trabalho de tese investigou a diferenciação muscular utilizando marcadores miogênicos como, as proteínas da família Pax, a M-caderina, a α -actina sarcomérica, α -actinina sarcomérica, a miosina esquelética MyHC e a desmina. Além disso, também foi calculado o índice de fusão das culturas controle e tratadas com MCD. A M-caderina é uma proteína descrita como marcadora de células-satélite, está envolvida na fusão de mioblastos e continua sendo expressa em miotubos diferenciados (Kramerova et al., 2006). A desmina faz parte da família de proteínas que constituem os filamentos intermediários do citoesqueleto. Esta proteína é específica de células musculares e se localiza na região de linha Z do sarcômero, nos costâmeros, ao redor dos núcleos, na junção miotendinosa e nos discos intercalares cardíacos (Costa et al., 2004; Mermelstein et al., 2006). As proteínas α -actina sarcomérica, α -actinina sarcomérica e a MyHC compõe o sarcômero das células musculares, formando os filamentos finos e grossos. Já os fatores de transcrição Pax3 e Pax7 são expressos em etapas mais iniciais da miogênese e garantem o comprometimento de células precursoras com a linhagem muscular.

Todas as proteínas estudadas tiveram um aumento significativo nos níveis de expressão após a depleção do colesterol membranar, indicando um aumento na diferenciação celular quando comparadas com as culturas controle. Esse resultado foi ainda, confirmado pelo cálculo do índice de fusão que revelou cerca de duas vezes mais núcleos por miotubo nas culturas tratadas com MCD.

Baseado nos resultados apresentados, esse trabalho propõe um modelo para os eventos celulares e moleculares que ocorrem em culturas musculares esqueléticas, desencadeados pelo tratamento com a MCD (**Figura 21**). Após a depleção de colesterol, aumenta-se a disponibilidade de Wnt solúvel no meio de cultura, o qual pode se ligar ao seu receptor Frizzled em células quiescentes miogênicas, e entrar no programa de diferenciação muscular, regulando a expressão de diversos genes, como o da β -catenina e de marcadores específicos de músculo, como a alfa-actina sarcomérica e a troponinaT (Mermelstein e Portilho et al., 2005). A diferenciação miogênica que ocorre nas células tratadas com MCD termina com a fusão de mioblastos mononucleados e a formação de miotubos espessos, multinucleados e com núcleos desorganizados.

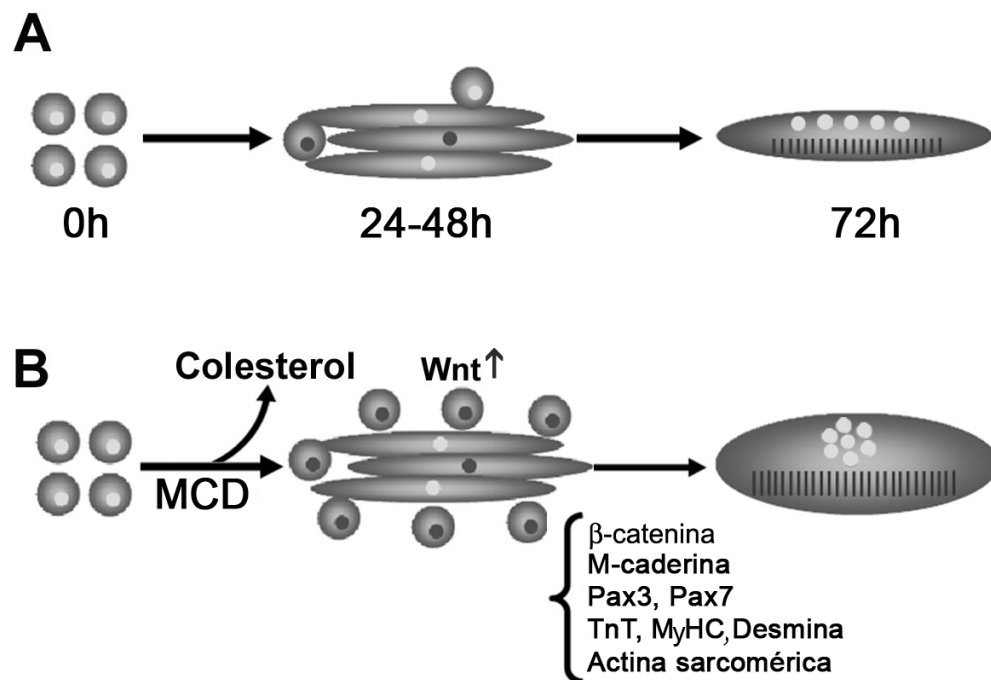


Figura 21 – Modelo esquemático dos efeitos da retirada de colesterol em culturas musculares. A- Células-controle foram plaqueadas (0h) e após 24 horas, muitas se alongaram entrando no programa de diferenciação muscular, enquanto outras permaneceram mononucleadas e arredondadas. Algumas das células mononucleadas arredondadas estão quiescentes (núcleo branco) e outras tem a via de Wnt/β-catenina ativada (núcleos escuros, indicando a presença de β-catenina nuclear), se proliferando e diferenciando, para formar miotubos longos, estriados e com os núcleos organizados na periferia celular (72 horas). B- Quando as células completaram 24 horas de vida, foram tratadas com MCD 2mM por 30 minutos, o qual removeu o colesterol membranar. Com isso, moléculas associadas a regiões ricas em colesterol, podem ter sido liberadas da membrana e tornaram-se solúveis no meio de cultura. Algumas destas moléculas podem ser da família de glicoproteínas Wnt, que são descritas como moléculas palmitoiladas e que se ancoram em regiões membranares ricas em colesterol. Assim, Wnts solúveis poderiam se ligar a seus receptores em larga escala, e ativar diversas células quiescentes (células mononucleadas arredondadas) a proliferarem (aumentando a expressão de Pax3, Pax7 e M-caderina) e diferenciarem (aumentando a expressão de Tropononina T, α-actina sarcomérica, Desmina e MyHC), formando miotubos espessos, com muitas estriações e com núcleos desorganizados.

Resumidamente, pode-se concluir que a depleção de colesterol pelo tratamento com MCD induz a proliferação de células musculares, o que permite levar a um aumento do alinhamento e da fusão de mioblastos, culminando com a formação de miotubos estriados e com mais núcleos/célula que os observados nas culturas-controle. Primeiramente, a retirada de colesterol induz a replicação, o que acarreta em seguida um aumento da diferenciação muscular.

Como neste trabalho encontrou-se um aumento de Wnt 3a no meio condicionado e a ativação da via de Wnt em culturas tratadas pela MCD, pode-se especular que a depleção de colesterol pode liberar moléculas de Wnt para o meio de cultura e ativar a via de Wnt de células quiescentes, induzindo-as a proliferar e a se diferenciar. Esses achados enfatizam a importância da organização do colesterol membranar e seu papel nas etapas iniciais da miogênese.

Este trabalho de tese levantou várias questões relacionadas aos efeitos da depleção de colesterol durante a miogênese que o nosso grupo de pesquisa pretende dar continuidade. Algumas destas questões envolvem as seguintes abordagens:

- Análise de genes relacionados com a via de Wnt, e determinação de quais tipos de Wnts e Frizzleds estão envolvidos neste processo.
- Análise da secreção de fatores solúveis para o meio de cultura, que pode ser respondida com a utilização da droga Brefeldina (inibidora de secreção de proteínas) em culturas-controle e tratadas com MCD.
- Experimentos com espectrometria de massa para se avaliar as proteínas presentes nos meios condicionados de culturas- controle e tratadas com MCD.
- Testes dos efeitos da substância alfa-ciclodextrina (utilizada em muitos trabalhos como controle para a metil-beta-ciclodextrina, por não remover colesterol e sim, fosfolipídeos da membrana plasmática) nas culturas musculares.
- Análise dos microdomínios de membrana de culturas-controle e tratadas com MCD, através de microscopia eletrônica de transmissão.
- Análise da composição proteica de frações enriquecidas em cavéolas obtidas a partir de culturas de células musculares controle e tratadas com MCD.

- Investigação da expressão de genes regulatórios do ciclo celular, como a proteína ciclina D1, para testar o seu envolvimento com a ativação da proliferação celular desencadeada por MCD em células musculares.

6. Conclusões

Resumidamente, podemos concluir a partir dos resultados deste trabalho de tese que:

- A depleção de colesterol pela metil- β -ciclodextrina (MCD) induziu a diferenciação muscular, evidenciada pelo aumento do índice de fusão das culturas musculares.
- O tratamento com MCD levou a um aumento na expressão das proteínas miofibrilares α -actina sarcomérica, desmina, miosina e M-caderina, sugerindo que uma diminuição do colesterol membranar pode ser um mecanismo regulatório para o início da diferenciação muscular esquelética.
- A retirada do colesterol das culturas de mioblastos de galinha pela MCD provocou um aumento da expressão de β -catenina, sua translocação para o núcleo e a ativação da via de Wnt/ β -catenina.
- Os efeitos provocados pela MCD na diferenciação muscular foram inibidos pela adição do meio de cultura enriquecido com a proteína antagonista da via de Wnt/ β -catenina, Frzb-1, nas culturas musculares.
- O meio condicionado proveniente de uma cultura de mioblastos previamente tratada com MCD, apresentou fatores solúveis indutores de diferenciação muscular com um peso molecular na faixa de 30-50 kDa, semelhante ao peso molecular das glicoproteínas Wnt que possuem peso molecular na faixa de 38-43 kDa.
- O meio de cultura enriquecido com a proteína Wnt 3a induziu a diferenciação muscular de maneira similar, tanto ao tratamento com MCD, quanto pela adição de meio condicionado MCD. Entretanto, o meio de cultura enriquecido em Wnt5, bloqueou drasticamente a diferenciação muscular.
- O aumento de proteínas Wnt3 solúveis e ativas no meio de cultura condicionado é um resultado do tratamento de MCD, o qual interfere na disponibilidade de Wnt solúvel no meio de cultura.
- O tratamento com MCD levou a um aumento significativo na proliferação celular.

- Os efeitos induzidos pela depleção de colesterol não estão relacionados com fibroblastos presentes nas culturas primárias musculares, mas sim, relacionados às células musculares.
- As culturas de mioblastos expressam os genes Lef1, Wnt1, Wnt3a, Wnt5a e GAPDH e não se observou diferenças significativas nos níveis de expressão dos diversos tipos de wnts nas culturas controle e tratadas com MCD.

7. Bibliografia

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Watson, J. (2002) *Molecular Biology of The Cell* – Quarta Edição – Editora Garland.

Anakwe, K., Robson, L., Hadley, J., Buxton, P., Church, V., Allen, S., Hartmann, C., Harfe, B., Nohno, T., Brown, A. M., Evans, D. J., Francis-West, P. (2003) “Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing” – *Development*, 130: 3503-3514.

Banziger, C., Soldini, D., Schutt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., Basler, K. (2006) “Wntless, a conserved membrane proteindicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells” – *Cell*, 125: 509–522.

Barth, A. I. M., Näthke, I. S., Nelson, W. J. (1997) “Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways” – *Curr. Opin Cell Biol.*, 9: 683-690.

Ben-Ze'ev, A., Shtutman, M., Zhurinsky, J. (2000) “The integration of cell adhesion with gene expression: the role of β -catenin” – *Exp. Cell Res.*, 261: 75-82.

Bradford, M.M. (1976) “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” - *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Bodin, S., Giuriato, S., Ragab, J., Humbel, B. M., Viala, C., Vieu, C., Chap, H., Payrastre, B. (2001) “Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation” - *Biochemistry*, 40: 15290-15299.

Borycki, A. G., Brunk, B., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., Chiang, C., Emerson, C.P. Jr. (1999) “Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation” – *Development*, 126: 4053-4063.

Brennan, T. J., Edmondson, D. C., Li, L., Olson, E. N. (1991) “Transforming growth factor β represses the actions of myogenin through a mechanism independent of the DNA binding” – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3822-3826.

Capetanaki, Y., Milner, D.J., Weitzer, G. (1997) "Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences" - *Cell Struct. Funct.*, 22 (1):103-116.

Causeret, M., Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Gauthier-Rouviere, C. (2005) "N-Cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts" – *Mol. Biol. Cell*, 16: 2168–2180.

Cerneus, D. P., Ueffing, E., Posthuma, G., Strous, G. J., Van der Ende, A. (1993) "Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol" - *J. Biol. Chem.*, 268: 3150-3155.

Charge, S. B. P., Rudnicki, M. A. (2004) "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration" – *Physiol. Rev.*, 84: 209-238.

Charlton, C. A., Mohler, W. A., Radice, G. L., Hynes, R. O., Blau, H. M. (1997) "Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture" - *J. Cell Biol.*, 138: 331-336.

Choi, J.; Costa, M. L.; Mermelstein, C. S.; Chagas, C.; Holtzer, S., Holtzer, H. (1990) "MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes" - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7988-7992.

Christ, B., Brand-Saberi, B. (2002) "Limb muscle development" - *Int. J. Dev. Biol.*, 46: 905-914.

Clark, K. A., McElhinny, A. S., Beckerle, M. C., Gregorio, C. C. (2002) "Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function" - *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 18: 637-706.

Cohen, E. D., Mariol, M. C., Wallace, R. M. H., Weyers, J., Kamberov, Y. G., Pradel, J. Wilder, E. L. (2002) "Dwnt4 regulates cell movement and focal adhesion kinase during *Drosophila* ovarian morphogenesis" – *Dev. Cell*, 2: 437-448.

Comarck, D. H. (1996) *Fundamentos de Histologia*. Editora Guanabara Koogan.

Cooper, G. M. (2000) *The Cell – A Molecular Approach* – Segunda Edição.

Cornell, R. B., Nissley, S. M., Horwitz, A. F. (1980) "Cholesterol availability modulates myoblast fusion" - *J. Cell Biol.*, 86: 820-824.

Cossu, G., Tajbakhsh, S., D., Buckingham, M. (1996) "How is myogenesis initiated in the embryo?" – *TIG*, 12: 218-223.

Cossu, G., Borello, U. (1999) "Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals" - *EMBO J.*, 18: 6867-6872.

Costa, M. L., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F., Mermelstein, C. S. (2004) "Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein" – *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37 (12): 1819-1830.

Denetclaw, W. F., Ordahl, C. P. (2000) "The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos" - *Development*, 127: 893-905.

Descamps, S., Arzouk, H., Bacou, F., Bernardi, H., Fedon, Y., Gay, S., Reyne, Y., Rossano, B., Levin, J. (2008) "Inhibition of myoblast differentiation by Sfrp1 and Sfrp2" - *Cell Tissue Res.* 332: 299–306.

Epstein, J. A., Lam, P., Maas, R. L., Shapiro, D. N. (1995) "Pax-3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblasts cells" – *J. Biol. Chem.*, 270: 11719-11722.

Galbiati, F., Razani, B., Lisanti, M. P. (2001) "Emerging themes in lipids: rafts and caveolae" – *Cell*, 106: 403-411.

Gadbut, A. P., Caruso, A. P., Galper, J. B. (1995) "Differential sensitivity of C2-C12 striated muscle cells to lovastatin and pravastatin" – *J. Mol. Cell Cardiol.*, 27: 2397-2402.

Galli, L. M., Willert, K., Nusse, R., Yablonka-Reuveni, Z., Nohno, T., Denetclaw, W., Burrus, L. D. (2004) "A proliferative role for Wnt-3a in chick somites" – *Dev. Biol.*, 269: 489– 504.

Gilfix, B. M., Sanwal, B. D. (1980) "Inhibition of myoblast fusion by tunicamycin and pantomycin" - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96: 1184-1191.

Goichberg P., Shtutman M., Ben-Ze'ev, A., Geiger, G. (2001) "Recruitment of β -catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction" - *J. Cell Sci.*, 114: 1309-1319.

Gómez-Moutón, C., Lacalle, R. A., Mira, E., Jiménez-Baranda, S., Barber, D. F., Carrera, A. C., Martínez-A, C., Mañes, S. (2004) "Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis" – *J. Cell Biol.*, 164: 759-768.

Gueetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Pröls, F., Patel, K., Scaal, M., Huang, R., Christ, B. (2005) "Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis" – *Dev. Biol.*, 288: 221 – 233.

Halevy, O., Novich, B. G., Spicer, D. B., Skapek, S. X., Rhee, J., Hannon, C. J. Beach, D., Lassar, A. B. (1995) "Correlation terminal cell cycle arrest skeletal muscle with induction of P21 by MyoD" – *Science*, 267: 1018-1021.

Hatta, K., Takeichi, M. (1986) "Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development" - *Nature*, 320: 447-449.

Hirsinger, E., Duprez, D., Jouve, C., Malapert, P., Cooke, J. and Pourquié, O. (1997) "Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning" – *Development*, 124: 4605-4614.

Holtzer, H., Croop, J., Dienstman, S., Ishikawa, H., Somlyo, A. P. (1975) "The effects of cytochalasin B and colcemid on myogenic cultures" - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 513-517.

Holtzer, H., Sasse, J., Horwitz, A., Antin, P., Pacifici, M. (1986) "Myogenic lineages and myofibrillogenesis" - *Bibliotheca Anatomica*, 29: 109-125.

Holtzer, H., Dilullo, C., Costa, M.L., Lu, M., Choi, J., Mermelstein, C.S., Schultheiss, T. and Holtzer, S. (1991) "Striated myoblasts and multinucleated myotubes induced in non-muscle cells by MyoD are similar to normal in vivo and in vitro counterpart". In: Ozawa, E., Masaki, T. and Nabeshima, Y. eds. *Frontiers in muscle research*, Chapter 15. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 187–207.

Howng, S. L., Wu, C. H., Cheng, T. S. (2002) "Differential expression of Wnt genes, β -catenin and E-cadherin in human brain tumor" – *Canc. Letters*, 183: 95-101.

Hsieh, J. C., Kodjabachian, L., Rebbert, M. L., Rattner, A., Smallwood, P. M., Samos, C. H., Nusse, R., Dawid, I. B., Nathans, J. (1999) "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities" - *Nature*, 398: 431-436.

Ikeya, M., Takada, S. (1998) "Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome" – *Development*, 125: 4969-4976.

Ilangumaran, S., Hoessli, D. C. (1998) "Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane" – *Biochem. J.*, 335: 433-440.

Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y. P., Lee, H. Y., Schlaepfer, D. D., Aneskievich, B. J., Haimovich, B. (2001) "The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase" - *J. Biol. Chem.*, 276 (31): 28676-28685.

Jen, Y., Weintraub, H., Benezra, R. (1992) "Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with e2A proteins" – *Genes Dev.*, 6: 1466-1479.

Johnson, T. E., Zhang, X., Bleicher, K. B., Dysart, G., Loughlin, A. F., Schaefer, W. H., Umbenhauer, D. R. (2004) "Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone" - *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 200: 237–250.

Kalderon, N., Gilula, N. B. (1979) "Membrane events involved in myoblast fusion" - *J. Cell Biol.*, 81: 411-425.

Kim, C. H., Neiswender, H., Baik, E. J., Xiong, W. C., Mei, L. (2008) " β -Catenin Interacts with MyoD and Regulates Its Transcription Activity" - *Mol. Cell Biol.*, 28: 2941–2951.

Klein, U., Gimpl, G., Fahrenholz, F. (1995) "Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor" - *Biochemistry*, 34: 13784-13793.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Clevers, H. "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma" – *Science*, 275: 1784-1787.

Kramerova, I., Kudryashova, E., Wu, B., Spencer, M. J. (2006) "Regulation of the M-cadherin- β -catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation" - *Mol. Cell Biol.*, 26: 8437–8447.

Kuang, S., Charge, S. B., Seale, P., Huh, M., Rudnicki, M. A. (2006) "Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis" - *J. Cell Biol.*, 172:103-113.

Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., Rudnicki, M. A. (2007) "Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle" - *Cell*, 129: 999-1010.

Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4" - *Nature*, 227: 680-685.

Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S. H., Piccolo, S., De Robertis, E. M. (1997) "Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer" – *Cell*, 88: 747-756.

Linker, C., Lesbros, C., Stark, M.R., Marcelle, C. (2003) "Intrinsic signals regulate the initial steps of myogenesis in vertebrates" – *Development*, 130: 4797–4807.

Lodish, H., Berk, A., Zupursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000) *Molecular Cell Biology* - Quarta Edição - Editora Scientific American Books.

Ludolph, D. C., Konieczny, S. F. (1995) "Transcription factor families: muscling in on the myogenic program" - *FASEB J.*, 9: 1595-1604.

Maher, M., Flozak, A., Stocker, A., Chenn, A., Gottardi, C. (2009) "Activity of the β -catenin phosphodestruction complex at cell–cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion" - *J. Cell Biol.*, 186: 219–228.

Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stanek, P., Glinka, A., Niehrs, C. (2001) "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins" – *Nature*, 411: 321-325.

Mermelstein, C. S.; Costa, M. L.; Chagas, C. and Moura Neto, V. J (1996) "Intermediate filaments in TPA-treated skeletal muscle cells in culture" *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 17: 199-206.

Mermelstein, C. S., Portilho, D. M., Medeiros, R. B., Matos, A. R., Einicker-Lamas, M., Tortelote, G. G., Vieyra, A., Costa, M. L. (2005) "Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei" - *Cell Tissue Res.*, 319 (2): 289-297.

Mermelstein, C. S., Andrade, L. R., Portilho, D. M., Costa, M. L. (2006) "Desmin filaments are stably associated with the outer nuclear surface in chick myoblasts" - *Cell Tissue Res.*, 323 (2):351-357.

Mermelstein, C. S., Portilho, D. M., Mendes, F.A., Costa, M.L., Abreu, J.G. (2007) "Wnt/beta-catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion" - *Differentiation*, 75 (3): 184-192.

Molkentin, J. D., Olson, E. N. (1996) "Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors" - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9366-9373.

Mukai, A., Kurisaki, T., Sato, S. B., Kobayashi, T., Kondoh, G., Hashimoto, N. (2009) "Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to 3 fusion competence of myogenic cells" – *Exp. Cell Res.*, online.

Nakanishi, M., Hirayama, E., Kim, J. (2001) " Characterization of myogenic cell membrane: II. Dynamic changes in membrane lipids during the differentiation of mouse C2 myoblast cells" - *Cell Biol. Int.*, 25 (10): 971-979.

Nelson, W. J., Nusse, R. (2004) "Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways" – *Science*, 5: 1483-1487.

Nguyen, D. H., Espinoza, J. C., Taub, D. D. (2004) "Cellular cholesterol enrichment impairs T cell activation and chemotaxis" – *Mech. Age. Dev.*, 125: 641–650.

Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W. (2008) "Wnt Signaling and Stem Cell Control" - *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 73: 59-66.

Ott, M. O., E. Bobes, G., Lyons, H. Arnold, and M. Buckingham (1991) "Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo" - *Development*, 111: 1097-1107.

Otto, A., Schmidt, C., Luke, G., Allen, S., Valasek, P., Muntoni, F. Lawrence-Watt, D., Patel, D. (2008) "Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration" – *J. Cell Sci.*, 121: 2939-2950.

Pan, W., Jia, Y., Wang, J., Tao, D., Gan, X., Tsiokas, L., Jing, N., Wu, D., Li, L. (2005) "Beta-catenin regulates myogenesis by relieving I-mfa-mediated suppression of myogenic regulatory factors in P19 cells" – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 (48): 17378-17383.

Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., Eaton, S. (2005) "Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signaling" – *Nature*, 435: 58–65.

Peifer, M., Orsulic, S., Pai, L., Loureiro, J. (1993) "A model system for cell adhesion and signal transduction in *Drosophila*" - *Dev. Suppl.*, 163-176.

Pera, E. M., De Robertis, E. M. (2000) "A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1" – *Mech. Dev.*, 96: 183-195.

Petropoulos, H., Skerjanc, I. S. (2002) "Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cell" – *J. Biol. Chem.*, 277: 15393–15399.

Pike, L. J. (2004) "Lipid rafts: heterogeneity on the high seas" - *Biochem. J.*, 378 (2): 281-292.

Polesskaya, A., Seale, P., Rudnicki, M. A. (2003) "Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45⁺ adult stem cells during muscle regeneration" - *Cell*, 113: 841–852.

Portilho, D. M., Martins, E. R., Costa, M. L., Mermelstein, C. S. (2007) "A soluble and active form of Wnt-3a protein is involved in myogenic differentiation after

Pourquie, O. (2000) "Segmentation of the paraxial mesoderm and vertebrate somitogenesis" - *Curr. Top. Dev. Biol.*, 47:81-105.

Pownall, M. E., Emerson Jr., C. P. (1992) "Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos" - *Dev. Biology*, 151: 67-79.

Pownall, M. E., Gustafsson, M. K., Emerson, C. P. Jr (2002) " Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos" - *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18: 747-783.

Prives, J., Shinitzky, M. (1977) "Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells" - *Nature*, 268: 761–763.

Razani, B., Lisanti, M. P. (2001) "Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships" – *Exp. Cell Res.*, 271 (1): 36-44.

Razani, B., Park, D. S., Miyanaga, Y., Ghatpande, A., Cohen, J., Wang, X. B., Scherer, P. E., Evans, T., Lisanti, M. P. (2002) "Molecular cloning and developmental expression of the caveolin gene family in the amphibian *Xenopus laevis*." - *Biochemistry*, 41(25):7914-7924.

Reichsman, F., Smith, L., Cumberledge, S. (1996) "Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction" – *J. Cell Biol.* , 135 (3): 819-827.

Ridgeway, A. G., Petropoulos, H., Wilton, S., Skerjanc, I. S. (2000) "Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin" – *J. Biol. Chem.*, 275: 32398–32405.

Rochat, A., Fernandez, A., Vandromme, M., Molés, J. P., Bouschet, T., Carnac, G. (2004) "Insulin and Wnt1 Pathways Cooperate to Induce Reserve Cell Activation in Differentiation and Myotube Hypertrophy" - *Mol Biol Cell*, 15 (10): 4544–4555.

Rothberg, K. G., Ying, Y. S., Kamen, B. A., Anderson, R. G. (1990) "Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate" - *J. Cell Biol.*, 111 (2): 2931-2938.

Rudnicki, M. A., Schinegelsberg, P. N. J., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., Jaenisch, R. (1993) "MyoD or Mif-5 is required for the formation of skeletal muscle" - *Cell*, 75: 1351-1359.

Sacher, J., Weigl, L., Werner, M., Szegedi, C., Hohenegger, M. (2005) "Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells" – *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314: 1032–1041.

Schmidt, M., Tanaka, M., Münsterberg, A. (2000) "Expression of β -catenin in the developing chick myotome is regulated by myogenic signals" – *Development*, 127: 4105-4113.

Sekiya T, Takenawa T, Nozawa Y. (1984) "Reorganization of membrane cholesterol during membrane fusion in myogenesis in vitro: a study using the filipin-cholesterol complex" - *Cell Struct. Funct.*, 9 (2): 143-155.

Shainberg, A., Yagil, G., Yaffe, D. (1969) "Control of myogenesis in vitro by Ca^{++} concentration in nutritional medium" - *Exp. Cell Res.*, 58 (1): 163-167.

Simon, K., Ikonen, E. (1997) "Functional rafts in cell membranes" - *Nature*, 387: 569-571.

Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A., Anderson, R. G. (1994) "Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation" - *J. Cell Biol.*, 127 (5):1185-1197.

Smart, E. J. *et al.* (1999) "Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction" - *Mol. Cell Biol.*, 19: 7289-7304.

Sotgia, F., Lee, J. K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T. C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F. D., Minetti, C., Sudol, M., Lisanti, M. P. (2000) "Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of β -dystroglycan. Identification of a central www-like domain within caveolin family members" - *J. Biol. Chem.*, 275: 38054-38058.

Taikeichi, M. (1991) "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator" - *Science*, 251: 1451-1455.

Tajbakhsh, S., Borello U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M., Cossu, G. (1998) "Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5" - *Development*, 125: 4155-4162.

Tanaka, K., Kitagawa, Y. & Kadowaki, T. (2002) "*Drosophila* segment polarity gene product *porcupine* stimulates the posttranslational N-glycosylation of Wingless in the endoplasmic reticulum" - *J. Biol. Chem.*, 277: 12816–12823.

Takada, R. *et al.* (2006) "Mono-unsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion" - *Dev. Cell*, 11: 791–801.

Takata, H., Terada, K., Oka, H., Sunada, Y., Moriguchi, T., Nohno, T. (2007) "Involvement of Wnt4 Signaling During Myogenic Proliferation and Differentiation of Skeletal Muscle" - *Dev. Dyn.*, 236: 2800–2807.

Taki, M., Kamata, N., Yokoyama, K., Fugimoto, R., Tsutsumi, S., Nagayama M. (2003) "Down-regulation of Wnt4 and up-regulation of Wnt5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cell" - *Cancer Sci.*, 94 (7): 593-597.

Tam, P. P. L., Goldman D., Camus, A., Shoenwolf G. C. (2000) "Early events of somitogenesis in higher vertebrates: allocation of precursor cells during gastrulation and the organization of a meristic pattern in the paraxial mesoderm" - *Curr. Top. Dev. Biol.*, 47: 1-32.

Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Charrasse, S., Bodin, S. Gauthier-Rouviere, C. (2009) "N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis" - *J. Biol. Chem.*, 284: 23137–231245.

Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K., Pellegrino, M. A., Furling, D., Mouly, D. V., Butler-Browne, G. S., Bottinelli, R., Cossu, G., Bresolin, N. (2004) "Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle" – *J. Clin. Invest.*, 114 (2): 182-195.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1992) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. 1979" – *Biotechnology*, 24: 145-149.

Van der Bosch, J., Schudt, C., Pette, D. (1973) "Influence of temperature, cholesterol, dipalmitoyllecithin and Ca^{++} on the rate of muscle cell fusion" - *Exp. Cell Res.*, 82: 433-438.

Veeman, M. T., Axelrod, J. D., Moon, R. T. (2003) "A Second Canon: functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling" – *Dev. Cell*, 5: 367-377.

Volonte, D., Peoples, A. J., Galbiati, F. (2003) "Modulation of myoblast fusion by caveolin-3 in dystrophic skeletal muscle cells: implications for Duchenne muscular dystrophy and limb-girdle muscular dystrophy-1C" – *Mol. Biol. Cell*, 14: 4075-4088.

Volonte, D., Liu, Y., Galbiati, F. (2005) "The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair" - *FASEB J.*, 19 (2): 237-239.

Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., III, and Nusse, R. (2003) "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors" – *Nature*, 423: 448-452.

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

Wiltin, J., H. Kurz, B. Bran-Saberi, G. Steding, Y. X. Yang, H. M. Hasselhorn, H. H. Epperlein, Christ, B. (1994) "Kinetics and differentiation of somite cells forming the vertebral column: Studies on human and chick embryos" - *Anat. Embryol.*, 190: 573-581.

Xie, M., Low, M. G. (1995) "Streptolysin-O induces release of glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase from ROS cells by vesiculation independently of phospholipase action" – *Biochem. J.*, 305 (2): 529-537.

Yun, K., Wold, B. (1996) "Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context" - *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8 (6): 877-889.

Zhai, L., Chaturvedi, D., Cumberledge, S. (2004) "Drosophila Wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine" - *J. Biol. Chem.*, 279 (32): 33220-33227.

Zeschnek, M., Kozian, D., Kuch, C., Schmoll, M., Starzinski-Powitz, A. (1995) "Involvement of M cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells" - *J. Cell Sci.*, 108: 2973-2981.

Zhang, W., Behringer, R. R., Olson, E. N. (1995) "Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies"- *Genes Dev.*, 9: 1388-1399.

Zhurinsky, J., Sctutman, M., Ben-Ze'ev, A. (2000) "Plakoglobin and β -catenin: protein interactions, regulation and biological roles" – *J. Cell Sci.*, 113: 3127-3139.

8. Anexos

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética com Animais em Experimentação Científica



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro 11 de Julho de 2008

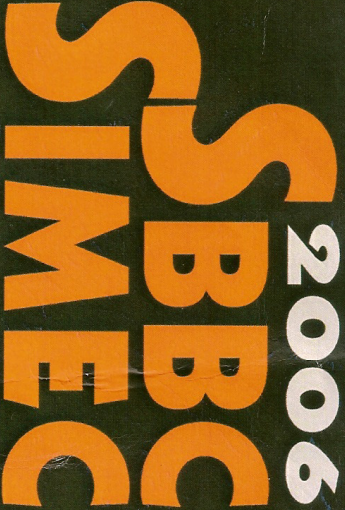
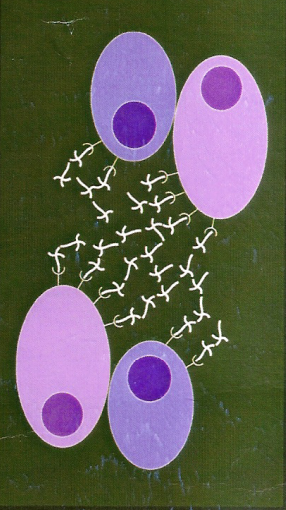
Prezado Professor Cláudia dos Santos Mermelstein

A Comissão de Ética com Animais em Experimentação Científica (Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro) certifica que o projeto intitulado: **“Envolvimento de colesterol e micro-domínios de membrana na diferenciação muscular”** onde é previstos protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta Comissão, sob o número de referência DAHEICB 004.

Atenciosamente;


Marcelo Marco Morales
Presidente CEUA CCS

MARCELO M. MORALES
Presidente da Comissão
de Ética com Animais - CCS

Anexo 2: Prêmios



XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular

IX Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular

IV International Symposium on Extracellular Matrix

CERTIFICADO

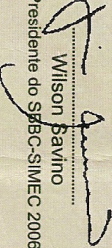
Certificamos que **DEBORA MORUECO PORTILHO** recebeu o **1º Primeiro Prêmio**, na categoria de Pós-graduação pela apresentação do posters intitulado

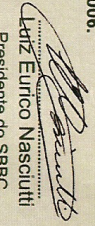
“Wnt/β-catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion “

de autoria de **Claudia Dos Santos Mermelstein, Débora Morueco Portilho, Fábio Mendes, Manoel Luis Costa, José Garcia Junior,**

durante o XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular / IX Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular / IV International Symposium on Extracellular Matrix, realizado de 26-30 de julho de 2006, em Armação dos Búzios, RJ.

Búzios, 30 de julho de 2006.


Wilson Savino
Presidente do SBBC-SIMEC 2006


Luiz Eurico Nasciutti
Presidente do SBBC

Búzios
Rio de Janeiro RJ
26-30 Julho de 2006



PRÊMIO MELHOR POSTER (AZUL) E MENÇÃO HONROSA

IC

Camila Brand, UFRJ, Márcia Curi

Camila Castro Figueiredo, UERJ, Verônica Morandi

Caroline Monteiro F Freire, UFRJ, Mauro Pavão

Mestrado

Ronaldo José Farias C do Amaral, UFRJ, Radovan Borojevic

Marcos Assis Nascimento, UFRJ, Tatiana Coelho de Sampaio

Doutorado

Alexandre Bruni Cardoso, UNICAMP, Hernandes F Carvalho

Daniel Escorsim Machado, UFRJ, Luiz Eurico Nasciutti

Débora Portilho, UFRJ, Cláudia Mermelstein

Joana G Ferreira, UNIFESP, Maria Luísa Vilela Oliva

Marina Trombetta Lima, USP, Meire Sogayar

Taíze Machado Augusto, UNICAMP, Hernandes F Carvalho

Virginia Chaves de Lima W de Castro, UFRJ, Rosália M Otero

PosDoc

Edgar Julian Paredes Gamero, UNIFESP, Helena Nader

Cláudia Magalhães Calvet, FIOCRUZ, Miriam Cláudia de Souza Pereira

Gabriel Lima Verde C Souza, UFRJ, Donald Ingberg

2009 SDB Awards

Edwin G. Conklin Medal

David Mark Kingsley, Stanford University. Abst. Prog. # L1

DEVELOPMENTAL BIOLOGY-SDB Lifetime Achievement Award

Donald D. Brown, Carnegie Institution for Science. Abst. Prog. # 76

Viktor Hamburger Outstanding Educator Prize

Sean B. Carroll, University of Wisconsin-Madison

SDB Latin America-Caribbean Scholarships

Helena Araújo, Univ Federal do Rio de Janeiro, Brazil, Abst. Prog. #L7

Nathalia da Graça Amado, Univ Federal do Rio de Janeiro, Brazil, Abst. Prog. #123

Rocío Hernández-Martínez, Univ Autonoma de Mexico-Cuernavaca, Mexico, Abst. Prog. #232

Consuelo Ibar, Univ. de Chile, Chile, Abst. Prog. #323

Mariana Pinto Louza, Univ Federal do Rio de Janeiro, Brazil, Abst. Prog. #122

Debora Morueco Portilho, Univ Federal do Rio de Janeiro, Brazil, Abst. Prog. #337

Alejandra Rodriguez Celin, Univ Favaloro, Argentina, Abst. Prog. #190, 482

Marcela E. Torrejon, Univ de Concepcion, Chile, Abst. Prog. #100

SDB Regional Meeting Winners

Northeast

Student – **Julian Sosnik**, University of Massachusetts, Abst. Prog. #321

Postdoc – **Lori O'Brien**, Massachusetts General Hospital, Abst. Prog. #L26

Mid-Atlantic

Student – **Tracy Vrablik**, Penn State University, Abst. Prog. #L30

Postdoc – **Debra Silver**, NHGRI/NIH, Abst. Prog. #L82

Southeast

Student – **Jonah Cool**, Duke University, Abst. Prog. #388

Postdoc – **Shuangding Li**, Emory University, Abst. Prog. #L61

Midwest

Student – **Robert Hufnagel**, Cincinnati Children's Res. Fdn., Abst. Prog. #L52

Postdoc – **Julaine Roffers-Agarwal**, University of Minnesota, Abst. Prog. #290

Northwest

Student – **Anne E. Powell**, Oregon Health and Science University, Abst. Prog. #408

Postdoc – **Douglas Weiser**, University of Washington State, Abst. Prog. #300

West Coast

Student – **Martis Cowles**, San Diego State University, Abst. Prog. #L92

Postdoc – **Jen-Yi Lee**, University of California, Abst. Prog. #325

Anexo 3: artigo publicado – “A depleção de colesterol aumenta a fusão de mioblastos e induz a formação de miotubos com núcleos desorganizados”

Cell Tissue Res (2005) 319: 289–297
DOI 10.1007/s00441-004-1004-5

REGULAR ARTICLE

Cláudia S. Mermelstein · Débora M. Portilho ·
Rommel B. Medeiros · Aline R. Matos ·
Marcelo Einicker-Lamas · Giovane G. Tortelote ·
Adalberto Vieyra · Manoel L. Costa

Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei

Received: 25 May 2004 / Accepted: 14 September 2004 / Published online: 10 November 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract The formation of a skeletal muscle fiber begins with the withdrawal of committed mononucleated precursors from the cell cycle. These myoblasts elongate while aligning with each other, guided by recognition between their membranes. This step is followed by cell fusion and the formation of long striated multinucleated myotubes. We used methyl- β -cyclodextrin (MCD) in primary cultured chick skeletal muscle cells to deplete membrane cholesterol and investigate its role during myogenesis. MCD promoted a significant increase in the expression of troponin T, enhanced myoblast fusion, and induced the formation of large multinucleated myotubes with nuclei being clustered centrally and not aligned at the cell periphery. MCD myotubes were striated, as indicated by sarcomeric α -actinin staining, and microtubule and desmin filament distribution was not altered. Pre-fusion MCD-treated myoblasts formed large aggregates, with cadherin and β -catenin being accumulated in cell adhesion contacts. We also found that the membrane microdomain marker GM1 was not present as clusters in the membrane of MCD-treated myoblasts. Our data demonstrate that cholesterol is involved in the early steps of skeletal muscle differentiation.

Keywords Muscle differentiation · Cholesterol · Myoblast · Cell fusion · Cyclodextrin · Pectoral muscle · Chick

Introduction

Skeletal muscle differentiation begins with the emergence of mononucleated myoblasts that withdraw from the cell cycle and begin to elongate. These bipolar myoblasts align with each other guided by recognition between their plasma membranes. This step is followed by cell adhesion and fusion, and myogenesis is completed with the formation of long multinucleated myotubes having a highly organized contractile apparatus. Myoblast fusion is an early event during myogenic differentiation, and although it has been extensively studied, the molecular basis of this process is still poorly understood. Since cell fusion is a membrane-based event, many membrane molecules have been implicated in myoblast fusion. One such molecule is cholesterol, a ubiquitous and abundant component of animal membranes. Cholesterol is a sterol lipid that plays pleiotropic roles in plasma membrane function; it is involved in maintaining membrane fluidity and impermeability and the structure of lipid microdomains. A decrease in membrane cholesterol has been shown to be necessary for myoblast fusion (Sekiya et al. 1984; Hirayama et al. 2001; Nakanishi et al. 2001). Conversely, earlier work by Comell et al. (1980) has shown that a continued local supply of cholesterol is a requirement for the assembly or maintenance of the aggregation activity that occurs concomitant with myoblast fusion. In view of the recent focus on the importance of the functions of cholesterol-containing structures in maintaining the structure and dynamics of plasma membranes and on the conflicting data relating to the role of cholesterol during myoblast fusion, we decided to extend the study of the involvement of cholesterol in the early events of skeletal muscle differentiation.

This work was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Programas de Apoio aos Núcleos de Excelência (Pronex)

C. S. Mermelstein (✉) · D. M. Portilho · R. B. Medeiros ·
A. R. Matos · M. L. Costa
Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto,
Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de
Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ 21949-590, Brazil
e-mail: mermelstein@ufrj.br
Tel.: +55-21-25626429
Fax: +55-21-22370844

M. Einicker-Lamas · G. G. Tortelote · A. Vieyra
Laboratório de Físico-Química Biológica, Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ 21949-590, Brazil

In the present work, we have used methyl- β -cyclodextrin (MCD), which selectively removes cholesterol from cell membranes (Ilangumaran and Hoessli 1998), to change membrane composition and structure and to investigate the cellular and molecular mechanisms associated with cholesterol during skeletal muscle differentiation. We have analyzed cytoskeletal and cell-adhesion proteins and the expression of troponin T as a specific marker of myogenic differentiation (Lattanzi et al. 2000; McGann et al. 2001). Taken together, the data presented here provide evidence that cholesterol depletion from myoblasts membranes enhances the recognition, differentiation, and fusion of myoblasts, resulting in the formation of large myotubes that display nuclear disorganization.

Materials and methods

Antibodies and fluorescent probes

The filamentous-actin-specific probe, rhodamine-phalloidin, and DNA-binding probe, 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), were purchased from Molecular Probes (Eugene, Ore.). Fluorescently labeled cholera toxin B subunit, which specifically binds to GM1 ganglioside, was purchased from Sigma (St Louis, Mo.). The following antibodies were also purchased from Sigma: rabbit polyclonal anti-pan-cadherin, rabbit polyclonal anti- β -catenin, mouse monoclonal anti- α -tubulin (clone DM 1A), rabbit polyclonal anti-desmin, mouse monoclonal anti-sarcomeric- α -actinin (clone EA-53), and mouse monoclonal anti-troponin T (clone JLT-12). Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to goat anti-mouse IgG and tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) conjugated to goat anti-rabbit IgG antibodies were purchased from Jackson Immuno Research Labs (West Grove, Pa.). Peroxidase-labeled goat anti-mouse antibody was purchased from Amersham International (Buckinghamshire, UK).

Primary skeletal muscle cell cultures

Primary cultures of mononucleated cells were prepared from breast muscles of 11-day-old chick embryos. Fragments of pectoral muscle were incubated for 10 min in a calcium- and magnesium-free solution containing 0.25% trypsin (Sigma). After removal of the trypsin solution, cells were dispersed by repeated pipetting of the tissue in culture medium (minimum essential medium with 10% horse serum, 0.5% chick embryo extract, 1% L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin). The resulting suspension was filtered, and the cells were plated at an initial density of 5×10^5 cells/35-mm culture dish (Nunc, Copenhagen, Denmark) onto 22-mm aclar plastic coverslips (Pro-Plastics, Linden, N.J.) previously coated with rat-tail collagen. Cells were grown under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C and fed daily with fresh culture medium.

The percentage of myoblasts in these cell cultures was calculated by the double-labeling of 24-h cultured cells with both DAPI (nuclear staining) and desmin (muscle-specific marker) and subsequently counting the number of desmin-positive cells in the total number of cells in the field; on average, myoblasts made up 85% of each culture and fibroblastic cells 15%.

Cholesterol depletion

For cholesterol depletion, cells were treated with MCD (Sigma) at a final concentration of 2 mM in culture medium (see above) in 24-h cultures, for 30 min at 37°C. After MCD exposure, cultures were washed with culture medium and grown for 24, 48, or 72 h. Both control and MCD-treated cultures were observed by phase-contrast microscopy and submitted to immunofluorescence microscopy. In some experiments, MCD at final concentrations of 4 mM or 8 mM was added to the culture medium of 24-h cultures in order to test the cellular effects of various amounts of the chemical. In other experiments, MCD at a final concentration of 2 mM was added to the medium at 48 h or 72 h of culture (presence of myotubes) in order to test the effect of cholesterol depletion during myogenic differentiation. Some 24-h myogenic cultures were treated with MCD-cholesterol complexes (1:10 molar ratio) in order to test whether MCD had any other observable effect (besides cholesterol depletion) in these cells.

Cholesterol determination assay

The amount of cholesterol in the culture media was determined according to Courchain et al. (1959) with modifications. The amount of cholesterol was measured in culture medium stock solution (prior to cell feeding), in culture medium from 24-h skeletal muscle cultures, and in culture medium from 24-h skeletal muscle cultures immediately after MCD treatment (2 mM for 30 min).

GM1 labeling with cholera toxin

Live control 24-h myoblasts and 24-h myoblasts immediately after MCD treatment (2 mM for 30 min) were incubated with fluorescently labeled cholera toxin B subunit for 30 min at 4°C to induce the capping of GM1 ganglioside, followed by 30 min incubation at 37°C (Marwali et al. 2003). Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min at room temperature and examined with an epifluorescence inverted optical microscope (Axiovert 100; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Immunofluorescence microscopy and digital image acquisition

For immunofluorescence microscopy, cultures were rinsed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature (Mermelstein et al. 1996). They were then permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma) in PBS (3× 10 min). The same solution was used for all subsequent washing steps. Cells were incubated with one or two antibodies, at appropriate dilutions, for 1 h at 37°C in a humid chamber, washed for 30 min, incubated with secondary antibodies for 1 h at 37°C in a humid chamber, and then washed for 30 min. Some dishes were stained with rhodamine-phalloidin (3.3 μM in PBS) for 20 min at 37°C in a humid chamber. After a 30-min wash with PBS, DAPI (0.1 μg/ml in 0.9% NaCl) was added for 5 min. Cells were washed for 5 min with 0.9% NaCl, and specimens were mounted in glycerol containing (by weight) 5% *n*-propyl gallate, 0.25% 1,4-diazabicyclo (2,2,2)octane, and 0.0025% *para*-phenylenediamine (all from Sigma). Cells were examined with an epifluorescence inverted optical microscope (Axiovert 100; Carl Zeiss) by using filters sets that were selective for fluorescein, rhodamine, or the blue (UV) wavelength channel. Images were acquired with a C2400i integrated charge-coupled device camera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) and an Argus 20 image processor (Hamamatsu). Digitalized images were transferred to a Dell OptiPlex GL 575 computer (Dell Corporate, Round Rock, Tex.), and plates were mounted by using Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, Calif.). Control experiments with no primary antibodies showed only faint background staining (data not shown). Live-cultured cells grown on collagen-coated aclar coverslips were examined, and images were acquired by phase-contrast microscopy with the same microscope and digital system described above.

Morphometric analysis

DAPI images were acquired as described above, and the number of nuclei and amount of DNA were quantified by using the public domain NIH Image program (available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). The amount of DNA was the sum, in each image, of the product of the area of the objects times the mean intensity of the pixels of the objects. These parameters (area, intensity, and object number) were exported to Excel (Microsoft) and to Statistica for Windows (StatSoft, Tulsa, Okla.), in which Wilcoxon statistical analysis was performed. Since the total brightness of the DAPI staining was different in each experiment, we adjusted the threshold to obtain the best nuclear identification. Accordingly, we expressed the amount of DNA as a percentage of the control for each day.

Myotube width was measured only in one region per cell. The region with the greatest width in each myotube was always chosen. Images were calibrated with a grated

slide. A total of 200 myotubes from ten different myogenic cell cultures was analyzed in each assay.

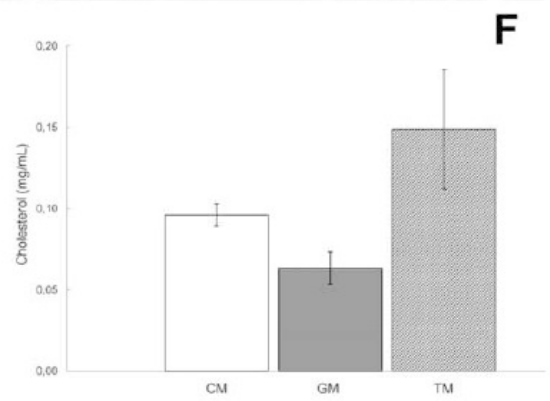
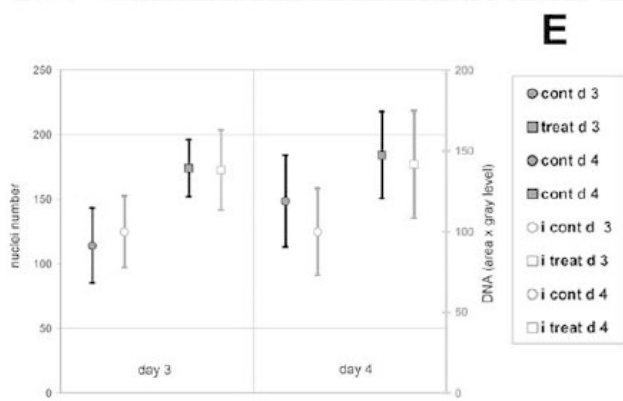
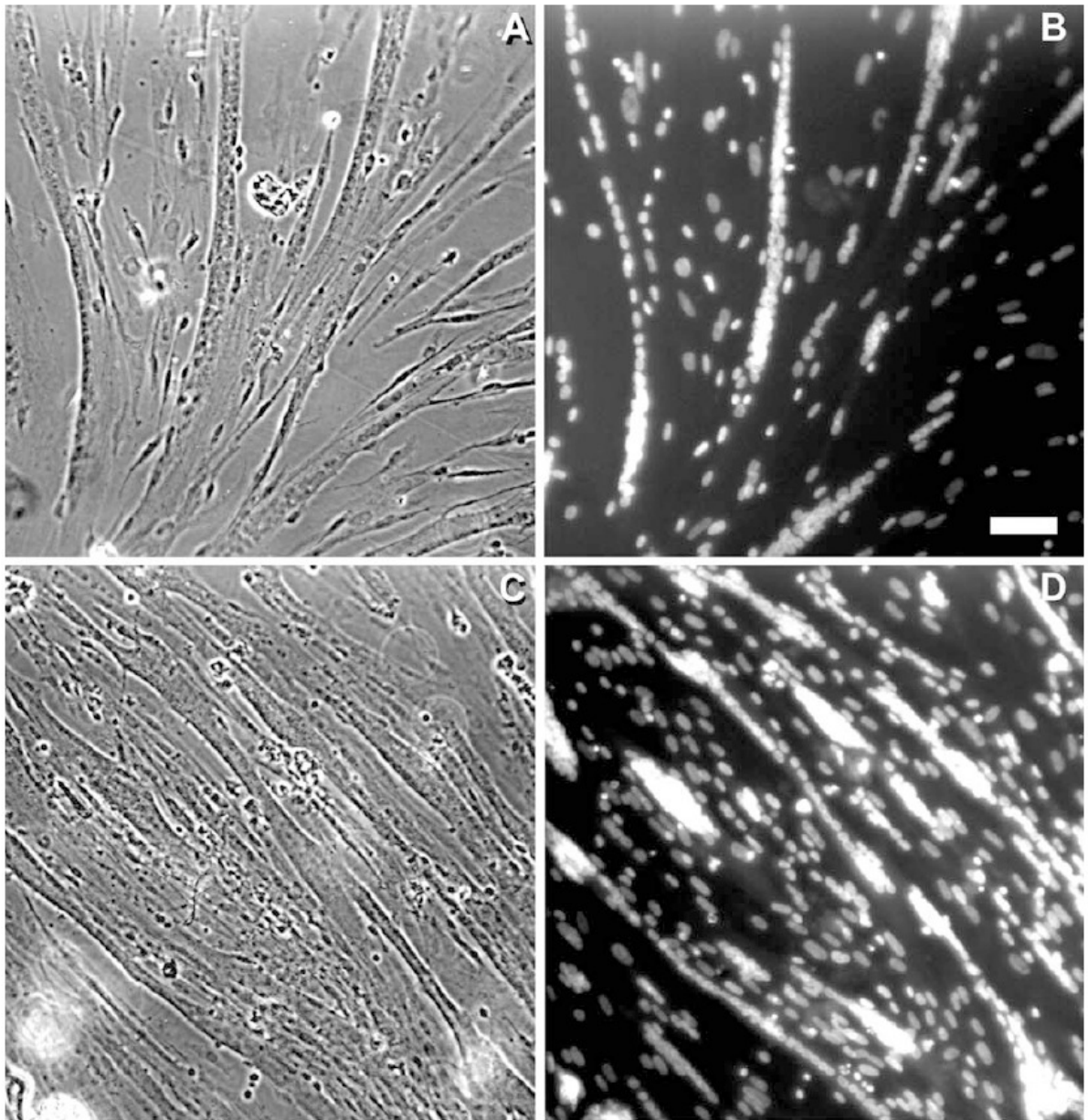
Immunoblotting of cell culture extracts

The protein content from the 48-h cultured control and MCD-treated myogenic cells was quantified by using the Folin phenol reagent (Lowry et al. 1951), and then proteins were extracted with a solution containing 62 mM TRIS, 2% SDS and 5% β-mercaptoethanol. Equal amounts of protein were loaded for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 15% acrylamide; Laemmli 1970) and transferred to nitrocellulose membranes. The proteins immobilized on the membranes were immediately blocked for 1 h at room temperature with a 5% solution of non-fat dry milk in TRIS-buffered saline, Tween 20 solution (0.001%; TBS-T). The membranes were subsequently incubated with a mouse monoclonal anti-troponin T antibody (dilution 1:200 in TBS-T). After five washes in TBS-T (3 min each), the membranes were incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (dilution 1:1000 in TBS-T) and washed again as described above. Bands were visualized by using an ECL system kit (Amersham). The same membranes used for immunodetection were stained with Rouge Ponceau to evaluate the relative amounts of transferred proteins. This procedure allowed the normalization of the densitometric intensity of the immunoblotting signal analyzed by the Scion Image program (available at <http://www.scioncorp.com>) and a precise quantification of the levels of expressed troponin T.

Results and discussion

To investigate the cellular and molecular mechanisms associated with cholesterol depletion in myoblast fusion and skeletal muscle differentiation, we treated 24-h cultured primary chick skeletal muscle cells with MCD (2 mM) for 30 min and allowed the cells to grow in fresh medium for 24, 48, and 72 h. Several studies have demonstrated that cyclodextrins are efficient cholesterol-sequestering agents (Gustavsson et al. 1999; Bodin et al. 2001). Cholesterol depletion by MCD did not block fusion nor cause any arrest of differentiation (Fig. 1). Instead, it clearly enhanced myoblast fusion. The major change in MCD-treated myoblasts allowed to grow for 72 h (Fig. 1c, d) was the formation of giant multinucleated myotubes, in contrast with the thin shape of control myotubes (Fig. 1a, b). The nuclei of these MCD multinucleated cells were clustered at the cell center (Fig. 1d) and were not aligned in a longitudinal manner as in control myotubes (Fig. 1b). Quantification of the images of day 3 and day 4 MCD-treated myotubes showed that they had significantly ($P < 0.02$) more nuclei than control myotubes (Fig. 1e) and that the total amount of DNA, as measured by DAPI fluorescence, was higher than in control myotubes (for details concerning the symbols, see the legend to Fig. 1e),

292



◀ **Fig. 1** Effect of MCD on myoblast differentiation. **a** Control cultures of myogenic cells grown for 72 h are composed mostly of long thin myotubes (phase contrast). **b** Their nuclei are well aligned at the cell periphery (nuclear dye DAPI). **c, d** Treated myogenic cultures (2 mM MCD for 30 min in 24-h cultures) grown for 72 h have long thick myotubes (**c** phase contrast, **d** DAPI) with centrally located, clustered nuclei. *Bar* 50 μm (**a–d**). **e** Quantification of the images of 72-h and 96-h MCD-myotubes (as in **b, d**) showing that the treated (*squares, treat*) myotubes have significantly ($P < 0.02$) more nuclei than control (*circles, cont*) myotubes (*filled symbols*, left axis), and that the total amount of DNA, as measured by DAPI fluorescence (*i*), is higher in treated myotubes than in control myotubes (*open symbols*, right axis) at the indicated days (**d**). **f** Cholesterol estimation in the culture medium of control (*GM*) and treated (*TM*) cultures (2 mM MCD for 30 min in 24-h cultures), immediately after treatment and in culture medium not added to cultures (*CM*). *Vertical bars* represent the standard deviation.

indicating that cholesterol depletion by MCD induced cell proliferation. In addition, the width of MCD-treated myotubes was also altered (with a mean width \pm SD of $35 \pm 6 \mu\text{m}$ compared with a $10 \pm 2 \mu\text{m}$ width for control myotubes). To confirm that cholesterol had been released into the culture medium of skeletal muscle cells after MCD treatment, we quantified the cholesterol content in the growth media of control and MCD-treated cultures (immediately after MCD treatment). Culture medium from MCD-treated cells (treated medium, *TM*) had more than twice the amount of cholesterol found in the culture medium of control (growth medium, *GM*) cells (Fig. 1f). Culture medium that was not offered to cells (control medium, *CM*) was also used as a control, since most of the cholesterol in the medium would be expected to come from the 10% horse serum and the 0.5% chick embryo extract (Fig. 1f).

The final differentiation step in skeletal myogenesis is the formation of the myofibrils, which form the highly organized contractile apparatus within myotubes. Therefore, using immunofluorescence microscopy, we investigated the distribution of a key sarcomeric protein, α -actinin, in MCD-treated myotubes in order to analyze the presence and structure of myofibrils after cholesterol depletion. Treated myotubes were normally striated, as concluded from the sharp Z-line staining in these cells (Fig. 2e), in a pattern indistinguishable from control 96-h myotubes (Fig. 2b). Desmin intermediate filaments were also analyzed, since they are muscle-specific markers involved in myofibril assembly and cell differentiation. Desmin filaments were similarly distributed throughout the cytoplasm of both control and MCD-treated myotubes (Fig. 2a, d, respectively). The modifications to the nuclei described above and better visualized in Fig. 2c, f are present, even though myofibril organization is normal in MCD-treated myotubes.

Cholesterol is known to be a major component of specialized and highly organized membrane microdomains (Simons and Ikonen 1997). These microdomains can move in the plane of the membrane and participate in many cellular functions, from intracellular vesicle traffic to signal transduction. They have a high content of cholesterol, gangliosides (GM1), sphingolipids, and phospholipids with long saturated fatty acyl chains and are less fluid

than the rest of the membrane (Galbiati et al. 2001). Cholesterol can influence the interaction between lipids and proteins through the increase in the membrane thickness within microdomains. Many proteins have associations with microdomains or are dependent on cholesterol or sphingolipids for their activity, and cells can selectively include or exclude proteins from microdomains (Klein et al. 1995; Mutoh et al. 1995). Many cell surface receptors, glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, and intracellular signaling proteins are concentrated in lipid microdomains (Rothberg et al. 1990), and in this way, myoblast fusion might be expected to be dependent on the integrity of these microdomains. Although there are comparatively few papers on the microdomains of skeletal muscle membrane, one particular type, the caveolae (Anderson 1998), has previously been characterized. These caveolae are part of the dystrophin protein-membrane complexes and thus play a role in human disease (Galbiati et al. 2001). Nevertheless, a direct role for microdomains in skeletal muscle differentiation has not been described. We therefore decided to analyze the distribution of the membrane GM1 ganglioside, which has been used as a membrane microdomain marker, in both control and cholesterol-depleted myogenic cells.

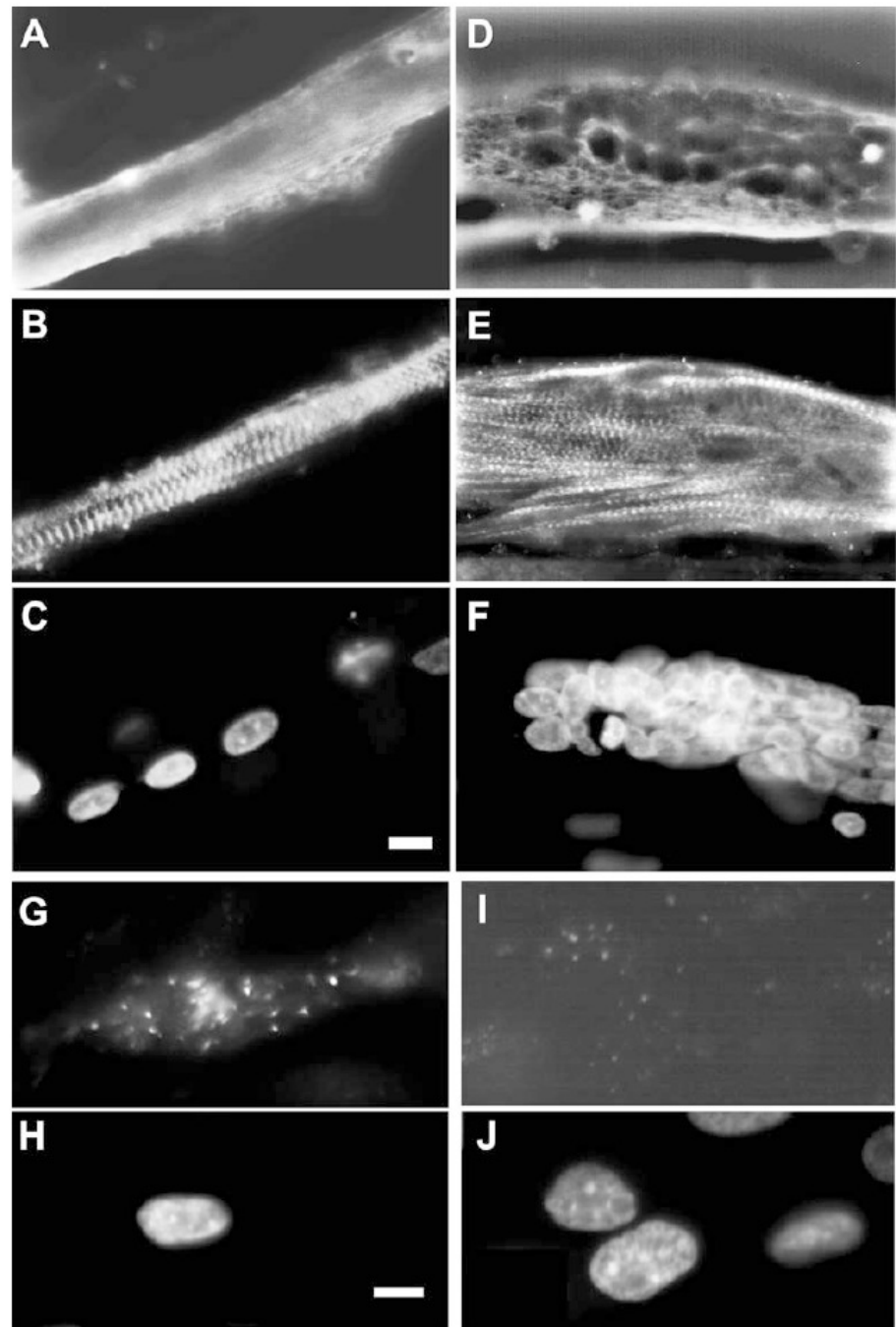
Fluorescently labeled cholera toxin, which specifically binds to GM1, was visualized as clusters in the membrane of control 24-h myoblasts (Fig. 2g), whereas only a few clusters were seen in myoblasts shortly after MCD treatment (Fig. 2i). These results led us to the conclusion that a concentration of 2 mM MCD (for 30 min) was enough to cause either a dispersion or a disappearance of the majority of GM1-containing membrane microdomains in 24-h chick myoblasts. The chemical modifications in GM1 induced by MCD were associated with an increase in myoblast aggregation, as seen by nuclear staining (Fig. 2h, j).

To test whether MCD was effective in other myogenic steps, we treated older cultures (48 h and 72 h) with MCD. At these time points, MCD had no effect on cell shape, cell number, nuclei positioning, or striation pattern compared with control cultures (data not shown). One possible explanation for these results is that myoblasts might be sensitive to cholesterol depletion (by MCD) only when they express specific membrane molecules involved in cell-cell recognition, in a fusion-competent state. After this specific time window, myotubes are formed, adhesion-related molecules are recycled, and fusion is no longer possible. We further tested whether higher concentrations of MCD (4 mM or 8 mM) would have the same effects on myogenic cultures. No significant differences were observed (compared with 2 mM) indicating that 2 mM was sufficient to induce important changes in muscle differentiation in early events while not interfering with cell viability.

The initial steps of skeletal muscle differentiation comprise cell recognition and adhesion in a pre-fusion step. The observed changes in the placement of nuclei and myotube shape induced by MCD could be caused by changes in these early recognition steps. To study these

294

Fig. 2 MCD-treated myotubes assemble normal myofibrils, and MCD-treated myoblasts display few GM1-containing domains in their membranes. Triple-stained myotubes in a 96-h control culture of myogenic cells. Whereas desmin is distributed throughout the myotube cytoplasm (a), sarcomeric α -actinin labels Z-line striations (b). Nuclei are well aligned at the myotube periphery (c). MCD-treated 96-h myotubes show a normal desmin pattern (d), periodic α -actinin Z-line striations (e), and nuclei clustered in the central region (f). *Bar* 10 μm (c). A bipolar 24-h myoblast displays many clustered GM1-containing microdomains marked with fluorescently labeled cholera toxin (g), whereas shortly after MCD treatment, myoblasts have only a few GM1 domains in their membranes (i). Nuclei stained with DAPI (h, j). *Bar* 10 μm (h)



events in cholesterol depleted cells, we focused on the cell adhesion protein, cadherin, and on its intracellularly associated protein, β -catenin, both of which have been implicated in myoblast adhesion and fusion (Goichberg et al. 2001). In cultures 24 h after MCD treatment (Fig. 3a-c), pre-fusion spindle-shaped myoblasts showed many lateral contacts with other cell membranes. In these MCD-treated cells, we observed intense immunolabeling for β -

catenin (Fig. 3b, arrow) and actin filaments (Fig. 3a) in cells that were in close proximity as revealed by the nuclear stain (Fig. 3c). The major difference was clearly the greater number of myoblasts in MCD-treated cultures when compared with 48-h control myoblasts (Fig. 3d, arrow). After 24 h, the associated protein cadherin (Fig. 3h, arrow) notably had the same cell distribution as β -catenin (compare with Fig. 3a) in control cells.

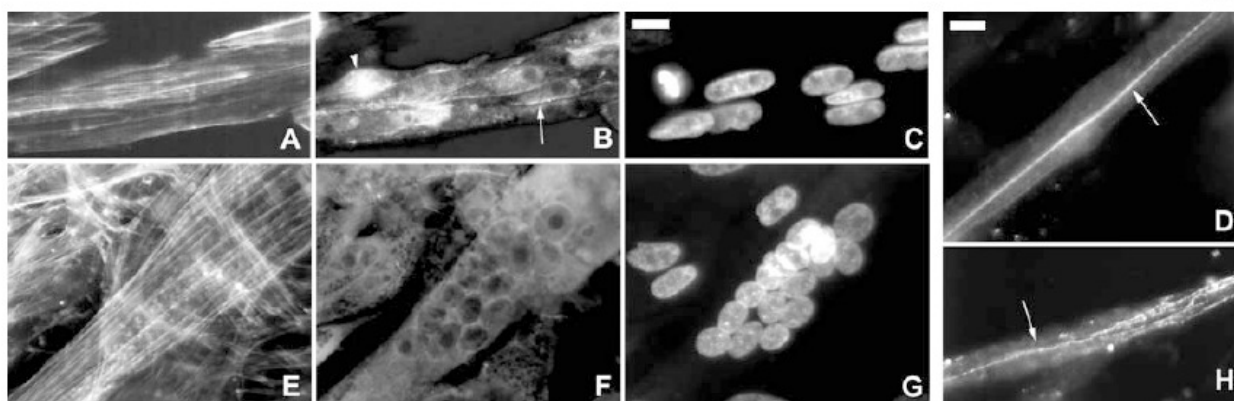


Fig. 3 Cell-adhesion proteins accumulate in MCD-treated myoblasts. In cultures 24 h after MCD treatment, pre-fusion myoblasts show intense immunolabeling for β -catenin (**b arrow-head**), cadherin (**h**), and phalloidin-labeled actin filaments (**a**) in cell-cell contacts (**arrows**), similar to cadherin in 48-h control

myoblasts (**d arrow**). Whereas the nuclei of MCD-treated cultures are in close proximity (**c**), they become tightly packed after fusion (**g**). In cultures 48 h after MCD treatment, myotubes show a more intense F-actin stain (**e**) and weak immunolabeling of β -catenin (**f**). **Bars** 10 μ m (in **c** for **a-c**, and in **d** for **d-h**)

Interestingly, when fusion took place (48 h after MCD treatment), we discerned weak immunolabeling of β -catenin (Fig. 3f), whereas actin filaments remained organized in stress fibers (Fig. 3e), and the nuclei became tightly packed (Fig. 3g). The association of cadherin and β -catenin with cell-cell contacts becomes apparent at the onset of skeletal muscle differentiation, whereas they are down regulated after myoblast fusion, when myotubes are formed (Goichberg et al. 2001). Furthermore, changes in β -catenin/cadherin on the membrane may result from a reduction in cholesterol; this change is a pre-requisite for cell fusion, which is in agreement with our present results.

In order to analyze whether MCD treatment affected an early step in myogenic differentiation, we decided to compare the expression of the muscle marker protein, troponin T, in 48-h control and MCD-treated cells (Fig. 4). Quantitative immunoblotting showed that the expression of troponin T increased two-fold to three-fold (Fig. 4b) in cells treated with 2 mM MCD. In order to test whether MCD had any other observable effects in myoblast cultures besides cholesterol depletion, we treated myogenic cultures, in a separate experiment, with the MCD-cholesterol complex in a 1:10 molar ratio. When saturated with exogenous cholesterol, MCD becomes unable to remove cholesterol from the membranes (Gustavsson et al. 1999). Treatment with the MCD-cholesterol complex produces no significant effect on myogenic cultures (data not shown). These results point to a stimulatory effect of cholesterol depletion in myogenic differentiation and in the enhancement of myoblast fusion.

Given that microtubules undertake an organizational role during muscle differentiation (Tassin et al. 1985) and that MCD-treated myotubes display atypical nuclei localization (Fig. 5b, d, control and MCD-treated, respectively), we decided to examine their microtubules. On α -tubulin immunolabeling, MCD-treated myotubes show a microtubule network running longitudinally along the major axis of the cells (Fig. 5c), with undetectable differences from control myotubes (Fig. 5a). Therefore,

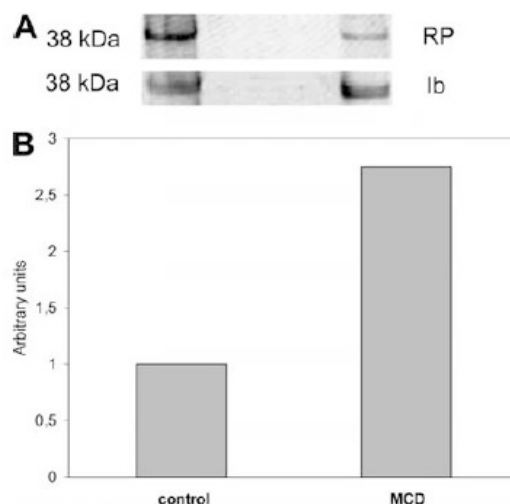


Fig. 4 Cholesterol depletion enhances the differentiation of myoblasts. Myogenic cells cultured for 48 h following the absence or presence of MCD were washed and solubilized in SDS-PAGE lysis buffer. **a** Top Rouge Ponceau (RP) staining of the nitrocellulose membrane containing the transferred proteins. **Bottom** Immunoblotting (Ib) of troponin T (38 kDa). **b** Troponin T expression: the ratio between the densitometric values of 38-kDa RP and Ib, respectively (a representative experiment)

microtubules are not likely to be involved in nuclear displacement during cholesterol depletion of muscle cells.

Taken as a whole, our data demonstrate that cholesterol depletion by MCD increases myogenic differentiation, enhances myoblast fusion, and induces the formation of large multinucleated and striated myotubes with their nuclei being clustered and not aligned at the cell periphery. Microtubule and desmin filament distribution is not altered in MCD-treated myotubes. Cadherin and β -catenin accumulates in cell-cell contacts in MCD-treated myoblasts prior to fusion, with more cells being present in the pre-fusion aggregates. We propose a model whereby MCD-induced nuclear displacement is correlated with the

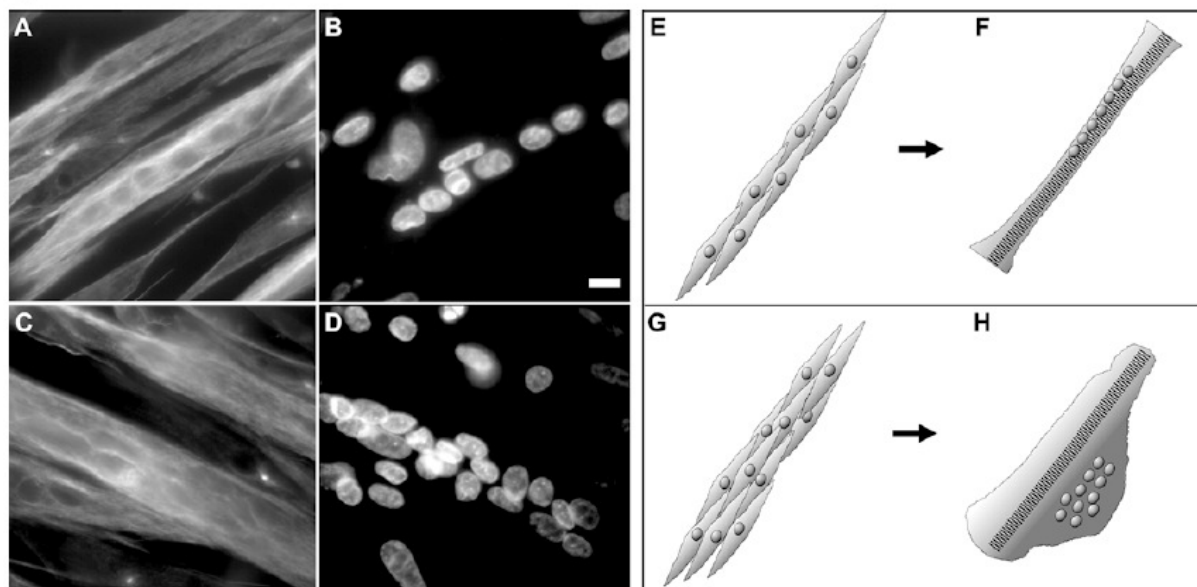


Fig. 5 Organization of microtubules in MCD-treated myotubes and proposed model for the effects of MCD-induced cholesterol depletion in myogenic cells. Microtubules occupy the whole myotube cytoplasm in a longitudinal arrangement in both 72-h control (a) and 72-h MCD-treated (c) myotubes, as shown with anti- α -tubulin antibody. Nuclei are well aligned at the periphery of control myotubes (b) and are clustered in the central region of MCD-treated myotubes (d). Bar 10 μ m (b). Schematically, in

normal myogenesis, bipolar 24-h myoblasts align with each other, guided by recognition between their plasma membranes (e) and fuse over 48 h to form long multinucleated myotubes (f), with sharp striations and aligned nuclei. Myoblasts, 24 h after treatment with MCD display an enhancement of cell adhesion and fusion (g) leading, after 48 h, to the formation of thick well-striated giant multinucleated myotubes with clustered nuclei (h).

formation of larger myoblast aggregates (see Fig. 5e-h). We have also not been able to visualize the membrane microdomain marker GM1 as clusters within the membrane of MCD-treated myoblasts, suggesting that the depletion of cholesterol by MCD alters the distribution and/or structure of myoblast membrane microdomains. One possible explanation is that cholesterol-enriched membrane microdomains restrict myoblast recognition, and that fusion can only occur when the domains are disorganized or internalized, the membrane becomes more fluid, and adhesion molecules (such as cadherins) can form fusion-competent complexes. Previous data showing that a decrease in membrane cholesterol is necessary for myoblast fusion (Sekiya et al. 1984; Hirayama et al. 2001; Nakanishi et al. 2001) are in agreement with our results. The hypothesis of the internalization of cholesterol-enriched microdomains participating in myoblast fusion also corroborates the work of Kalderon and Gilula (1979). Using freeze-fracture electron microscopy, they have observed particle-free regions in myoblast membranes at the fusion sites of myoblasts and have also found vesicles near the intracellular surface of the plasma membrane, which could be a consequence of the internalization of specific membrane regions. We cannot exclude, however, a cooperative influence of increased number of myoblasts in the fusion process as previously proposed (Musaro et al. 1999). Further experiments are necessary in order to understand the role and molecular composition of chole-

sterol-enriched membrane microdomains during the various stages of skeletal muscle differentiation.

References

- Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225
- Bodin S, Giuriato S, Ragab J, Humbel BM, Viala C, Vieu C, Chap H, Payrastré B (2001) Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry* 40:15290-15299
- Comell RB, Nissley SM, Horwitz AF (1980) Cholesterol availability modulates myoblast fusion. *J Cell Biol* 86:820-824
- Courchaine AJ, Miller WH, Stein DB Jr (1959) Rapid semimicro procedure for estimating free and total cholesterol. *Clin Chem* 5:609-614
- Galbiati F, Razani B, Lisanti MP (2001) Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Cell* 106:403-411
- Goichberg P, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger G (2001) Recruitment of β -catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction. *J Cell Sci* 114:1309-1319
- Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, Borg M, Lindroth M, Peterson KH, Magnusson KE, Stralfors P (1999) Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J* 13:1961-1971
- Hirayama E, Sasao N, Yoshimasu S, Kim J (2001) K252a, an indolocarbazole derivative, causes the membrane of myoblasts to enter a fusion-capable state. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1237-1243

- Ilangumaran S, Hoessli DC (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 335:433–440
- Kalderon N, Gilula NB (1979) Membrane events involved in myoblast fusion. *J Cell Biol* 81:411–425
- Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34:13784–13793
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lattanzi G, Ognibene A, Sabatelli P, Capanni C, Toniolo D, Columbaro M, Santi S, Riccio M, Merlini L, Maraldi NM, Squarzone S (2000) Emerin expression at the early stages of myogenic differentiation. *Differentiation* 66:208–217
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Marwali MR, Rey-Ladino J, Dreolini L, Shaw D, Takei F (2003) Membrane cholesterol regulates LFA-1 function and lipid rafts heterogeneity. *Blood* 102:215–222
- McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT (2001) Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13699–13704
- Mermelstein CS, Costa ML, Chagas Filho C, Moura Neto V (1996) Intermediate filament proteins in TPA-treated skeletal muscle cells in culture. *J Muscle Res Cell Motil* 17:199–206
- Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N (1999) IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400:581–585
- Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N (1995) Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5087–5091
- Nakanishi M, Hirayama E, Kim J (2001) Characterization of myogenic cell membrane. II. Dynamic changes in membrane lipids during the differentiation of mouse C2 myoblast cells. *Cell Biol Int* 25:971–979
- Rothberg KG, Ying Y-S, Kamen BA, Anderson GW (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J Cell Biol* 111:2931–2938
- Sekiya T, Takenawa T, Nozawa Y (1984) Reorganization of membrane cholesterol during membrane fusion in myogenesis in vitro: a study using the filipin-cholesterol complex. *Cell Struct Funct* 9:143–155
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572
- Tassin A-M, Maro B, Bornens M (1985) Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol* 100:35–46

Anexo 4: artigo publicado – “A ativação da via de Wnt/beta-catenina e a diferenciação muscular são induzidas após a depleção de colesterol”

Differentiation (2007) 75: 184–192 DOI: 10.1111/j.1432-0436.2006.00129.x © 2006, Copyright the Authors
Journal compilation © 2007, International Society of Differentiation

ORIGINAL ARTICLE

Cláudia S. Mermelstein · Débora M. Portilho ·
Fábio A. Mendes · Manoel L. Costa · José Garcia Abreu

Wnt/ β -catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion

Received February 24, 2006; accepted in revised form September 5, 2006

Abstract Myogenic differentiation is a multistep process that begins with the commitment of mononucleated precursors that withdraw from cell cycle. These myoblasts elongate while aligning to each other, guided by the recognition between their membranes. This step is followed by cell fusion and the formation of long and striated multinucleated myotubes. We have recently shown that cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) induces myogenic differentiation by enhancing myoblast recognition and fusion. Here, we further studied the signaling pathways responsible for early steps of myogenesis. As it is known that Wnt plays a role in muscle differentiation, we used the chemical M β CD to deplete membrane cholesterol and investigate the involvement of the Wnt/ β -catenin pathway during myogenesis. We show that cholesterol depletion promoted a significant increase in expression of β -catenin, its nuclear translocation and activation of the Wnt pathway. Moreover, we show that the activation of the Wnt pathway after cholesterol depletion can be

inhibited by the soluble protein Frzb-1. Our data suggest that membrane cholesterol is involved in Wnt/ β -catenin signaling in the early steps of myogenic differentiation.

Key words Wnt · β -catenin · myogenic differentiation · cholesterol · myogenesis

Introduction

The development of skeletal muscle begins with the emergence of mononucleated muscle precursor cells, which proliferate a number of times before ceasing DNA replication. These myoblasts will then align with each other guided by the recognition between their plasma membranes, and subsequently fuse into multinucleated myotubes. This multistep process is influenced by a number of growth factors and determination factors, such as the proteins of the Wnt pathway that are required for the induction of embryonic myogenesis (Tajbakhsh et al., 1998). The Wnt family of genes encodes for over 20 cysteine-rich secreted glycoproteins that act by binding to seven transmembrane domain frizzled receptors (Fz) on target cells. Wnts mediate their activities through Fz, which in turn activate β -catenin-dependent and/or -independent signaling pathways (Huelsenken and Birchmeier, 2001). β -catenin plays an essential role in the canonical Wnt signaling pathway that regulates many cellular events including differentiation, proliferation, and morphogenesis (Wodarz and Nusse, 1998; Nelson and Nusse, 2004). In the “off state” of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, cells maintain low cytoplasmic and nuclear levels of β -catenin and β -catenin associates with cadherins at the plasma membrane, sparing it from the degradative pathway. Upon Wnt stimulation, β -catenin enters the nucleus and acts in a complex with members of the T cell factor/Lymphoid enhancer factor (TCF/Lef)

Cláudia S. Mermelstein (✉)¹ · Débora M. Portilho¹ · Manoel L. Costa
Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto
Departamento de Histologia e Embriologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, RJ 21949-590, Brazil
Tel: 5521-2562-6429
Fax: 5521-22370844
E-mail: mermelstein@ufrj.br

Fábio A. Mendes · José Garcia Abreu
Laboratório de Embriologia de Vertebrados
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, RJ 21949-590, Brazil

¹C. S. M. and D. M. P. contributed equally to this work.

family of transcription factors to activate target genes (Hectht and Kemler, 2000).

Recently, our group has shown that cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) induces replication and differentiation in chick-cultured myogenic cells (Mermelstein et al., 2005). M β CD is a chemical that selectively removes cholesterol from cell membranes (Ilangumaran and Hoessli, 1998) disorganizing cholesterol-enriched membrane microdomains. In the present work, we further study the effects of cholesterol depletion in the induction of myogenesis. We use M β CD to change the membrane composition and structure to investigate the role of Wnt/ β -catenin signaling associated with cholesterol during the early events of myogenic differentiation. We analyze the expression and distribution of β -catenin as a downstream component of the Wnt pathway. Taken together, the data presented here provide evidence that cholesterol depletion from myoblasts membranes induces the activation of the Wnt signaling pathway, the enhancement of β -catenin expression, and its nuclear translocation. Our data demonstrate that Wnt signaling is involved in the early steps of myogenic differentiation and can be influenced by membrane cholesterol.

Methods

Antibodies and fluorescent probes

DNA-binding probe 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Rabbit polyclonal anti- β -catenin antibody, mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (clone DM 1A), and mouse monoclonal anti- α -sarcomeric actin (clone 5C5) antibodies were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody was purchased from Jackson Immuno Research Labs (West Grove, PA). Peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody were purchased from Promega (Madison, WI).

Primary myogenic cell cultures

All cell culture reagents were purchased from Invitrogen (São Paulo, Brazil). Primary cultures of mononucleated cells were prepared from breast muscles of 11-day-old chick embryos (Mermelstein et al., 2005). Fragments of pectoral muscle were incubated at 37°C for 10 min in calcium–magnesium-free solution containing 0.25% trypsin (Sigma). After removal of the trypsin solution, cells were dispersed by repeated pipetting in cultured medium (minimum essential medium (MEM) with 10% horse serum, 0.5% chick embryo extract, 1% L-glutamine, and 1% penicillin–streptomycin). The resulting suspension was filtered and cells were plated at an initial density of 5×10^5 cells/35 mm culture dishes (Nunc, Copenhagen, Denmark) onto 22 mm-aclar plastic coverslips (Pro-Plastics Inc., Linden, NJ) previously coated with rat tail collagen. Cells were grown under humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C and fed daily with fresh cultured medium.

Cholesterol depletion by M β CD

For cholesterol depletion, cells were treated for 30 min with M β CD (Sigma) at a final concentration of 2 mM in cultured medium after

the first 24 hr of culture (Mermelstein et al., 2005). After M β CD exposure, cultures were washed with cultured medium and grown for the next 3, 24, 48, or 72 hr. These conditions were used in all experiments, except when cells were submitted to plasmid transfection.

Generation of Frzbl-enriched cultured medium

Embryonic human kidney cells (293T) were cultured in DMEM containing 10% fetal calf serum and transiently transfected with 10 μ g of the pcDNA3/Frzb-1 vector kindly provided by Dr. De Robertis (Leyns et al., 1997). Transfection was carried out at 50%–70% cell confluency by a standard calcium phosphate technique according to Pera and De Robertis (2000). Conditioned Frzbl-enriched medium was obtained by culturing the transfected cells in DMEM/F12/Iscove's supplemented with non-essential amino acids for 48 hr after transfection. The Wnt signaling inhibitory activity of Frzb-1 was tested by blocking the luciferase activity of 293 T cell transfected with topFlash and Wnt as described below. M β CD-treated and control myogenic cells (with 24 hr) were grown in the presence of Frzbl-enriched medium for the next 24 hr, when live cultures (control and M β CD-treated) were examined under phase contrast microscopy with an inverted optical microscope Axiovert 100 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), and images were acquired using the same system described below.

Preparation of Triton X-100-soluble and -insoluble protein fractions

Some 24-hr myogenic cultures were treated with M β CD (2 mM for 30 min), washed with cultured medium, and grown for the next 3 hr. Cells (control and M β CD-treated grown for 27 hr) were quickly washed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). To differentiate between Triton X-100-soluble and -insoluble proteins, cells were extracted directly from the culture dishes for 2 min in 50 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid buffer, pH 6.0, containing 0.5% Triton X-100, 2.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 5 mM MgCl₂, in the presence of protein inhibitors (all from Sigma). The Triton-insoluble fraction was scraped off the plate with a rubber policeman in the same volume of the above buffer. Identical aliquots of both fractions were boiled in sample buffer (4% sodium dodecyl sulfate [SDS], 20% glycerol, 0.2 M dithiothreitol, 125 mM Tris-HCl pH 6.8) and subjected to SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis), followed by immunoblotting.

Immunofluorescence microscopy and digital image acquisition

For immunofluorescence microscopy, cultures were rinsed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature (Mermelstein et al., 1996). They were then permeabilized with 0.5% Triton-X 100 in PBS three times for 10 min. The same solution was used for all subsequent washing steps. Cells were incubated with a rabbit polyclonal anti- β -catenin antibody (dilution 1:50 in PBS/0.5% Triton-X 100), for 1 hr at 37°C in a humid chamber. After incubation, cells were washed for 30 min and incubated with TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody for 1 hr at 37°C in a humid chamber, and then washed for 30 min. After a 10-min wash with 0.9% NaCl, DAPI (0.1 μ g/ml in 0.9% NaCl) was added for 5 min. Cells were washed for 5 min with 0.9% NaCl and specimens were mounted in glycerol containing (by weight) 5% *n*-propyl gallate, 0.25% 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane, and 0.0025% para-phenylenediamine (all from Sigma). Cells were examined with an epifluorescence inverted optical microscope Axiovert 100 (Carl Zeiss), using filter sets that were selective for fluorescein, rhodamine, or the blue (UV) wavelength channel. Images were acquired with a C2400i-integrated CCD camera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) using an Argus 20 image processor (Hamamatsu). Digitalized images were transferred to a Dell Optiplex GX270 computer (Dell Corporate, Round Rock, TX) and plates

186

were mounted using Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA). Control experiments with no primary antibodies showed only a faint background staining (data not shown).

Cell transfection and luciferase activity assay

Myogenic cells cultured in a 96-well plate for 24 hr in 80% confluence were transfected with plasmids pGal (for β -galactosidase expression), FOP-Flash (negative control luciferase reporter mutated in the TCF/Lef binding site), and TOP-Flash (luciferase reporter containing the TCF/Lef binding site) using PolyFect Transfection Reagent (Qiagen Inc., Valencia, CA). DNA mixture was maintained at room temperature for 20 min and then diluted in MEM without serum. This mixture was added to cells and maintained for 6 hr at 37°C. After that, MEM with 10% horse serum was added to cells. We used triplicate wells for each experimental condition. 24 hr after transfection, some cells were treated with M β CD. Then, 24 hr later, all cells (control and M β CD-treated) were lysed with lysis buffer (Promega). Luciferase activity was detected by adding the enzyme substrate according to the manufacturer's directions and the samples were read in a Tecan GENios Luminometer (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland). The expression of β -galactosidase activity was measured by adding X-gal to the well and read using a spectrophotometer. In order to normalize the data, the luciferase activity index was calculated by dividing the luciferase value by β -galactosidase. Graphs were plotted in Microsoft Excel 6.0 (Microsoft Informática Ltd., São Paulo, Brazil).

Using the same approach described above, we transiently expressed a luciferase reporter plasmid containing a promoter specifically responsive to Lef-1 (Top-Flash) in 24-hr myogenic cell cultures and then treated some cells with conditioned medium collected from M β CD-treated cultures grown for 3 hr after cholesterol depletion (2 mM M β CD for 30 min in 24-hr cultures), or conditioned medium collected from control (untreated) cultures grown for 27 hr, or an Frzb1-enriched medium. Then, 24 hr later, all cells were lysed with lysis buffer and analyzed as described above.

Immunoblotting of cell extracts

Cultured myogenic cells were quickly washed in ice-cold PBS and 50 μ L of sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0.2 M dithiothreitol, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) was added to the cells. Cell extract was then recovered in a tube, centrifuged, and boiled for 5 min. The amount of protein in each sample was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard, and equal amounts of protein were loaded on the gel. Samples were loaded in 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, São Paulo, Brazil). The proteins immobilized on the membranes were immediately blocked for 1 hr at room temperature with a 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline-Tween 20 solution (0.001%; TBS-T). Then, the membranes were incubated with a rabbit polyclonal anti- β -catenin antibody (dilution 1:1,000 in TBS-T) or with a mouse monoclonal anti- α -sarcomeric actin antibody (dilution 1:1,000 in TBS-T). After five washes in TBS-T (3 min each), the membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse peroxidase-conjugated antibody (Promega, dilution 1:1,000 in TBS-T), washed again as described above and the bands were visualized using the West Pico Pierce kit (Pierce, Rockford, IL). To check sample loading in some experiments, membranes were treated with stripping buffer (2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) for 30 min at 50°C, washed five times in TBS-T and blocked again as described above. Then the membranes were incubated with a mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (dilution 1:3,000 in TBS-T-milk). After five washes in TBS-T (3 min each), membranes were incubated with anti-mouse peroxidase conjugated antibody (Promega, dilution 1:1,000 in TBS-T-milk) and developed as described above.

Results

β -catenin is translocated to nuclei and its expression is increased in cholesterol-depleted myogenic cells

To investigate whether β -catenin is involved in the cellular and molecular mechanisms associated with cholesterol depletion during myogenic differentiation (Mermelstein et al., 2005), we treated 24-hr-cultured primary chick myogenic cells with M β CD (2 mM) during 30 min and allowed cells to grow in fresh medium for the next 3, 24, 48, and 72 hr. First, we used immunofluorescence staining to study the cellular localization of β -catenin in both control and M β CD-treated myogenic cells (Fig. 1). Consistent with previous reports, we found β -catenin in adhesion lines along the membranes of adjacent pre-fusion myoblasts (Goichberg et al., 2001) in the first 48 hr of non-treated cultures (Fig. 1E), as well as in M β CD-treated cells (Fig. 1G) grown for 48 hr (cells were grown for 24 hr, treated with M β CD, and grown for the next 24 hr). Moreover, we detected β -catenin reactivity within the nuclei of cells grown for 27 hr (cells were grown for 24 hr, treated with M β CD, and grown for the next 3 hr; Fig. 1C), as well as in cells grown for 48 hr (cells were grown for 24 hr, treated with M β CD, and grown for the next 24 hr; Fig. 1G). Control myoblasts (grown for 27 hr) also presented β -catenin labeling within their nuclei (Fig. 1A), which is in accordance with Goichberg et al. (2001), who found β -catenin nuclear localization in myoblasts before their differentiation. Notably, we found a 45% enhancement in the number of myoblasts positive for nuclear β -catenin after 3 hr of M β CD treatment (compare Fig. 1A with 1C). β -catenin was detected along the membrane in both control (Fig. 1I) and M β CD treated-multinucleated myotubes (cells were grown for 24 hr, treated with M β CD, and grown for the next 48 hr, Fig. 1K). In control and in M β CD-treated myotubes, no nuclear β -catenin labeling was detected (Figs. 1I, 1K).

We next analyzed the expression of β -catenin in both control and M β CD-treated cells by immunoblot (Fig. 2). M β CD-treated myoblasts cultured for 48 hr expressed higher levels of β -catenin when compared with untreated cells (Fig. 2A). By analyzing the optical density of the β -catenin bands in the Western blots, we estimated a more than twofold increase in β -catenin expression in M β CD-treated myoblasts (Fig. 2B).

These results suggest that cholesterol depletion by M β CD treatment up-regulates β -catenin expression in myogenic-cultured cells.

Enhancement of β -catenin is observed in the membrane and within the nuclei of myogenic cells after cholesterol depletion

To evaluate the proportion of β -catenin present within the nuclei and associated with the membrane (in cad-

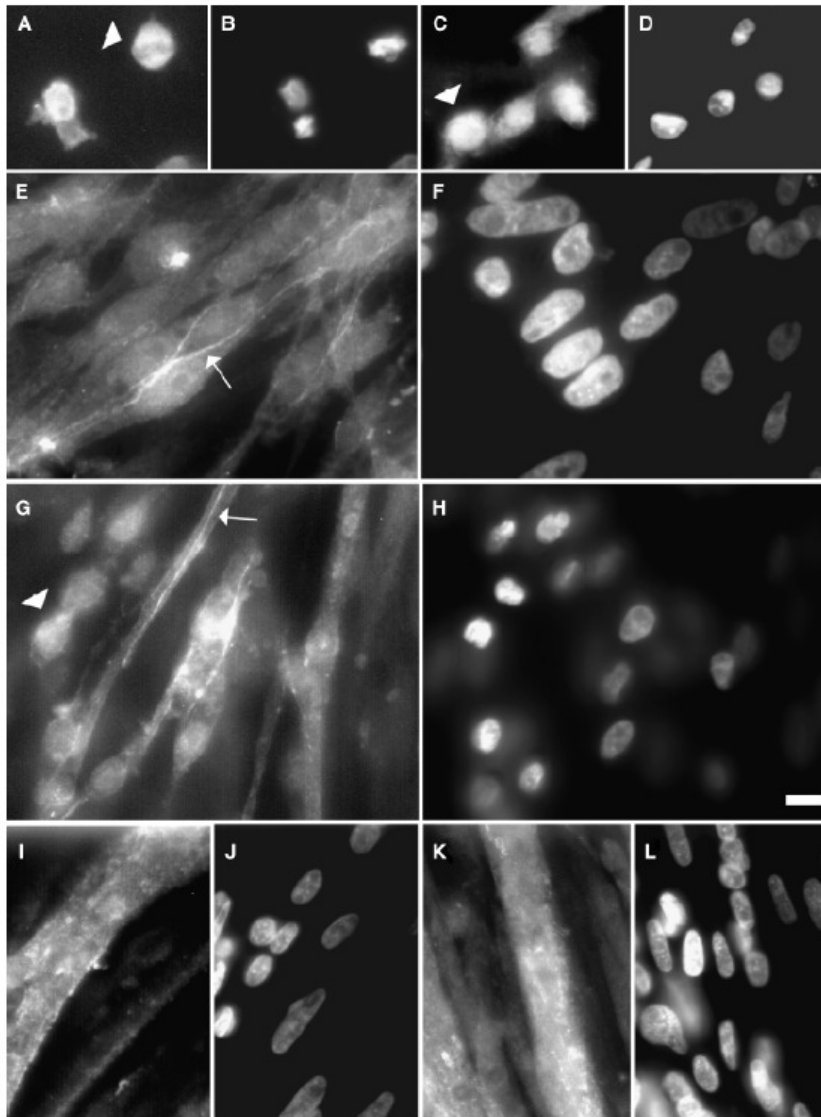


Fig.1 Nuclear translocation of β -catenin in methyl- β -cyclodextrin (M β CD)-treated myogenic cells. Myogenic cultured cells were fixed and double-stained with a rabbit polyclonal anti- β -catenin antibody (A, C, E, G, I, and K) and the DNA-specific probe DAPI (B, D, F, H, J, and L). Control cells were grown for 27 hr (A and B), or 48 hr (E and F), or 72 hr (I and J) before staining. Other cells were grown for 24 hr, treated with M β CD (2 mM) for 30 min, and grown for the next 3 hr (C and D), or 24 hr (G and H), or 48 hr (K and L) before staining. Note the β -catenin distribution in adhesion lines (arrows) along the membranes of adjacent pre-fusion control (E) and M β CD-treated myogenic cells (G), within the nuclei (arrowheads) in control cells (A) and in M β CD-treated cells (C and G). Scale bar represents 10 μ m.

herin-based adhesions) in both control and M β CD-treated cells, we performed a Western blot against β -catenin using Triton X-100-soluble and Triton X-100-insoluble fractions (Fig. 3), according to the description of Goichberg et al. (2001). The presence of β -catenin in a Triton X-100-insoluble fraction suggests that the protein is associated with the cytoskeleton (with cadherin-based adhesions), while the presence of β -catenin in a Triton X-100-soluble fraction suggests that the protein is enriched in the nucleus (cytosolic β -catenin is rapidly degraded in cells). We demonstrated that after M β CD-treatment, β -catenin expression is enhanced in both intracellular compartments: associated with the mem-

brane (in cadherin-based adhesions) and within the nuclei (Figs. 3A,3B). Control cells showed lower amounts of β -catenin in both intracellular compartments (Figs. 3A,3B).

Cholesterol depletion activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in myogenic cells

As our previous results (Figs. 1,3) demonstrated the presence of β -catenin within the nuclei of M β CD-treated myoblasts, we decided to investigate whether this could mean activation of the TCF/Lef responsive

188

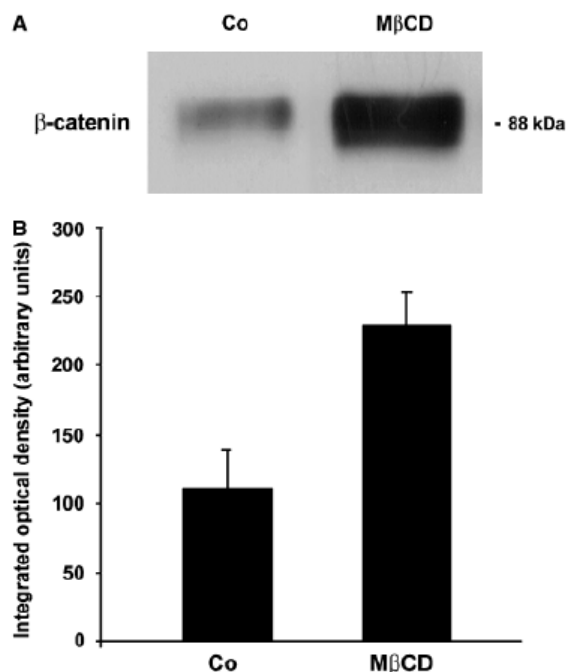


Fig. 2 Expression of β -catenin is enhanced in methyl- β -cyclodextrin (M β CD)-treated myogenic cells. (A) Control myogenic cells (Co) were grown for 48 hr. Other cells were grown for 24 hr, treated with M β CD (2 mM) for 30 min, and grown for the next 24 hr. Both cell culture extracts were analyzed in Western blot using an anti- β -catenin antibody. (B) Extract quantification of M β CD-treated myogenic cells revealed a more than twofold increase in the levels of β -catenin (88 kDa) expression when compared with control cells. Two independent experiments were used for the quantification.

element present in the Wnt/ β -catenin luciferase reporter Top-Flash (Fig. 4). Myoblasts transfected with Top-Flash showed high levels of luciferase activity, in contrast to the low levels of luciferase activity found in a sister culture of myoblasts transfected with Fop-Flash, a reporter that contains a mutation in the TCF/Lef-binding site (Fig. 4). However, luciferase activity was higher when myoblasts transfected with Top-Flash were treated with M β CD (Fig. 4), in contrast to the low levels of luciferase activity found in myoblasts transfected with Fop-Flash and treated with M β CD. These results indicated that M β CD treatment of myoblasts induces the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Cholesterol depletion by M β CD induces Wnt secretion in myogenic cultures

Polesskaya et al. (2003) have shown that Wnt signaling is sufficient to induce the myogenic specification of muscle-derived CD45⁺ stem cells. Thus, we decided to analyze whether cholesterol depletion of myogenic cells was followed by Wnt secretion to the cultured medium. Using the same approach described above, we transi-

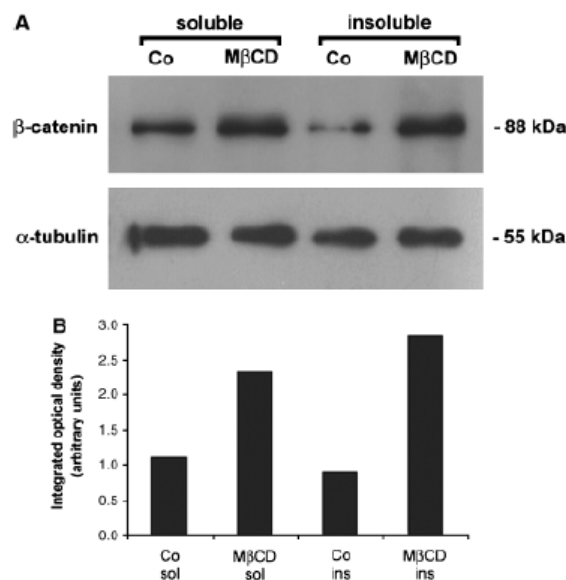


Fig. 3 β -catenin is found in the membrane and within the nuclei of myogenic cells after methyl- β -cyclodextrin (M β CD) treatment. (A) Control myogenic cells (Co) were grown for 27 hr. Other cells were grown for 24 hr, treated with M β CD (2 mM) for 30 min, and grown for the next 3 hr. Triton X-100-soluble and -insoluble protein extracts were treated and analyzed in Western blot using anti- β -catenin antibody (upper blot). The lower Western blot shows α -tubulin (55 kDa) reactivity of the same samples and was used to normalize sample loading. (B) Extract quantification of M β CD-treated myoblast revealed an increase in the levels of β -catenin (88 kDa) expression in both Triton X-100-soluble (nuclei) and -insoluble (membrane) fractions when compared with control cells.

ently expressed a luciferase reporter plasmid containing a promoter specifically responsive to Lef-1 (Top-Flash) and then treated cells with conditioned medium collected from M β CD-treated cultures (grown for 3 hr after cholesterol depletion). Figure 4 shows significant Lef-1-responsive transcription of transfected cultures treated with conditioned medium (Top M β CD+cm). Unexpectedly, we also found significant Top-Flash induction in cultures treated with conditioned medium collected from cultures untreated with M β CD (Fig. 4, Top Co+cm), showing that both control and M β CD-conditioned medium can activate Wnt/ β -catenin signaling. These observations could suggest that cholesterol depletion of myogenic cells induces the secretion of Wnt proteins to the culture medium, but the levels of these proteins might already be high in non-treated myoblast cultures.

Frzb-1 inhibits the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway after cholesterol depletion

In order to further study whether there are more Wnt proteins in the culture medium of M β CD-treated cells, we used the soluble frizzled receptor Frzb-1. Frzb-1 is a

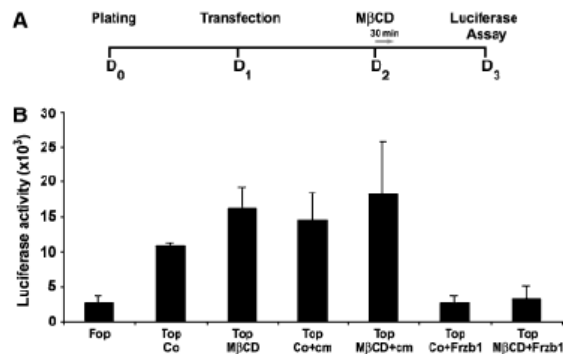


Fig. 4 Wnt signaling is activated in methyl- β -cyclodextrin (M β CD)-treated myogenic cells. Myogenic cultured cells (control and M β CD-treated) were transiently transfected with a luciferase reporter plasmid (Top-Flash). Non-treated myoblasts transfected with Top-Flash showed high levels of luciferase activity (Top Co), whereas M β CD-treated cells exhibit a significantly higher activation of the reporter (Top M β CD). Cells transfected with Top-Flash and grown in conditioned medium collected from M β CD-treated cultures (grown for 3 hr after cholesterol depletion) showed high activation of the reporter (Top M β CD+cm), as well as control Top-Flash-transfected cells grown in conditioned medium collected from non-treated cultures (Top Co+cm). Cells transfected with Top-Flash, treated with M β CD, and grown in Frzb1-enriched medium showed a lower activation of the reporter (Top M β CD+Frzb1), as well as control Top-Flash-transfected cells grown in the same Frzb1-enriched medium (Top Co+Frzb1). The specificity of the effects on the Lef-1 reporter Top-Flash was confirmed using a plasmid Fop-Flash, which contains mutated Lef-1-binding sites (Fop).

secreted protein containing a domain similar to the putative Wnt-binding region of the frizzled family of transmembrane receptors (Leyns et al., 1997). Control and cholesterol-depleted myogenic cells grown for 24 hr were transfected with Top-Flash (as described above) and then treated with an Frzb1-enriched medium for the next 24 hr (Fig. 4). Both cells (control and M β CD-treated), transfected with Top-Flash and treated with Frzb-1-enriched medium, showed very low levels of luciferase activity (Fig. 4), indicating an inhibitory effect of Frzb-1 in the activation of the Wnt pathway after cholesterol depletion. We also observed the effects of the Frzb1-enriched medium in control and M β CD-treated cultures in phase contrast microscopy (Fig. 5). Cholesterol depleted-cells grown in the presence of Frzb-1 (Fig. 5D) showed a morphology (thickness of myotubes) similar to control (non-treated) cells (Figs. 5A,5C), confirming the inhibitory effects of Frzb-1 shown in Figure 4.

Cholesterol-depleted myogenic cells have an increased expression of myogenic differentiation markers

To explore the possibility that activation of the Wnt/ β -catening signaling pathway in cholesterol-depleted

cultures (shown in Fig. 4) induces myogenic differentiation, we examined the expression of a myogenic differentiation marker (α -sarcomeric actin) in both control and M β CD-treated cultures by immunoblotting (Fig. 6). M β CD-treated myoblasts cultured for 48 hr expressed higher levels of α -sarcomeric actin than untreated cells (Fig. 6A). By analyzing the optical density of the protein bands detected in the Western blots, we estimated a 40% increase in α -sarcomeric actin expression in M β CD-treated myoblasts (Fig. 6B). These observations suggest that cholesterol depletion of myogenic cells induces myogenic differentiation.

Discussion

Recently, our group has shown that cholesterol depletion by M β CD induces cell proliferation and myogenic differentiation in chick-cultured muscle cells (Mermelstein et al., 2005). In the present work, we studied the role of Wnt/ β -catenin signaling during myogenic differentiation after cholesterol depletion. The results presented here show that cholesterol depletion by M β CD from primary chick myoblast cultures increases β -catenin expression, its translocation to the nuclei, and activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Furthermore, we observed that M β CD-treated myoblasts increased the expression of the muscle-specific protein α -sarcomeric actin. Our data suggest that a decrease in the amount of sarcolemmal cholesterol could be a regulatory mechanism in the initial myogenic differentiation.

Muscle differentiation is a multistep process that is initiated by signals that cause myogenic commitment and the emergence of muscle precursor cells, which may proliferate a number of times before ceasing DNA replication. After cell cycle arrest, recognition, and alignment of individual myoblasts, these mononucleated cells fuse into multinucleated myotubes. The major molecular signals that induce the myogenic specification and differentiation pathway are mediated by Sonic hedgehog (Borycki et al., 1999) and Wnt molecules. As Wnt signaling has a crucial role in the initiation of myogenesis (Linker et al., 2003) and in myogenic fate determination and differentiation (Cossu and Borello, 1999; Ridgeway et al., 2000; Petropoulos and Skerjanc, 2002), we have focused our experiments on the role of cholesterol depletion in Wnt signaling during myogenesis.

In vitro models such as primary chick myogenic cultures can give rise to a heterogeneous population of cells (Holtzer et al., 1991), composed mainly of multinucleated myotubes expressing muscle-specific structural proteins, spindle-shaped post-mitotic mononucleated myoblasts, replicating presumptive mononucleated myoblasts, quiescent round-shaped mononucleated

190

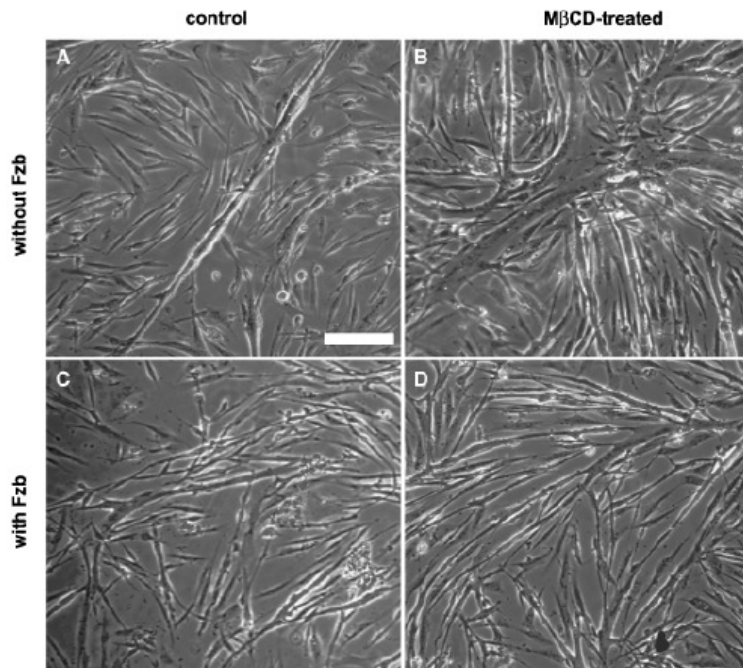


Fig. 5 Frzb-1 inhibits the effects of methyl- β -cyclodextrin (M β CD) treatment in myogenic cell cultures. Control myogenic cells were grown for 48 hr (A), and other cells were grown for 24 hr, treated with M β CD (2 mM) for 30 min, and grown for the next 24 hr (B). Some 24 hr non-treated cultures (C) and M β CD-treated cultures (D) were grown in the presence of an Frzb1-enriched medium for the next 24 hr, and then live cells were analyzed with phase contrast microscopy. Scale bar represents 100 μ m.

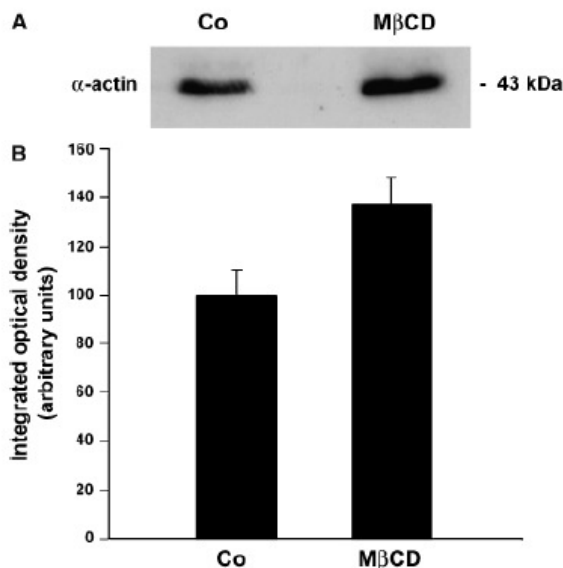


Fig. 6 Expression of α -sarcomeric actin is enhanced in methyl- β -cyclodextrin (M β CD)-treated myogenic cells. (A) Control myogenic cells (Co) were grown for 48 hr. Other cells were grown for 24 hr, treated with M β CD (2 mM) for 30 min, and grown for the next 24 hr. Both cell culture extracts were analyzed in Western blot using anti- α -sarcomeric actin antibody. (B) Extract quantification of M β CD-treated myogenic cells revealed a 40% increase in the levels of α -sarcomeric actin (43 kDa) expression when compared with control cells. Two independent experiments were used for the quantification.

myoblasts, and fibroblastic cells. Quiescent myoblasts retain the ability to be activated and proliferate after specific induction. Recently, we showed an enhancement in cell proliferation and in myogenic differentiation in primary cell cultures treated with M β CD (Mermelstein et al., 2005). Here, we show that M β CD treatment of myoblasts induces the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Cholesterol depletion by M β CD could induce myogenic differentiation of quiescent myoblasts by the activation of the Wnt/ β -catenin pathway. Indeed, we found an enhancement in the number of myoblasts that are positive for nuclear β -catenin after M β CD treatment.

β -catenin is known to function in both cadherin-based adherens junctions, and as a transcriptional regulator, by associating with TCF/Lef factors in the nucleus (Nelson and Nusse, 2004). The presence of β -catenin within the nuclei and at adherens junctions after cholesterol depletion suggests that the protein is acting in both intracellular compartments to induce myogenesis. Petropoulos and Skerjanc (2002) suggested a dual role for β -catenin in myogenesis. First, β -catenin would function in the nucleus to activate transcription during commitment, and second, it would function in complexes with cadherins during differentiation of committed myoblasts (Goichberg et al., 2001).

One major question that arises from our results is how cholesterol depletion could activate the Wnt pathway in myogenic cultured cells. Our present results suggest the possibility that cholesterol depletion by

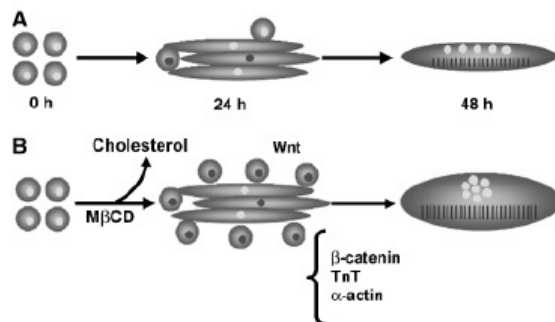


Fig. 7 Schematically, in chick myogenic cultures, round myoblasts change in 24hr into a bipolar morphology and fuse over 48hr to form multinucleated myotubes (A). In the presence of methyl- β -cyclodextrin (M β CD), a higher number of myogenic cells are recruited to the formation of multinucleated myotubes with centrally localized nuclei (B). Our experiments suggest the hypothesis that cholesterol depletion by M β CD enhances the secretion of Wnt molecules from myogenic cultured cells, inducing the activation of the Wnt/ β -catenin pathway. Wnt signaling activates the expression of the downstream component of the Wnt pathway β -catenin and myogenic differentiation markers, such as α -sarcomeric actin and troponin T (TnT; see Mermelstein et al., 2005). Dark nuclei represent the expression of nuclear β -catenin and round cells represent myogenic precursors.

M β CD releases Wnt into the culture medium where it can bind to Fz receptors and activate the Wnt signaling cascade. It is well known that the Wnt signaling cascade is initiated upon the binding of Wnt glycoproteins to a particular class of surface receptors, the Frizzled proteins (Fz). It has been shown that Wnt proteins are post-translationally modified by palmitoylation, increasing its local concentration on membranes (Willert et al., 2003). Further, palmitoylated proteins are frequently targeted to cholesterol-enriched membrane domains (Zhai et al., 2004). Depletion of cholesterol by M β CD changes the membrane composition and structure, disorganizing cholesterol-enriched membrane domains. We can speculate that M β CD treatment could release Wnt to the culture medium, allowing it to bind to Fz receptors present in myogenic cells. Accordingly, we observe an inhibitory effect of Frzb-1 in the activation of the Wnt pathway after cholesterol depletion. However, we could not discard the possibility that an activation of β -catenin could play a role during cholesterol depletion independent of Wnt/Fz binding. It still remains essential to determine which Wnt molecules and Wnt receptors, among the large family of Fz receptors, are involved in the signaling that occurs after cholesterol depletion in myogenic cells.

Based on the data presented above, we propose a model for the molecular and cellular events that leads to myogenesis after cholesterol depletion by M β CD (see Fig. 7). The central message in this model is that cholesterol depletion by M β CD activates the Wnt/ β -catenin signaling cascade in the surrounding quiescent myo-

genic cells, which will then regulate the expression of several genes, including β -catenin and striated muscle-specific differentiation markers, such as α -sarcomeric actin and troponin T (Mermelstein et al., 2005). Myogenic differentiation will terminate with the fusion of mononucleated myoblasts to form large multinucleated myotubes.

In summary, our results unequivocally show that the Wnt/ β -catenin pathway is involved in the early steps of myogenic differentiation and can be regulated by membrane cholesterol. Taken together, the data presented here provide evidence that cholesterol depletion from myoblasts membranes induces the activation of the Wnt signaling pathway, the enhancement of β -catenin expression, and its nuclear translocation, resulting in myoblast recognition and fusion into multinucleated myotubes.

Acknowledgments This work was supported by Brazilian grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and the Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (Pronex). JGA was supported in part by a Cientista do Nosso Estado grant from FAPERJ.

References

- Borycki, A.G., Brunk, B., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., Chiang, C. and Emerson, C.P. Jr. (1999) Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development* 126:4053–4063.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Cossu, G. and Borello, U. (1999) Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J* 18:6867–6872.
- Goichberg, P., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. and Geiger, G. (2001) Recruitment of β -catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction. *J Cell Sci* 114:1309–1319.
- Hectcht, A. and Kemler, R. (2000) Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep* 1:24–28.
- Holtzer, H., Dilullo, C., Costa, M.L., Lu, M., Choi, J., Mermelstein, C.S., Schultheiss, T. and Holtzer, S. (1991) Striated myoblasts and multinucleated myotubes induced in non-muscle cells by MyoD are similar to normal *in vivo* and *in vitro* counterparts. In: Ozawa, E., Masaki, T. and Nabeshima, Y. eds. *Frontiers in muscle research*, Chapter 15. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 187–207.
- Huelsken, J. and Birchmeier, W. (2001) New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11:547–553.
- Ilangumaran, S. and Hoessli, D.C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 335:433–440.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S. and De Robertis, E.M. (1997) Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88:747–756.
- Linker, C., Lesbros, C., Stark, M.R. and Marcelle, C. (2003) Intrinsic signals regulate the initial steps of myogenesis in vertebrates. *Development* 130:4797–4807.

- Mermelstein, C.S., Costa, M.L., Chagas Filho, C. and Moura Neto, V. (1996) Intermediate filament proteins in TPA-treated skeletal muscle cells in culture. *J Muscle Res Cell Motil* 17:199–206.
- Mermelstein, C.S., Portilho, D.M., Medeiros, R.B., Matos, A.R., Einicker-Lamas, M., Tortelote, G.G., Vieyra, A. and Costa, M.L. (2005) Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei. *Cell Tissue Res* 319:289–297.
- Nelson, W.J. and Nusse, R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483–1487.
- Pera, E.M. and De Robertis, E.M. (2000) A direct screen for secreted proteins in *Xenopus* embryos identifies distinct activities for the Wnt antagonists Crescent and Frzb-1. *Mech Dev* 96:183–195.
- Petropoulos, H. and Skerjanc, I.S. (2002) Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J Biol Chem* 277:15393–15399.
- Polesskaya, A., Seale, P. and Rudnicki, M.A. (2003) Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45⁺ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113:841–852.
- Ridgeway, A.G., Petropoulos, H., Wilton, S. and Skerjanc, I.S. (2000) Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. *J Biol Chem* 275:32398–32405.
- Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M. and Cossu, G. (1998) Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* 125:4155–4162.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates III, J.R. and Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423:448–452.
- Wodarz, A. and Nusse, R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59–88.
- Zhai, L., Chaturvedi, D. and Cumberledge, S. (2004) *Drosophila* wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *J Biol Chem* 279:33220–33227.

Anexo 5: artigo publicado – “Uma forma solúvel e ativa da proteína Wnt3a está envolvida na diferenciação muscular após a depleção de colesterol”

O colesterol é um dos principais componentes lipídicos das membranas plasmáticas. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a depleção de colesterol pela metil-beta-ciclodextrina (MCD) induz a ativação da via de Wnt/ β -catenina e aumenta a diferenciação muscular esquelética (Mermelstein et al., 2007). Decidimos então, investigar se moléculas solúveis presentes nos meios condicionados das culturas miogênicas estavam envolvidas nestes eventos celulares. Neste trabalho, observamos que o meio condicionado proveniente de uma cultura tratada com a MCD (meio condicionado MCD) acelera a miogênese de uma forma semelhante ao tratamento com MCD, sugerindo que os efeitos induzidos após a depleção de colesterol podem ser causados por fatores solúveis presentes no meio de cultura. Além disso, verificamos que a proteína Wnt-3a em uma forma solúvel e ativa está significativamente aumentada no meio condicionado MCD. O tratamento de culturas-controle com o meio enriquecido com Wnt3a induz a diferenciação muscular, assim como o tratamento com a MCD. Entretanto, o meio enriquecido com a proteína Wnt5a inibe drasticamente a fusão de mioblastos. Esses resultados sugerem que a proteína Wnt3a está envolvida com a indução da miogênese observada após a depleção de colesterol.

A soluble and active form of Wnt-3a protein is involved in myogenic differentiation after cholesterol depletion

Débora M. Portilho, Eliane R. Martins, Manoel L. Costa, Cláudia S. Mermelstein*

Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21949-590, Brazil

Received 9 November 2007; accepted 15 November 2007

Available online 26 November 2007

Edited by Lukas Huber

Abstract Cholesterol is one of the major lipids of plasma membranes. Recently, we have shown that cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) induces the activation of the Wnt/ β -catenin pathway and enhances myogenic differentiation. Here, we show that M β CD-conditioned media accelerates myogenesis in a similar way as M β CD does, suggesting that the effects induced by M β CD could be caused by soluble factors present in the culture medium. Soluble Wnt-3 protein is significantly enhanced in M β CD-conditioned medium. Wnt-3a-enriched media induces myogenesis as much as M β CD does, whereas Wnt-5a-enriched media inhibits. We suggest that Wnt-3a is involved in the myogenic induction observed after cholesterol depletion.

© 2007 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Wnt; Myogenic differentiation; Cholesterol; Myogenesis; Cyclodextrin

1. Introduction

The Wnt proteins are a highly conserved group of secreted proteins that are involved in a variety of developmental processes, such as cell differentiation, proliferation, and/or signaling. Currently in vertebrates there are 19 known Wnt genes, that can be divided into the β -catenin dependent (the canonical pathway) and the β -catenin independent pathways (the planar cell polarity and the Ca²⁺ pathway). In the most well-understood β -catenin pathway, the binding of Wnt proteins to its cell surface receptor, which consists of Frizzled (Fz) and low-density-lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6), induces the stabilization of β -catenin and its entry into the nucleus where it acts in a complex with members of the TCF/Lef (T cell factor/Lymphoid enhancer factor) family of transcription factors to activate target genes [1].

Wnt proteins are one of the main signaling molecules required to activate myogenesis [2]. Members of the Wnt family produced by the dorsal neural tube are required to fully activate and stabilize the myogenic program in the dorsal part of the somite [3]. Wnt-1 and Wnt-3a signalings regulate the formation of the medial compartment of the dermomyotome

and the early part of myogenesis [4]. Furthermore, Galli and colleagues [5] have shown that ectopic expression of Wnt-3a throughout the right half of the neural tube by electroporation causes a dramatic enlargement of the myotome 48 h post-electroporation. Wnt family members are able to induce the expression of muscle markers including MyoD, myogenin and myosin heavy chain [6]. In addition, overexpression of the Wnt antagonist Frzb-1 blocks myogenic differentiation in mouse somites [7].

In order to act in myogenesis, and in other developmental processes, Wnt molecules must diffuse through the aqueous extracellular environment. Although Wnts are secreted proteins, it has been difficult to purify active and soluble Wnt molecules. It is possible to purify Wnt-3a and Wnt-5a from conditioned medium. Purified Wnt-3a protein stabilizes β -catenin [8] while purified Wnt-5a protein inhibits the transcriptional activity of TCF/Lef [9]. One of the reasons for the difficulty of purifying Wnts is their insolubility due to their hydrophobicity [8]. Wnt-3a and Wnt-5a are palmitoylated. Palmitoylation is not essential for their secretion but is important for the actions of these Wnts [10]. Furthermore, palmitoylated proteins are frequently targeted to cholesterol-enriched membrane domains [11]. Thus, one important question that arises is whether depletion of membrane cholesterol could alter Wnt availability.

Recently, our group has shown that cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) induces proliferation and differentiation in chick-cultured myogenic cells [12], and that the Wnt/ β -catenin pathway is involved in these events [13]. Here, we show that soluble Wnt-3 protein is significantly enhanced in M β CD-conditioned medium. The data here presented suggest that Wnt-3a molecules play a role in the myogenic induction observed after cholesterol depletion by M β CD in cultured cells.

2. Materials and methods

2.1. Primary cell cultures

Primary cultures of myogenic cells were prepared from breast muscles of 11-day-old chick embryos [12]. Cells were grown with 8–1–0.5 cultured medium (MEM with 10% horse serum, 0.5% chick embryo extract, 1% L-glutamine and 1% penicillin–streptomycin) at an initial density of 5×10^5 cells/35 mm culture dishes onto 22 mm-diameter plastic coverslips (Pro-Plastics Inc., USA) previously coated with rat tail collagen. Cells were grown under humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were treated for 30 minutes with methyl- β -cyclodextrin (M β CD; Sigma) at a final concentration of 2 mM after the first 24 h of culture. After M β CD exposure, cultures were washed with cultured medium and grown for the next 3, 24, 48 or 72 h.

*Corresponding author. Fax: +55 21 22370844.

E-mail address: mermelstein@ufrj.br (C.S. Mermelstein).

Primary cultures of fibroblasts were prepared from the layer of connective tissue that covers the breast muscles of 11-day-old chick embryos. Subconfluent fibroblastic cultures were used after four trypsinization passages in order to get rid of myogenic cells. Ninety-five percent of these cultures are represented by fibroblasts (desmin negative cells) and only 5% of cultures are represented by myogenic cells (desmin positive cells).

2.2. Generation of *Frzb1*-enriched cultured medium

Embryonic human kidney cells (293T) were cultured in DMEM containing 10% FCS and transiently transfected with 10 μ g of the pcDNA3/*Frzb-1* vector kindly provided by Dr. De Robertis [14]. Transfection was carried out at 50–70% cell confluency by standard calcium phosphate technique. Conditioned *Frzb1*-enriched medium was obtained by culturing the transfected cells in DMEM/F12/Iscove's supplemented with non-essential amino acids for 48 h after transfection. The Wnt signaling inhibitory activity of *Frzb-1* was tested by blocking luciferase activity of 293T cell transfected with topFlash and Wnt [13]. M β CD-treated and control myogenic cells (with 24 h) were grown in the presence of *Frzb1*-enriched medium for the next 24 h, when immunofluorescence microscopy of cultures (control and M β CD-treated) was carried out.

2.3. Immunofluorescence microscopy and digital image acquisition

Cultures were rinsed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. They were then permeabilized with 0.5% Triton-X 100 in PBS three times for 10 min. The same solution was used for all subsequent washing steps. Cells were incubated with primary antibodies for 1 h at 37 °C. After incubation, cells were washed for 30 min and incubated with FITC- or TRITC-conjugated secondary antibodies for 1 h at 37 °C. Nuclei were labeled with DAPI (0.1 μ g/mL in 0.9% NaCl). Cells were examined with an Axiovert 100

microscope (Carl Zeiss, Germany) and images were acquired with a C2400i integrated CCD camera using an Argus 20 image processor (Hamamatsu Photonics, Japan).

2.4. Immunoprecipitation assay

Conditioned-medium collected from 24 h non-treated cultures (1 mL) and conditioned-medium collected from 24 h M β CD-treated cultures (1 mL) were incubated overnight at 4 °C with 10 μ l of a specific rabbit polyclonal anti-Wnt-3 antibody (Zimed, epitope-affinity purified). After, the samples were incubated for 1 hour at 4 °C with 50 μ l of protein A-Sepharose CL-4B (Sigma, pH 7.4), gently mixing the sample with a shaker. Immunoprecipitated complexes were collected by centrifugation at 3000 \times g for 2 min at 4 °C. Supernatants were discarded and pellets were extensive washed with 20 mM HEPES buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 and 10% glycerol. Samples were heated at 95 °C for 5 min and centrifuged for 30 s at 12000 \times g at room temperature. Supernatants (IP samples) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Blots were then probed with the anti-Wnt-3 antibody.

2.5. Immunoblotting of cells extracts

Cultured myogenic cells were quickly washed in ice-cold PBS and 50 μ l of sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0.2 M dithiothreitol, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) were added to the cells and boiled for 5 min. The amount of protein in each sample was determined according to Bradford [15], using bovine serum albumin as a standard, and equal amounts of protein were loaded on the gel. Samples were loaded in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [16]. Proteins were transferred to PVDF membranes. The proteins immobilized on the membranes were immediately blocked for 1 h at room temperature with a 5% non-fat dry milk in Tris buffered saline-Tween 20 solution (0.001%) (TBS-T). Then the membranes were incubated with either a

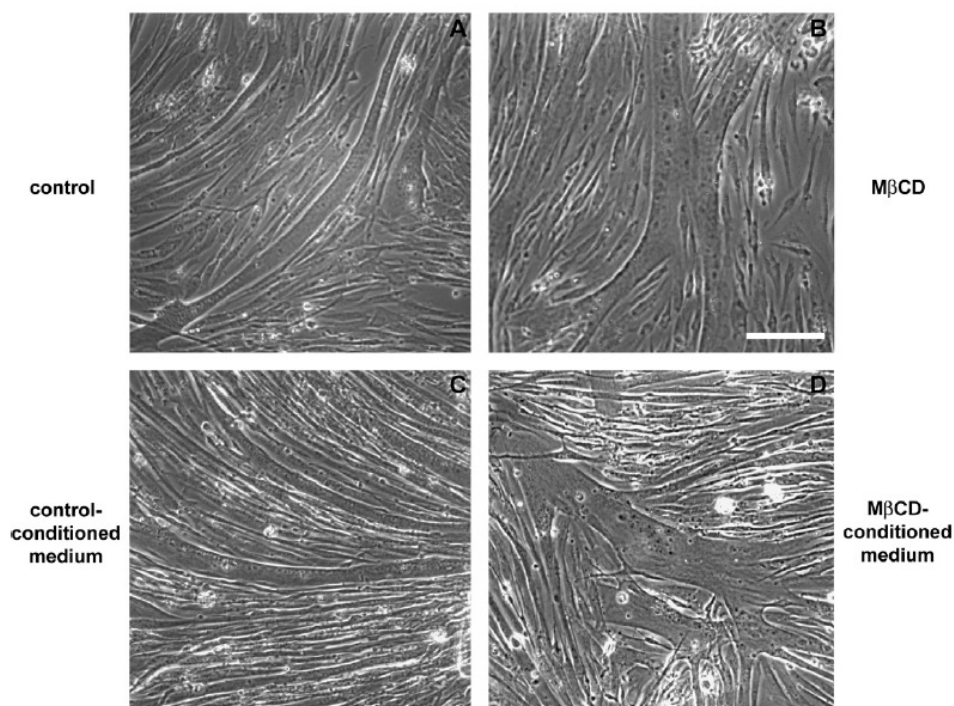


Fig. 1. M β CD-conditioned medium induces myogenic differentiation. Control myogenic cells were grown for 72 h (A), and other myogenic cells were grown for 24 h, treated with M β CD for 30 min and grown for the next 48 h (B). Some control cultures were grown in the presence of a control-conditioned-medium (C). Other control cultures were grown in the presence of a M β CD-conditioned-medium (D). Live cells were analyzed under phase contrast microscopy. Scale bar (A–D) represents 100 μ m.

rabbit polyclonal anti-Wnt-3 antibody (Zimed) or a mouse monoclonal anti-M-cadherin antibody (BD Transduction). After five washes in TBS-T (3 min each), the membranes were incubated with either an anti-rabbit or an anti-mouse peroxidase conjugated antibodies (Amersham, dilution 1:7000 in TBS-T), washed again as described above and the bands were visualized using the ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham). To check sample loading, membranes were treated with stripping buffer (2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7) for 30 min at 50 °C, washed five times in TBS-T and blocked again as described above. Then the membranes were incubated with a mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (Sigma, dilution 1:3000 in TBS-T-milk). After five washes in TBS-T (3 min each), membranes were incubated with anti-mouse peroxidase conjugated antibody (Amersham, dilution 1:7000 in TBS-T) and developed as described above.

3. Results and discussion

3.1. M β CD-conditioned medium induces myogenic differentiation

We have previously shown that cholesterol depletion by M β CD induces myogenic proliferation and differentiation [12], and that the Wnt/ β -catenin pathway is involved in these events [13]. To investigate whether the cellular effects induced by M β CD were caused by soluble factors present in the culture medium, we decided to analyze the effects of conditioned media collected from myogenic cultures treated or untreated with M β CD (Fig. 1). Myogenic cells grown with a M β CD-conditioned medium show an enhancement in muscular differentiation (Fig. 1B and D) in a similar way as M β CD does by itself,

suggesting that the effects induced by M β CD could be caused by soluble factors present in the culture medium.

3.2. 30–50 kDa-soluble factors from M β CD-treated cultured cells induce myogenic differentiation

To determine the molecular mass of the soluble factors that cause myogenic differentiation, we analyzed the effects of filtered conditioned media collected from myogenic cultures treated or untreated with M β CD (Fig. 2). We employed Centricon centrifugal filter devices (Millipore, USA) that can be used for filtration of substances with molecular weight below the nominal molecular weight limit of the filters. A Centricon YM-30 device filters substances with molecular weight below 30 kDa and a YM-50 device filters substances with molecular weight below 50 kDa. Conditioned-medium collected from both untreated and M β CD-treated cultures and passed through a Centricon YM-50 induced myogenic differentiation (Fig. 2C and D), as opposed to conditioned-medium collected from both untreated and M β CD-treated cultures and passed through a Centricon YM-30, which inhibited myogenic differentiation (Fig. 2A and B). We found that culture media containing only molecules with a molecular weight lower than 30 kDa do not allow *in vitro* myoblast differentiation. Molecules with a molecular weight above 30 kDa are required for chick myogenic differentiation. Interestingly, conditioned-medium collected from M β CD-treated cultures and passed through an YM-50 filter induced the formation of thicker myotubes (Fig. 2D) when compared with myotubes grown

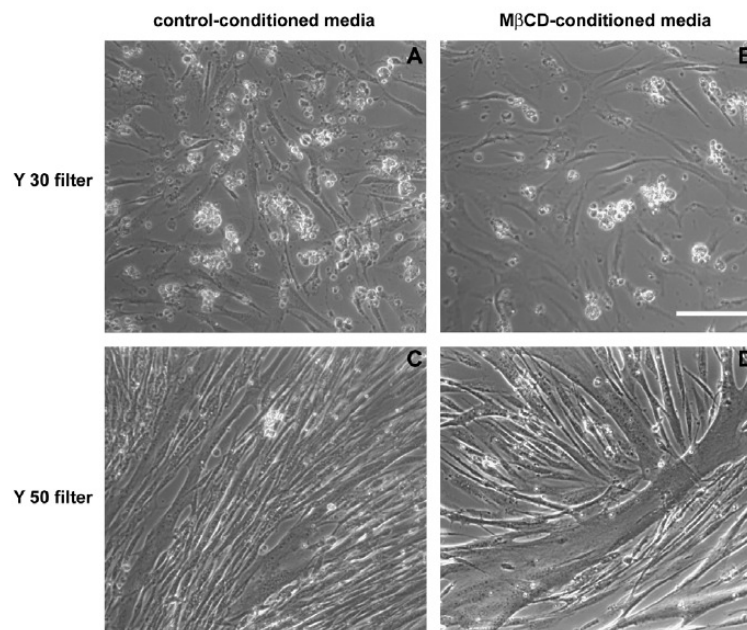


Fig. 2. 30–50 kDa-soluble factors from M β CD-treated cultured cells induce myogenic differentiation. Control myogenic cells (grown for 24 h) were grown for the next 48 h with either an YM-30 filtered conditioned-medium collected from 24 h control-cultures (A) or with an YM-30 filtered conditioned-medium collected from 24 h M β CD-treated cultures (B). Other 24 h non-treated cultures were grown for the next 48 h with either an YM-50 filtered conditioned-medium collected from 24 h control-cultures (C) or with an YM-50 filtered conditioned-medium collected from 24 h M β CD-treated cultures (D). Live cells were analyzed under phase contrast microscopy. Scale bar (A–D) represents 100 μ m.

with medium collected from untreated cultures and passed through a YM-50 filter (Fig. 2C). These observations suggest that the myogenic inducer-soluble factors present in M β CD-conditioned media have a molecular weight within the range of 30–50 kDa.

3.3. Wnt-3a, but not Wnt-5a, induces *in vitro* chick myogenic differentiation

Wnt molecules have been reported to be involved in muscle differentiation [2] and the predicted primary translation products of Wnt genes are all relatively small, putative glycoproteins of 38–43 kDa, which is within the range of the molecular weight (30–50 kDa) that we found for the myogenic

inducer-soluble factors found in cholesterol depleted cultures. Therefore, we decided to investigate whether the effects of cholesterol depletion by M β CD were related to the presence of two Wnt molecules that have been implicated in myogenesis: Wnt-3a and Wnt-5a. To test this hypothesis, we grew myogenic cells in the presence of Wnt-3a- or Wnt-5a-enriched media. Fig. 3C shows that Wnt-3a-enriched medium induces the formation of thicker myotubes in myogenic cultures, as compared to the control cells (Fig. 3A). The induction of myogenic differentiation by a Wnt-3a-enriched medium was similar to the M β CD effects (Fig. 3B). These observations suggest that Wnt-3a molecules could be candidates for the myogenic induction observed after cholesterol depletion by M β CD in cultured

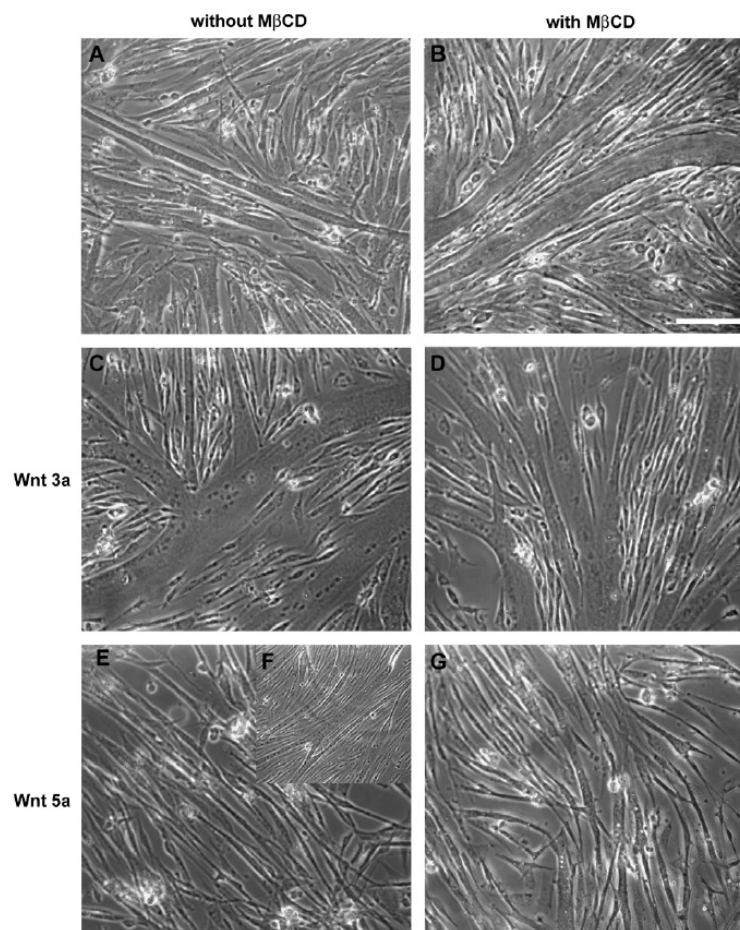


Fig. 3. Wnt-3a, but not Wnt-5a, induces *in vitro* chick myogenic differentiation. Control myogenic cells were grown for 72 h (A), and other myogenic cells were grown for 24 h, treated with M β CD for 30 min and grown for the next 48 h (B). Some control cultures were grown either in the presence of a Wnt-3a-enriched medium for the next 48 h (C) or in the presence of a Wnt-5a-enriched medium for the next 48 h (E). M β CD-treated myogenic cells (24 h) were grown either in the presence of a Wnt-3a-enriched medium for the next 48 h (D) or in the presence of a Wnt-5a-enriched medium for the next 48 h (G). Other control 24 h myogenic cells were grown in the presence of a medium collected from mock-transfected cells for the next 48 h (F). Live cells were analyzed under phase contrast microscopy. Scale bar (A–G) represents 100 μ m.

cells. In contrast, myogenic cultures grown in the presence of Wnt-5a-enriched medium showed an inhibitory myogenic effect, as observed by the presence of thinner myotubes (Fig. 3E). Treatment of myogenic cultures with M β CD and either Wnt-3a or Wnt-5a (Fig. 3D and G) did not show significant differences (as shown also in Fig. 6).

Myogenic differentiation results in the formation of multinucleated myotubes. Thus, to further characterize the induction

of differentiation observed in the previous experiments (Figs. 1–3), cells were double stained with the terminal differentiation marker sarcomeric α -actinin (Sigma) and with the nuclear dye DAPI (Molecular Probes). The level of organization of a sarcomeric protein is an indicator of myogenic differentiation, since the contractile apparatus must be maintained with almost crystalline order for its efficient function [17]. Figs. 4 and 5 show a periodic α -actinin staining in Z-lines of untreated (Figs.

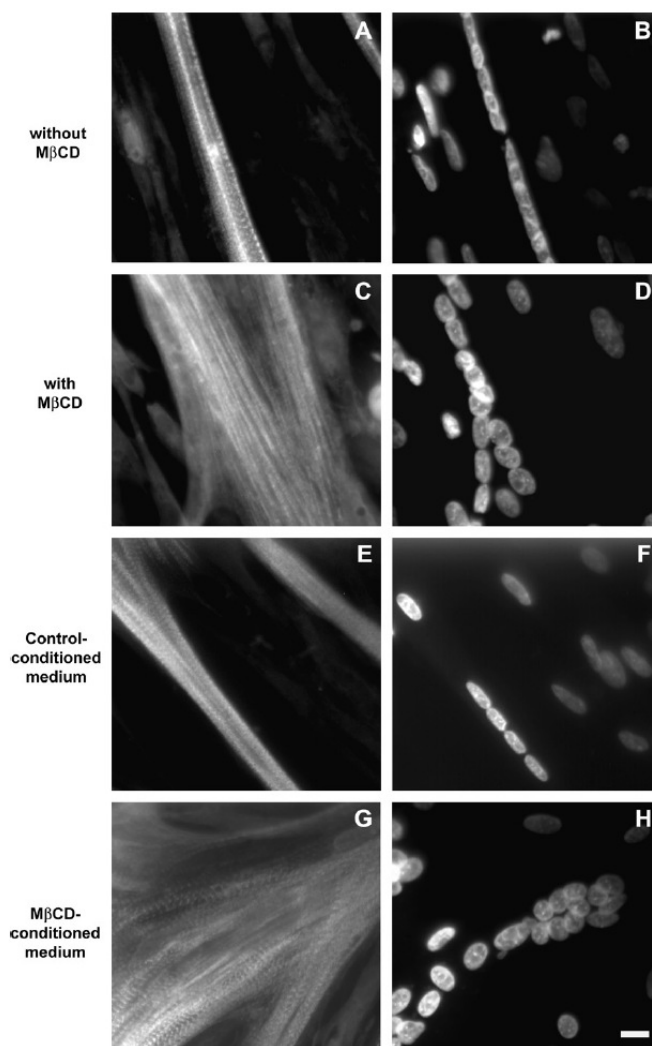


Fig. 4. M β CD-conditioned medium can induce fully differentiated and striated myotubes. Control myogenic cells were grown for 72 h (A and B), and other myogenic cells were grown for 24 h, treated with M β CD for 30 min and grown for the next 48 h (C and D). Some control cultures were grown in the presence of a control-conditioned-medium (E and F). Other control cultures were grown in the presence of a M β CD-conditioned-medium (G and H). Cells were double-stained with an anti-sarcomeric α -actinin antibody (A, C, E and G) and DAPI (B, D, F and H). Note the sarcomeric α -actinin distribution in Z-lines along sarcomeres. Scale bar (A–H) represents 10 μ m.

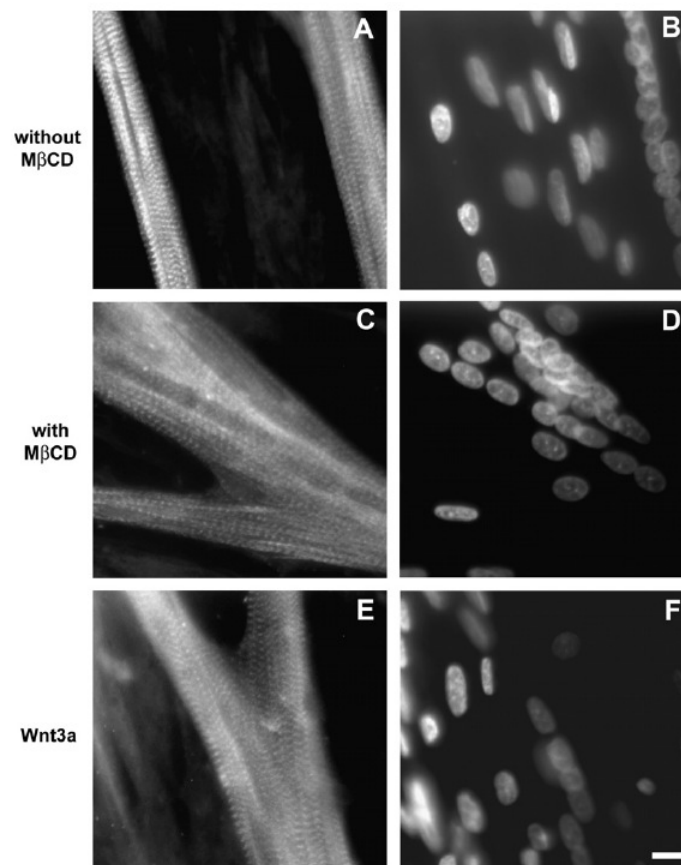


Fig. 5. M β CD and Wnt-3a can both induce fully differentiated and striated myotubes. Treated and untreated myogenic cultured cells were double-stained with an anti-sarcomeric α -actinin antibody (A, C and E) and DAPI (B, D and F). Note the sarcomeric α -actinin distribution in Z-lines along sarcomeres. Scale bar (A–F) represents 10 μ m.

4A and 5A), M β CD-treated (Figs. 4C and 5C), control-conditioned medium (Fig. 4E), M β CD-conditioned medium (Fig. 4G), and Wnt-3a-treated myotubes (Fig. 5E).

Although a significant increase in the number of myofibrils per myotube was evident in M β CD-treated (Figs. 4C and 5C) and Wnt-3a-treated myotubes (Fig. 5E), no differences were found in the α -actinin staining pattern (in sarcomeric Z-lines) between the different conditions (Figs. 4 and 5). These results show that M β CD, M β CD-conditioned medium and Wnt-3a enhances myogenesis by the induction of mature striated myotubes.

Other cell treatments were also labeled with an anti- α -actinin antibody and DAPI. We counted the number of nuclei per myotube (fusion index) in control (untreated) cultures and in cells treated with: M β CD, or control conditioned-medium, or M β CD conditioned-medium, or YM-50 filtered conditioned-medium collected from either 24 h control cultures or 24 h M β CD-treated cultures, or Wnt-3a-enriched medium, or Wnt-5a-enriched medium. Fig. 6 illustrates that control (untreated) cells had 10 ± 2 nuclei per myotube. In contrast, M β CD-treated cultures had 30 ± 3 nuclei per myotube, cul-

tures treated with M β CD conditioned-medium had 32 ± 3 nuclei per myotube, and Wnt-3a-treated cultures had 28 ± 2 nuclei per myotube. Statistical analysis showed significant differences ($P < 0.05$; ANOVA on ranks with Dunn's post hoc test versus control group; $n = 50$) in fusion index between control and cultures treated with M β CD, M β CD conditioned-medium, M β CD conditioned-medium filtered with YM-50, and Wnt-3a-enriched medium (with or without M β CD).

3.4. M β CD-induced effects are not related to fibroblastic cells

Primary skeletal muscle cultures contain fibroblastic cells and myogenic cells. In order to analyze whether M β CD may act on fibroblasts rather than directly on myoblasts, we prepared primary fibroblastic cultures. Some quaternary fibroblastic cells were treated with M β CD (2 mM) for 30 min and conditioned media were collected from both untreated and M β CD-treated cultures and added to myogenic cultures. Neither of the fibroblastic-conditioned media (untreated and M β CD-treated) significantly induced myogenesis, as noted by the number of nuclei per myotube (fusion index) in each treatment (Fig. 6).

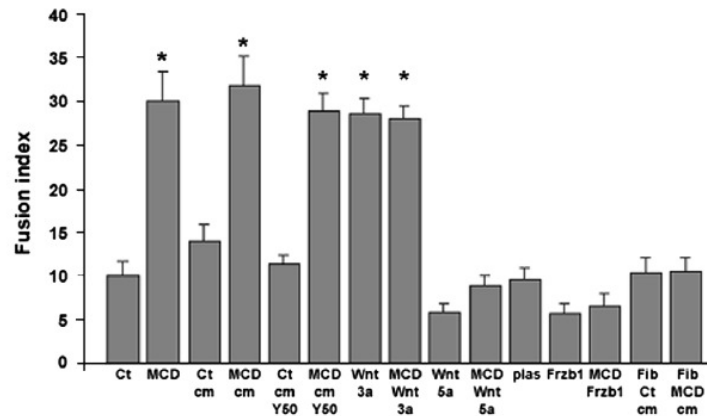


Fig. 6. Fusion index of chick myogenic cells grown in different culture conditions. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with DAPI and anti-sarcomeric α -actinin antibody. The number of nuclei per myotube (fusion index) was recorded in control (untreated) cultures and in treated cells. At least 50 myotubes for each culture condition were scored. (* $P < 0.05$; ANOVA on Ranks with Dunn's Post Hoc test versus control group; $n = 50$). Ct = control, cm = conditioned medium, plas = mock transfection, Fib = fibroblast.

3.5. *Frzb-1* inhibits the myogenic differentiation induced by methyl- β -cyclodextrin (M β CD)

Frzb-1 is a secreted protein containing a domain similar to the putative Wnt-binding domain region of the frizzled family of transmembrane receptors [14]. To test whether there are

Wnt proteins in the culture medium of cholesterol depleted-cells, we cultured myogenic cells (untreated or treated with M β CD) in the presence or absence of Frzb-1-enriched medium (Fig. 7). Cells were stained with DAPI and anti-desmin antibody (Sigma). Figs. 6 and 7 show that Frzb-1-enriched

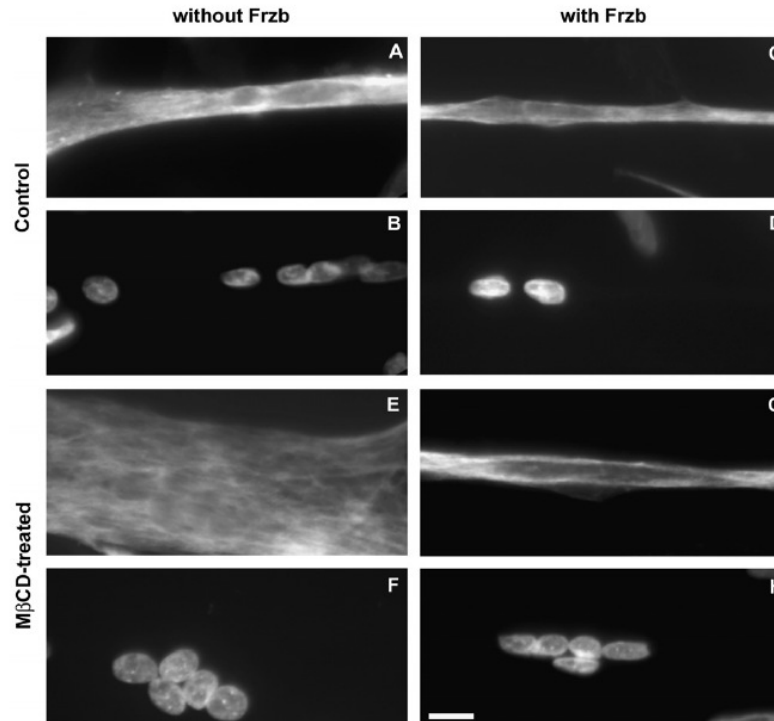


Fig. 7. Frzb-1 inhibits the myogenic differentiation induced by M β CD. Myogenic cultured cells were double-stained with an anti-desmin antibody (A, C, E and G) and DAPI (B, D, F and H). Control cells were grown for 48 h (A and B) before staining. Other cells were grown for 24 h, treated with M β CD and grown for the next 24 h (E and F) before staining. Some 24 h non-treated cultures (C and D) and M β CD-treated cultures (G and H) were grown in the presence of an Frzb1-enriched medium for the next 24 h before staining. Scale bar (A-H) represents 10 μ m.

medium inhibits the myogenic differentiation induced by M β CD, and suggest that Wnt molecules are involved in these events.

3.6. Soluble Wnt-3 is significantly enhanced in M β CD-conditioned medium

To test whether Wnt-3 is indeed involved in the cellular effects observed after cholesterol depletion, we analyzed the presence of Wnt-3 protein in M β CD-conditioned medium and in control-conditioned medium (Fig. 8A). Both conditioned media were immunoprecipitated with a polyclonal antibody against Wnt-3. We found a more than 3-fold increase in the levels of Wnt-3 in M β CD-conditioned medium when compared to control-conditioned medium (Fig. 8A). A possible explanation is that Wnt-3 molecules are released to the culture medium after cholesterol depletion and do not stay associated to the plasma membrane of cells.

We also analyzed the expression of Wnt-3 protein in cell extracts (with no cultured medium) obtained from both control and M β CD-treated myogenic cultures (Fig. 8B). M β CD-treated myoblasts cultured for 72 h expressed similar levels of Wnt-3 when compared to untreated cells, which is in agreement with our results (Fig. 8A) showing that the enhancement of soluble Wnt-3 in M β CD-conditioned medium (and not the Wnt-3 associated to the membrane of cells) is responsible for the induction of proliferation and differentiation of myogenic cultured cells.

3.7. Cholesterol depleted-myogenic cells have an increased expression of M-cadherin

To further analyze the effects of cholesterol depletion in myogenic differentiation, we examined the expression of M-cadherin in both control and M β CD-treated cultures by immunoblotting (Fig. 9). M-cadherin is a marker of myogenic differentiation. It has been reported that, besides being a satellite cells marker, M-cadherin is involved in myoblast fusion and continues to be expressed in well-differentiated myotubes

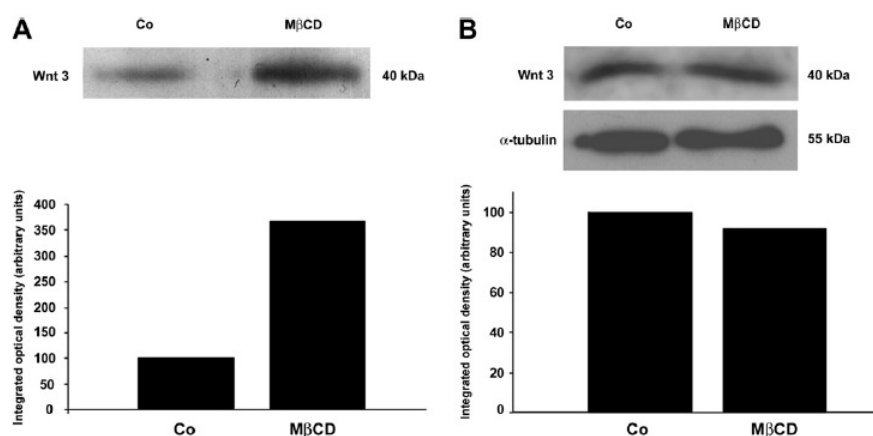


Fig. 8. Expression of soluble Wnt-3 is significantly enhanced in M β CD-conditioned medium. (A) Control-conditioned medium (Co) and M β CD-conditioned medium were immunoprecipitated with a polyclonal antibody against Wnt-3. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF. Membrane was then probed with the anti-Wnt-3 antibody. Quantification of protein bands revealed a more than 3-fold increase in the levels of Wnt-3 (40 kDa) in M β CD-conditioned medium when compared to control-conditioned medium. (B) Total cell extracts from myogenic cultures was also analyzed by Western blotting using anti-Wnt-3 antibody (upper blot). Control myogenic cells (Co) were grown for 72 h. Other cells were grown for 24 h, treated with M β CD and grown for the next 48 h. Lower Western blot shows α -tubulin (55 kDa) reactivity of the same samples, and was used to normalize sample loading.

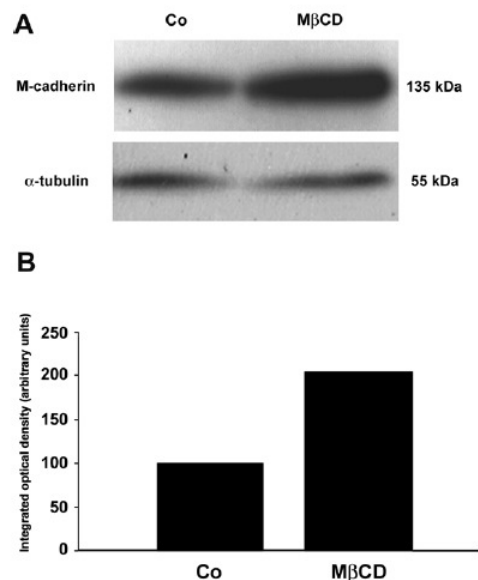


Fig. 9. Expression of M-cadherin is enhanced in M β CD-treated myogenic cells. (A) Control myogenic cells (Co) were grown for 72 h. Other cells were grown for 24 h, treated with M β CD (2 mM) for 30 min and grown for the next 48 h. Both cell culture extracts were analyzed in Western blot using anti-M-cadherin antibody (upper blot). Lower Western blot shows α -tubulin (55 kDa) reactivity of the same samples, and was used to normalize sample loading. (B) Quantification of protein bands revealed a more than 2-fold increase in the levels of M-cadherin (135 kDa) expression in M β CD-treated myogenic cells when compared to control cells.

[18]. M β CD-treated myogenic cells cultured for 72 h expressed a more than 2-fold increase in the levels of M-cadherin than untreated cells (Fig. 9A and B).

It is important to point out that, in opposition to common experimental approaches, we are not overexpressing Wnt molecules in our cells. The increase in soluble and active Wnt molecules found in conditioned culture media is a result of M β CD treatment that can release membrane-anchored proteins, such as Wnt. We are mostly interfering with Wnt availability to cells. It has been shown that the secretion of Wnt proteins from cells is usually inefficient [19]. Since the depletion of cholesterol by M β CD changes the membrane composition and structure [20], we suggest that cholesterol depletion by M β CD could release active Wnt-3a to the culture medium and activate the proliferation and differentiation of myogenic cells into fully striated myotubes. We cannot discard the possibility that myogenic differentiation induced by cholesterol depletion involves not only Wnt-3a molecules but also other Wnt molecules.

Acknowledgements: We thank José G. Abreu and Fabio A. Mendes for kindly providing the Frzb1-enriched medium. This work was supported by Brazilian grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and the Programas de Apoio aos Núcleos de Excelência (Pronex).

References

- [1] Hectcht, A. and Kemler, R. (2000) Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep.* 1, 24–28.
- [2] Cossu, G. and Borello, U. (1999) Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *EMBO J.* 18, 6867–6872.
- [3] Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (1996) How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet.* 12, 218–223.
- [4] Ikeya, M. and Takada, S. (1998) Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermo-myotome. *Development* 125, 4969–4976.
- [5] Galli, L.M., Willert, K., Nusse, R., Yablonka-Reuveni, Z., Nohno, T., Denetclaw, W. and Burrus, L.W. (2004) A proliferative role for Wnt-3a in chick somites. *Dev. Biol.* 269, 489–504.
- [6] Tajbakhsh, S., Borello, U., Vivarelli, E., Kelly, R., Papkoff, J., Duprez, D., Buckingham, M. and Cossu, G. (1998) Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* 125, 4155–4162.
- [7] Borello, U., Coletta, M., Tajbakhsh, S., Leyns, L., De Robertis, E.M., Buckingham, M. and Cossu, G. (1999) Transplacental delivery of the Wnt antagonist Frzb1 inhibits development of caudal paraxial mesoderm and skeletal myogenesis in mouse embryos. *Development* 126, 4247–4255.
- [8] Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates III, J.R. and Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448–452.
- [9] Mikels, A.J. and Nusse, R. (2006) Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4, e115.
- [10] Kikuchi, A., Yamamoto, H. and Kishida, S. (2007) Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal.* 19, 659–671.
- [11] Zhai, L., Chaturvedi, D. and Cumberledge, S. (2004) *Drosophila* wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *J. Biol. Chem.* 279, 33220–33227.
- [12] Mermelstein, C.S., Portilho, D.M., Medeiros, R.B., Matos, A.R., Einicker-Lamas, M., Tortelote, G.G., Vieyra, A. and Costa, M.L. (2005) Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei. *Cell Tissue Res.* 319, 289–297.
- [13] Mermelstein, C.S., Portilho, D.M., Mendes, F.A., Costa, M.L. and Abreu, J.G. (2007) Wnt/ β -catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion. *Differentiation* 75, 184–192.
- [14] Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S. and De Robertis, E.M. (1997) Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747–756.
- [15] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [16] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- [17] Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C. and Gregorio, C.C. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 637–706.
- [18] Kramerova, I., Kudryashova, E., Wu, B. and Spencer, M.J. (2006) Regulation of the M-cadherin- β -catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation. *Mol. Cell Biol.* 26, 8437–8447.
- [19] Bradley, R.S. and Brown, A.M. (1995) A soluble form of Wnt-1 protein with mitogenic activity on mammary epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 15, 4616–4622.
- [20] Ilangumaran, S. and Hoessli, D.C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* 335, 433–440.

Anexo 6: artigo submetido – “A depleção de colesterol aumenta a proliferação celular e aumenta o número de células positivas para desmina em culturas miogênicas de galinha”

Título em ingles: “Cholesterol depletion enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in chick myogenic cultures”

From: BioMed Central Editorial < editorial@biomedcentral.com >

To: Prof Claudia Mermelstein < mermelstein@ufrj.br >

Sent: 18 Aug 2009 18:31:28 +0100

Subject: 4268088152989327 Cholesterol depletion enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in chick myogenic cultures

Article title: Cholesterol depletion enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in chick myogenic cultures

MS ID : 4268088152989327

Authors : Debora M Portilho, Manoel L Costa and Claudia S Mermelstein

Journal : BMC Cell Biology

Dear Prof Mermelstein,

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript shortly. The submitting author can check on the status of your manuscript in peer review at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

You will be able to change details or submit revised versions of your manuscript by going to:

[http://www.biomedcentral.com/manuscript/login/man.asp?
txt_nav=man&txt_man_id=4268088152989327](http://www.biomedcentral.com/manuscript/login/man.asp?txt_nav=man&txt_man_id=4268088152989327)

Regards,

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>

Cholesterol depletion enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in chick myogenic cultures

Débora M. Portilho, Manoel L. Costa and Cláudia S. Mermelstein*

Address: Laboratório de Diferenciação Muscular e Citoesqueleto, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21949-590, Brazil

Email: mermelstein@ufrj.br

* Corresponding author

Abstract

Background: Myoblast replication is one of the first steps in skeletal muscle differentiation. Agents that interfere with myoblast replication are important tools for the understanding of myogenesis. Recently, our group has shown that cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (MCD) induces the differentiation of chick-cultured myogenic cells, by activating the Wnt/ β -catenin pathway.

Results: Here, we show that MCD treatment enhances cell proliferation in chick myogenic cell cultures and induces an increase in the number of desmin-positive mononucleated cells. Treatment of myogenic cells with the anti-mitotic reagent cytosine arabinoside right after cholesterol depletion blocks the MCD-induced effects on differentiation. Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assays showed higher numbers of cells that were positive for BrdU and desmin in MCD-treated cultures than in untreated cultures.

Conclusion: These findings suggest that rapid changes in the cholesterol content in myogenic cell membranes can activate myogenic proliferation, leading to an increase in the number of desmin-positive cells.

Background

In vitro skeletal myogenesis proceeds through two main sequential stages: myoblast proliferation and their subsequent differentiation into mature myotubes. Multinucleated myotubes arise as a result from a fusion event between several mononucleated myoblasts. In order to fuse, myoblasts must leave the cell cycle, elongate and align with other myoblasts into chains. This step is mediated by cell membrane components, including the cadherin/ β -catenin adhesion complexes [1,2] and the lipid cholesterol [3-7]. Cholesterol is a ubiquitous and abundant lipid component of animal membranes and is the key regulator of membrane fluidity. In addition, it has a crucial role in the formation and stabilization of specialized membrane micro-domains [8]. Therefore, in cells, cholesterol manipulations have become a standard tool for studying the structure and function of these domains. Specific treatments include cholesterol depletion through the use of methyl- β -cyclodextrin (MCD), which can rapidly and reversibly extract most cholesterol from cell membranes [9]. Recently, our group has shown that cholesterol depletion by MCD enhances myoblast fusion and induces the differentiation of chick-cultured myogenic cells [7]. Further, we showed that the activation of the Wnt/ β -catenin pathway is involved in these events [10,11]. Cholesterol depletion by MCD also interferes with cell proliferation in myogenic cells [7]. Measurements of the total amount of DNA (as measured by DAPI fluorescence) were significantly higher in MCD treated-cultures than in untreated cultures. To further understand the effects of cholesterol depletion in the proliferation of chick myogenic cells, we analyzed the expression of the proliferation marker Ki67 protein and desmin, one of the first structural proteins to be expressed in myoblastic cells [12]. We used the anti-mitotic reagent cytosine arabinoside (ara-c) to block the MCD-induced proliferation of myogenic

cells. Further, BrdU incorporation was assayed to analyze which cell types (myogenic and/or non-myogenic cells) were induced to proliferate after cholesterol depletion.

Results and Discussion

Previously, we have shown that the total amount of DNA (as measured by DAPI fluorescence) was significantly higher in MCD treated-cultures than in untreated cultures [7]. Here, we further analyzed the effects of cholesterol depletion in the proliferation of chick myogenic cultures. Untreated and MCD-treated 27-hs and 48-hs myogenic cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with an antibody against the Ki67 protein (Fig. 1). The Ki67 protein is a cellular marker for proliferation, since it is present during all active phases of the cell cycle (G1, S, G2, and mitosis), but is absent in resting cells (G0). By the quantification of the average number of Ki67-positive cells in each culture condition, we estimated an increase of 60% and 40% in Ki67-positive cells after 3 and 24 hours of MCD treatment, respectively (Fig. 1F). It is possible to conclude that cholesterol depletion by MCD enhances the proliferation of chick myogenic cell cultures.

Next, we decided to analyze when the MCD-induced effects on replication were occurring: right after cholesterol depletion or 24 hours after it. We probed the effects of the anti-mitotic agent cytosine arabinoside (ara-c) in untreated and MCD-treated myogenic cultures (Fig. 2). Treatment of 24 hour myogenic cultures with ara-c results in myotubes with a lower fusion index (number of nuclei per myotubes) as compared to cultures that were not treated with ara-c (Fig. 3). Even though, no significant effect in fusion index of MCD treated-cells was observed after ara-c in 48 hour myogenic cultures (Fig. 3). It is possible to conclude from these experiments that ara-c can inhibit cholesterol depletion-induced effects on proliferation only when used right after MCD treatment.

Then, we asked whether the effect of cholesterol depletion in cell proliferation was affecting both myogenic and fibroblastic mononucleated cells. Untreated and MCD-treated 27-h and 48-h myogenic cells were fixed with 4% paraformaldehyde and double-stained with an anti-desmin antibody and with the nuclear probe DAPI (Fig. 4). Desmin is one of the first structural proteins that are expressed in myoblasts [12,14]. By the quantification of the average number of desmin-positive and desmin-negative mononucleated cells/field, we estimated a 40% increase in desmin-positive mononucleated cells after 3 and 24-h of MCD treatment (Fig. 4B), compared to untreated cultures. In contrast, no significant differences were found in the average number of desmin-negative mononucleated cells/field after 3 or 24-h of MCD treatment, compared to untreated cultures. Interestingly, a decrease in desmin-positive mononucleated cells was found both in 48-h untreated cultures as well as in 48 hour MCD-treated cultures, as compared to 24 h-cultures (Fig. 4B). The decrease in desmin-positive mononucleated cell is concomitant with the increase in multinucleated cells (myotubes), which resulted from cell fusion (see fusion index in Fig. 3). From the collection of these results we can conclude that cholesterol depletion by MCD enhances the number of desmin-positive mononucleated cells, but not the number of fibroblastic (desmin-negative) cells.

To further explore the role of cholesterol depletion in the enhancement in the number of desmin-positive cells, we decided to examine the expression of desmin protein after MCD treatment in extracts of cultured myogenic cells by Western blotting (Fig. 5A). Some myogenic cultures were treated with MCD and grown for the next 3 or 24 hours. Cell extracts were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting. Quantification of immunoblots revealed a 20% increase in the levels of desmin expression in MCD treated-

cells that were grown for 27 hours when compared to control cells (Fig. 5B). The same amount of increase in desmin expression (20%) was observed in MCD treated-cells that were grown for 48 hours when compared to control cells (Fig. 5B). An increase in 30% in the expression of desmin was observed when comparing 48 h-cultures with 27 h-cultures, and can be explained by an increase in the number of fully differentiated myotubes in 48-h cultures.

We next studied the type of cells (myogenic and/or fibroblastic) that was induced to proliferate after MCD treatment by analyzing BrdU incorporation in these myogenic cultures. BrdU, a thymidine analog, becomes stably incorporated into DNA during the S-phase of mitosis, and thus allows the quantification of dividing cells. Untreated and MCD-treated 24-hs myogenic cells were labeled (right after MCD treatment) with BrdU (3 ug/mL) for 1 hour, fixed with 4% paraformaldehyde and double-stained with anti-BrdU (Figs. 6B, C, green) and anti-desmin antibodies (Figs. 6B, C, red). By the quantification of the percentage of desmin-positive / BrdU-positive cells, we estimated a more than 2-fold increase in the number of these cells after MCD treatment (Fig. 6D). BrdU-positive nuclei were found within desmin-positive mononucleated myoblasts and desmin-negative fibroblastic cells. Since MCD-treated myotubes have a higher fusion index than control cells (Fig. 3), we can conclude that cholesterol depletion by MCD enhances the proliferation of desmin-positive cells that are capable of fusion.

Conclusion

In conclusion, our current hypothesis is that cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (MCD) treatment increases myoblast proliferation, which causes cells to become more rapidly confluent. This process increases myoblast alignment and fusion which culminates with the formation of fully striated myotubes with a higher number of nuclei/cell than the observed in untreated myogenic cultures. Thus, cholesterol depletion first induces myoblast replication which ultimately leads to an increase in myogenic differentiation. Recently, we have shown that a soluble and active form of Wnt-3a molecules is released in the culture media of chick myogenic cells after cholesterol depletion [11], and that the canonical Wnt/ β -catenin pathway is activated in these cells [10]. Wnt-3a molecules have been shown to have a proliferative role in chick somites [15]. Thus, we can speculate that cholesterol depletion by MCD could release active Wnt molecules to the culture medium and activate the proliferation of myogenic cells. Our findings emphasize the importance of membrane cholesterol organization and function during the early steps of myogenesis.

Methods

Antibodies and fluorescent probes

DNA-binding probe DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride) was purchased from Molecular Probes (USA). Mouse monoclonal anti-sarcomeric α -actinin (clone EA-53), rabbit polyclonal anti-desmin, mouse monoclonal anti- α -tubulin (clone DM1A) and mouse monoclonal anti-BrdU antibodies were purchased from Sigma Chemical Co. (USA). Rabbit polyclonal anti-Ki67 antibody was purchased from abcam (USA). Alexa Fluor 488-goat anti-mouse/rabbit IgG and Alexa Fluor 546-goat anti-mouse/rabbit IgG antibodies

were purchased from Molecular Probes (USA). Peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies were purchased from Amersham Biosciences (UK).

Primary cell cultures

Primary cultures of myogenic cells were prepared from breast muscles of 11-day-old chick embryos [7]. Cells were grown with 8-1-0.5 culture medium (MEM with 10% horse serum, 0.5% chick embryo extract, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin) at an initial density of 5×10^5 cells/35 mm culture dishes onto 22 mm-diameter plastic coverslips (Pro-Plastics Inc., USA) previously coated with rat tail collagen. Cells were grown under humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

The percentage of myoblasts in these cell cultures was calculated by the double-labeling of 24 hour cultures with both DAPI (nuclear staining) and desmin (muscle-specific marker) and subsequently counting the number of desmin-positive cells in the total number of cells in the field. On average, myoblasts made up 80% of each culture and non-myogenic cells comprised 20%.

Some myogenic cultures were treated for 30 minutes with methyl- β -cyclodextrin (MCD; Sigma) at a final concentration of 2 mM after the first 24 hours of culture. After MCD exposure, cultures were washed with culture medium and grown for the next 1, 24 or 48 hours. Some myogenic cultures were treated with the anti-mitotic reagent cytosine arabinoside (ara-c; Sigma) at a final concentration of 10^{-5} M in two different experiments: right after MCD treatment (in 24 hour cultures) or 24 hours after MCD treatment (in 48 hour cultures). Ara-c was left in the cultures for 24 hours.

BrdU incorporation assay

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to MCD-treated and control myogenic cells (in 24 hour cultures) for 1 hour. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature and subsequently washed twice with PBS at 37°C for 15 minutes and once with deionized water at 37°C for 10 minutes. Cells were incubated with 2 N HCl at 50°C for 30 minutes and washed with 0.1 M Borate buffer (pH 8.5) at 37°C for 10 minutes and once with PBS. Cells were then double-stained with anti-desmin and anti-BrdU antibodies and analyzed by immunofluorescence microscopy. For the quantification of the percentage of desmin-positive / BrdU-positive cells, at least 50 cells for each culture condition were scored in three independent experiments.

Immunofluorescence microscopy and digital image acquisition

Cultures were rinsed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. They were then permeabilized with 0.5% Triton-X 100 in PBS 3 times for 10 minutes. The same solution was used for all subsequent washing steps. Cells were incubated with primary antibodies for 1 hour at 37°C. After incubation, cells were washed for 30 minutes and incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies for 1 hour at 37°C. Nuclei were labeled with DAPI (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.9% NaCl). Cells were examined with an Axiovert 100 microscope (Carl Zeiss, Germany) and images were acquired with a C2400i integrated CCD camera using an Argus 20 image processor (Hamamatsu Photonics, Japan).

For fusion index calculations, chick myogenic cells grown in different culture conditions were fixed with 4% paraformaldehyde and double-stained with the nuclear probe DAPI and

an anti-sarcomeric α -actinin antibody. The number of nuclei per myotube (fusion index) was recorded in control (untreated) cultures and in treated cells. At least 50 myotubes for each culture condition were scored in at least three independent experiments.

For Ki67 immunolabeling, MCD-treated and control chick myogenic cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature and subsequently washed twice with PBS at 37°C for 15 minutes and once with deionized water at 37°C for 10 minutes. Cells were incubated with 2 N HCl at 50°C for 30 minutes and washed with 0.1 M Borate buffer (pH 8.5) at 37°C for 10 minutes and once with PBS. Cells were then stained with a rabbit polyclonal anti-Ki67 antibody, followed by a secondary antibody and analyzed by immunofluorescence microscopy. The number of Ki67 positive cells and the total number of cells per field were recorded in control (untreated) cultures and in treated cells. At least 50 microscopic fields for each culture condition were scored in at least three independent experiments.

Immunoblotting of cell extracts

Some myogenic cultures were treated for 30 minutes with methyl- β -cyclodextrin (MCD; Sigma) at a final concentration of 2 mM after the first 24 hours of culture. After MCD exposure, cultures were washed with cultured medium and grown for the next 3 or 24 hours. Cultured myogenic cells were quickly washed in ice-cold PBS and 50 μ L of sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0.2 M dithioethreitol, 125 mM Tris-HCl pH 6.8) were added to the cells and boiled for 10 minutes. Equal volumes of samples were loaded for 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; [13]). Proteins were then transferred to PVDF membranes. The proteins immobilized on the membranes were

immediately blocked for 1 hour at room temperature with a 5% non-fat dry milk in Tris buffered saline-Tween 20 solution (0.001%) (TBS-T). Then the membranes were incubated with a rabbit polyclonal anti-desmin antibody (Sigma, dilution 1:3000 in TBS-T). After 5 washes in TBS-T (3 minutes each), the membranes were incubated with an anti-rabbit peroxidase conjugated antibodies (Amersham, dilution 1:10,000 in TBS-T), washed again as described above and the bands were visualized using the ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham). To check sample loading, membranes were incubated with a mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody (Sigma, dilution 1:3000 in TBS-T-milk). After 5 washes in TBS-T (3 minutes each), membranes were incubated with anti-mouse peroxidase conjugated antibody (Amersham, dilution 1:10,000 in TBS-T) and developed as described above. Quantification of protein bands was performed using the public domain software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) with data obtained from three independent experiments.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and the Programas de Apoio aos Núcleos de Excelência (Pronex).

References

1. Knudsen KA, Myers L, McElwee SA: A role for the Ca²⁺-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp Cell Res* 1990, **188**:175-184.

2. Goichberg P, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B: **Recruitment of beta-catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction.** *J Cell Sci* 2001, **114**:1309-1319.
3. Cornell RB, Nissley SM, Horwitz AF: **Cholesterol availability modulates myoblast fusion.** *J Cell Biol* 1980, **86**:820-824.
4. Sekiya T, Takenawa T, Nozawa Y: **Reorganization of membrane cholesterol during membrane fusion in myogenesis in vitro: a study using the filipin-cholesterol complex.** *Cell Struct Funct* 1984, **9**:143-155.
5. Hirayama E, Sasao N, Yoshimasu S, Kim J: **K252a, an indrocarbazole derivative, causes the membrane of myoblasts to enter a fusion-capable state.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **285**:1237-1243.
6. Nakanishi M, Hirayama E, Kim J: **Characterization of myogenic cell membrane. II. Dynamic changes in membrane lipids during the differentiation of mouse C2 myoblast cells.** *Cell Biol Int* 2001, **25**:971-979.
7. Mermelstein CS, Portilho DM, Medeiros RB, Matos AR, Einicker-Lamas M, Tortelote GG, Vieyra A, Costa ML: **Cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin enhances myoblast fusion and induces the formation of myotubes with disorganized nuclei.** *Cell Tissue Res* 2005, **319**:289-297.
8. Simons K, Ikonen E: **Functional rafts in cell membranes.** *Nature* 1997, **387**:569-572.
9. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH: **Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content.** *J Lipid Res* 1997, **38**:2264-2272.
10. Mermelstein CS, Portilho DM, Mendes FA, Costa ML, Abreu JG: **Wnt/ β -catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion.** *Differentiation* 2007, **75**:184-192.
11. Portilho DM, Martins ER, Costa ML, Mermelstein CS: **A soluble and active form of Wnt-3a protein is involved in myogenic differentiation after cholesterol depletion.** *FEBS Lett* 2007, **581**:5787-5795.
12. Holtzer H, Dilullo C, Costa ML, Lu M, Choi J, Mermelstein CS, Schultheiss T, Holtzer S: **Striated myoblasts and multinucleated myotubes induced in non-muscle cells by MyoD are similar to normal in vivo and in vitro counterparts.** In: Ozawa E, Masaki

- T, Nabeshima Y (eds), *Frontiers in muscle research*. Elsevier, Amsterdam, 1991, pp 187-207.
13. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
 14. Costa ML, Escaleira RC, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS: **Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein.** *Braz J Med Biol Res* 2004, **37**:1819-1830.
 15. Galli LM, Willert K, Nusse R, Yablonka-Reuveni Z, Nohno T, Denetclaw W, Burrus LW: **A proliferative role for Wnt-3a in chick somites.** *Dev Biol* 2004, **269**:489-504.

Figure legends

Figure 1

Cholesterol depletion enhances cell proliferation in myogenic cell cultures. A schematical representation of the experiments is shown in **A**. Untreated and MCD-treated 27-hs and 48-hs myogenic cells were fixed with 4% paraformaldehyde and immunostained (**IF**) with an anti-Ki67 antibody (**B-E**). Quantification of the average number of Ki67-positive cells in each culture condition revealed an increase in 60% and 40% in Ki67-positive cells after 3 and 24 hours of MCD treatment, respectively (**F**). (* $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$; ANOVA versus control group; $n = 50$). At least 50 microscopic fields for each culture condition were scored in at least three independent experiments.

Figure 2

Inhibition of proliferation blocks MCD-induced effects. A schematical representation of the experiments is shown in **A**. Control myogenic cells were grown for 72 hours (**B**), and other myogenic cells were grown for 24 hours, treated with MCD for 30 minutes and grown for the next 48 hours (**E**). Some myogenic cultures were treated with ara-c in two different experiments: right after MCD treatment (in 24 hours cultures, **C** and **F**) or 24 hours after MCD treatment (in 48 hours cultures, **D** and **G**). Live cells were analyzed under phase contrast microscopy. Arrows point to multinucleated myotubes. One representative image of each experiment is shown, selected from three independent experiments. Scale bar (**B-G**) represents 20 μm .

Figure 3

Fusion index of chick myogenic cells grown in different culture conditions. A schematical representation of the experiments is shown in A. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and double-stained with DAPI and anti-desmin antibody (IF). The number of nuclei per myotube (fusion index) was recorded (B) in control (untreated) cultures and in treated cells (with MCD alone or in combination of Ara-C in 24 or in 48 hours cultures). (*P < 0.01; ANOVA versus control group; n = 50). At least 50 myotubes for each culture condition were scored in at least three independent experiments.

Figure 4

Cholesterol depletion enhances the number of desmin-positive cells in myogenic cultures. A schematical representation of the experiments is shown in A. Untreated and MCD-treated 27-hs and 48-hs myogenic cells were fixed with 4% paraformaldehyde and double-stained (IF) with an anti-desmin antibody and with the nuclear probe DAPI. Quantification of the average number of desmin-positive and desmin-negative mononucleated cells/field revealed a 40% increase in desmin-positive cells after 3 and 24-hs of MCD treatment, whereas no differences were found in the average number of desmin-negative cells/field compared to untreated cultures (B). (*P < 0.01; ANOVA versus control group; n = 50). At least 50 microscopic fields for each culture condition were scored (for desmin-positive or desmin-negative mononucleated cells) in at least three independent experiments.

Figure 5

Expression of desmin is enhanced after cholesterol depletion. Total cell extracts from myogenic cultures were analyzed by Western blotting using anti-desmin antibody (A). Cells were grown for 24 hours, treated with MCD and grown for the next 3 or 24 hours. Quantification of the desmin protein band (52 kDa) revealed a 20% increase in the levels of desmin expression in MCD treated-cells that were grown for 27 or 48 hours when compared to control cells (B). One representative image of this experiment is shown on the top and the semi-quantitative analysis is shown on the bottom, representing the average of 3 independent experiments.

Figure 6

Cholesterol depletion induces the incorporation of BrdU into desmin-positive mononucleated cells. A schematical representation of the experiments is shown in A. MCD-treated and control myogenic cells (with 24 hours) were labelled with BrdU (3 ug/mL) for 1 hour. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and double-immunostained (IF) with anti-BrdU (B and C, green) and anti-desmin (B and C, red) antibodies. Scale bars (B and C) represent 5 μ m. The percentage of desmin-positive / BrdU-positive cells (black bar) and the percentage of BrdU-positive / desmin-negative cells (gray bar) were recorded in control (untreated) cultures and in MCD-treated cells (D). (*P < 0.01; Mann-Whitney test; n = 50). At least 50 BrdU-positive cells for each culture condition were scored in three independent experiments.

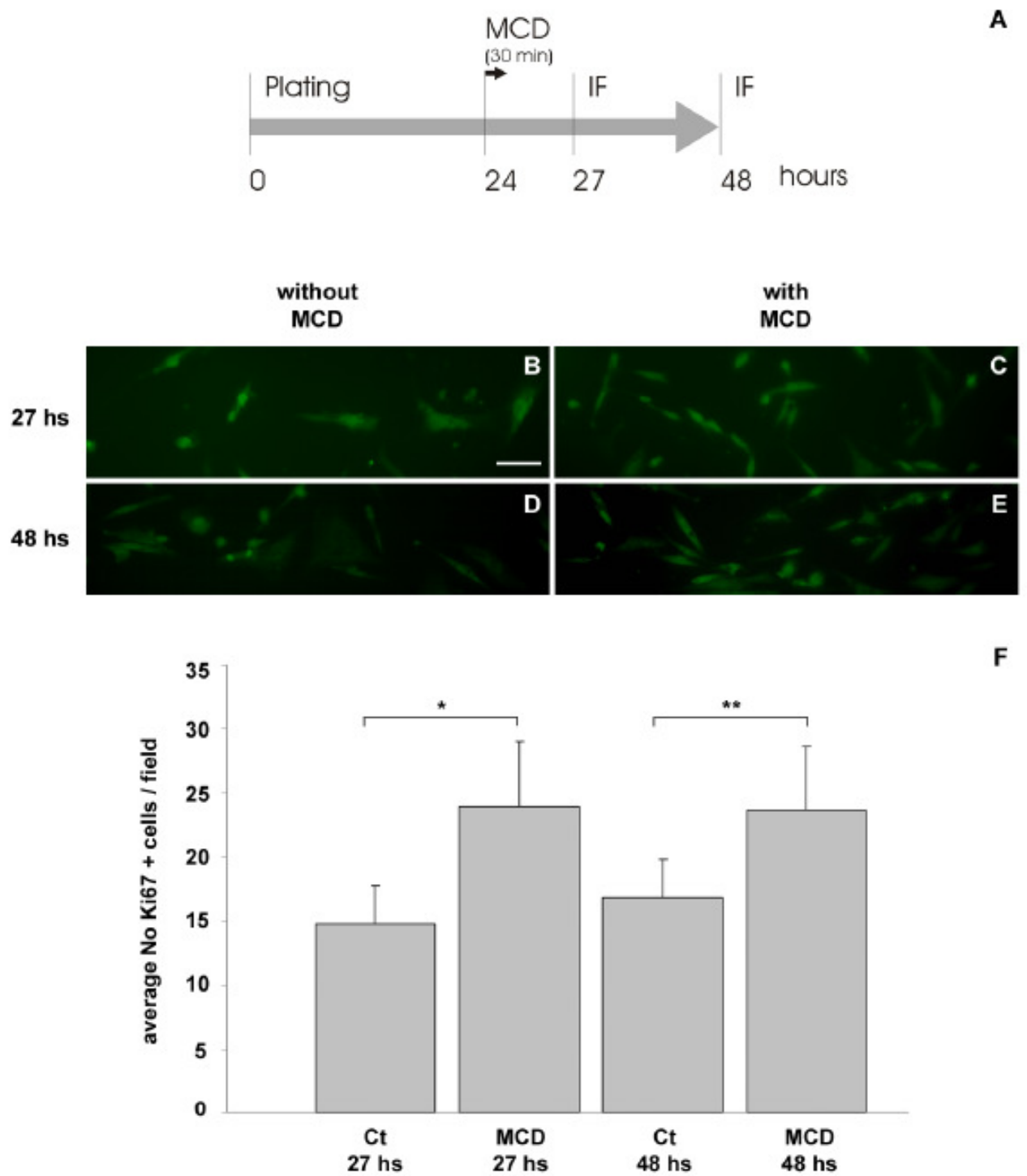
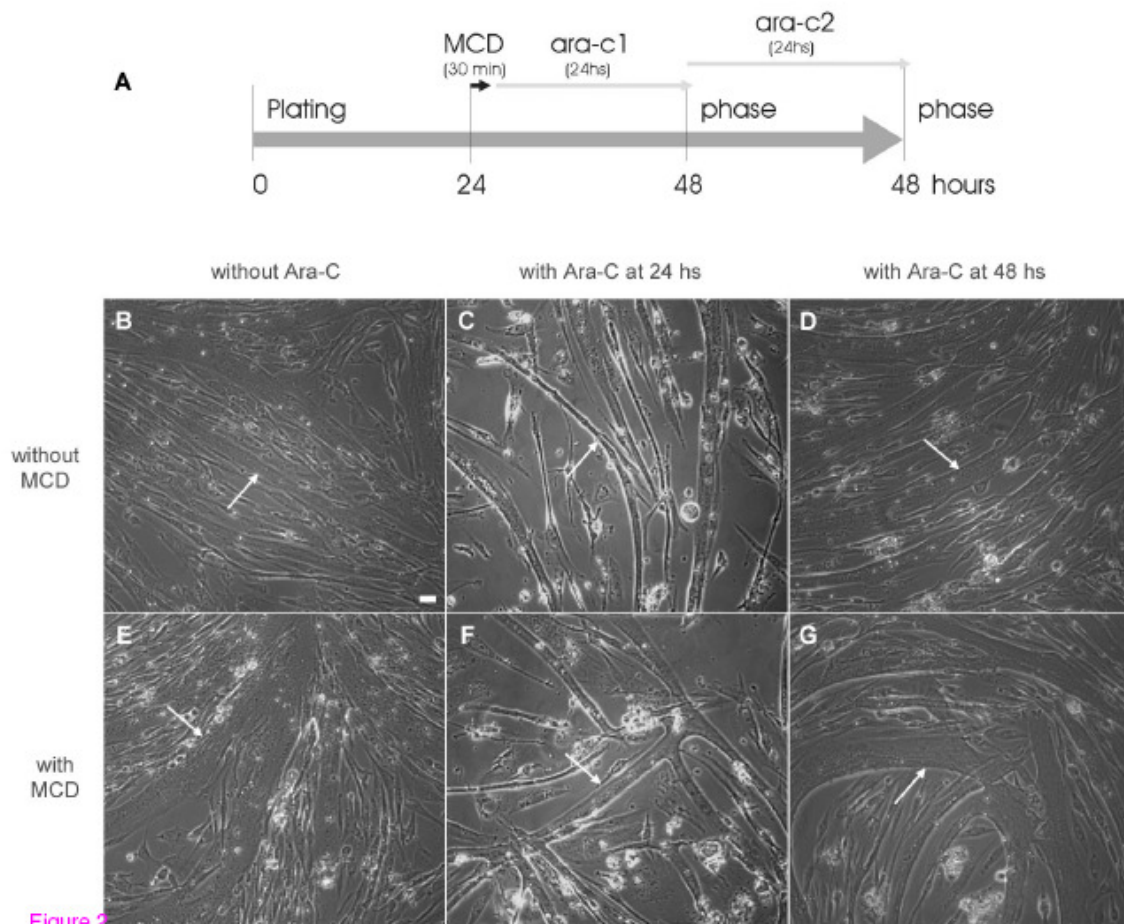


Figure 1



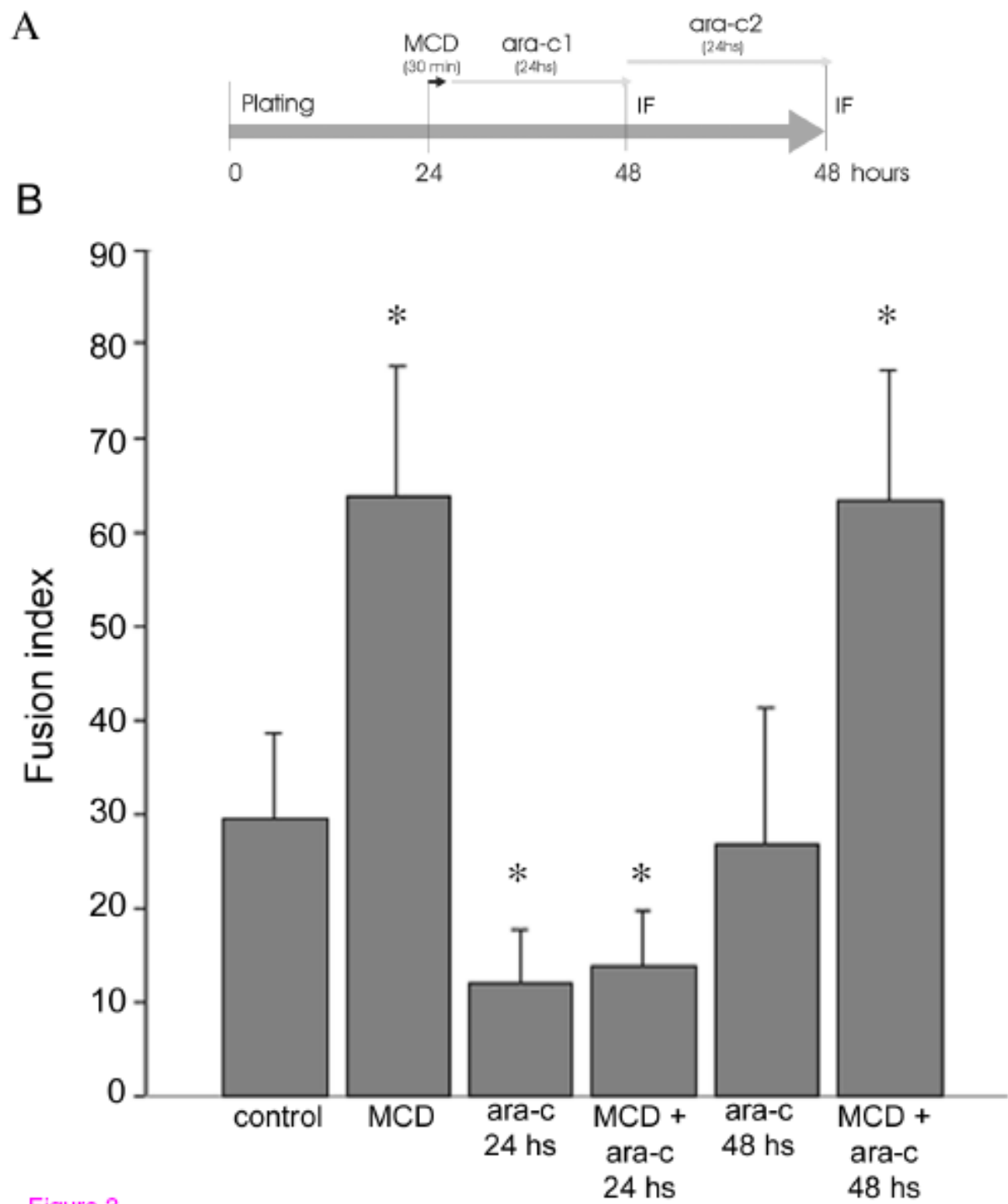


Figure 3

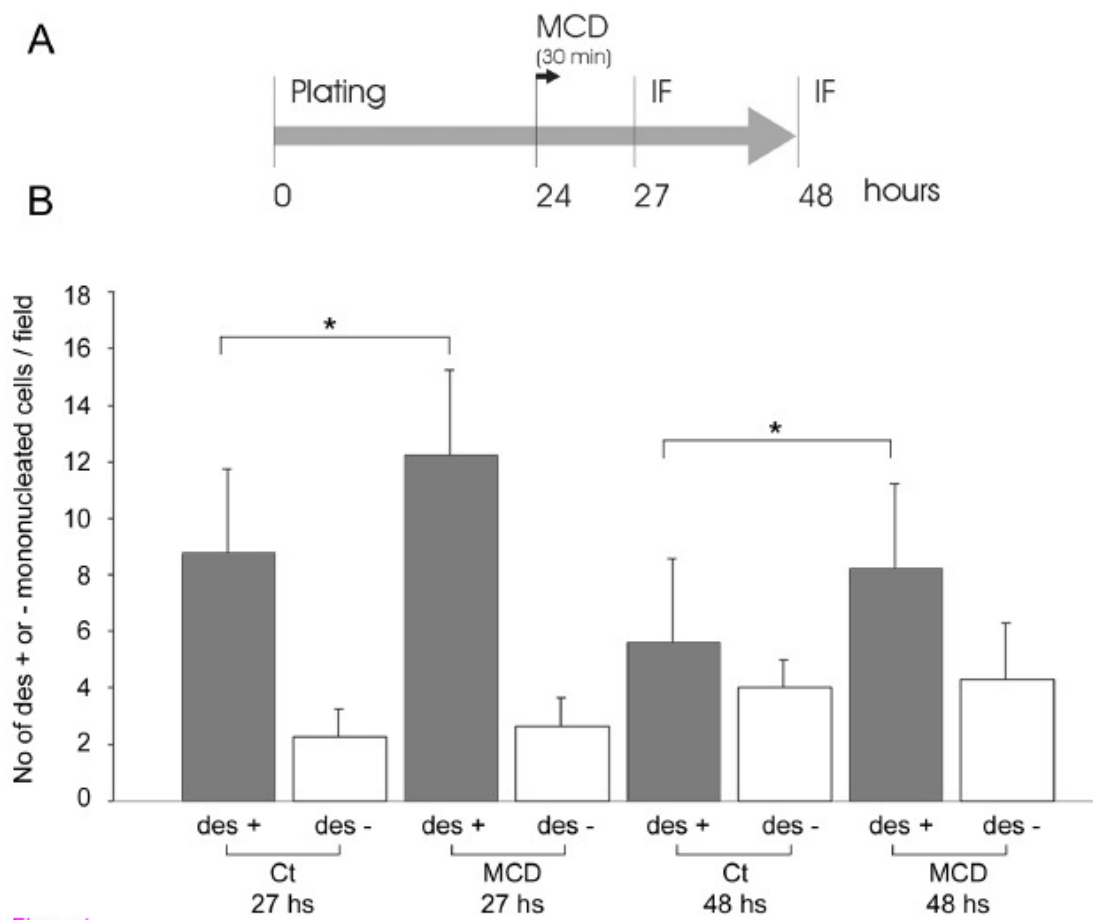


Figure 4

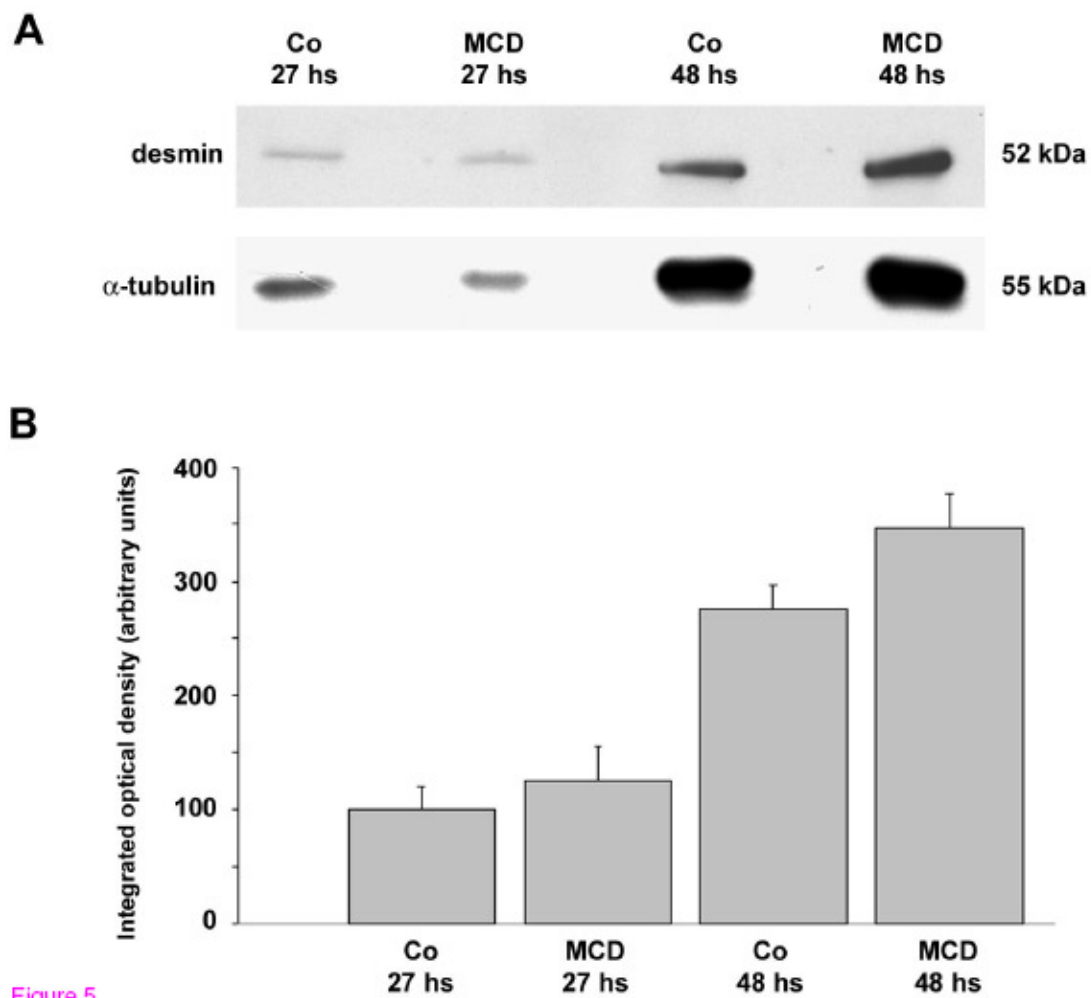


Figure 5

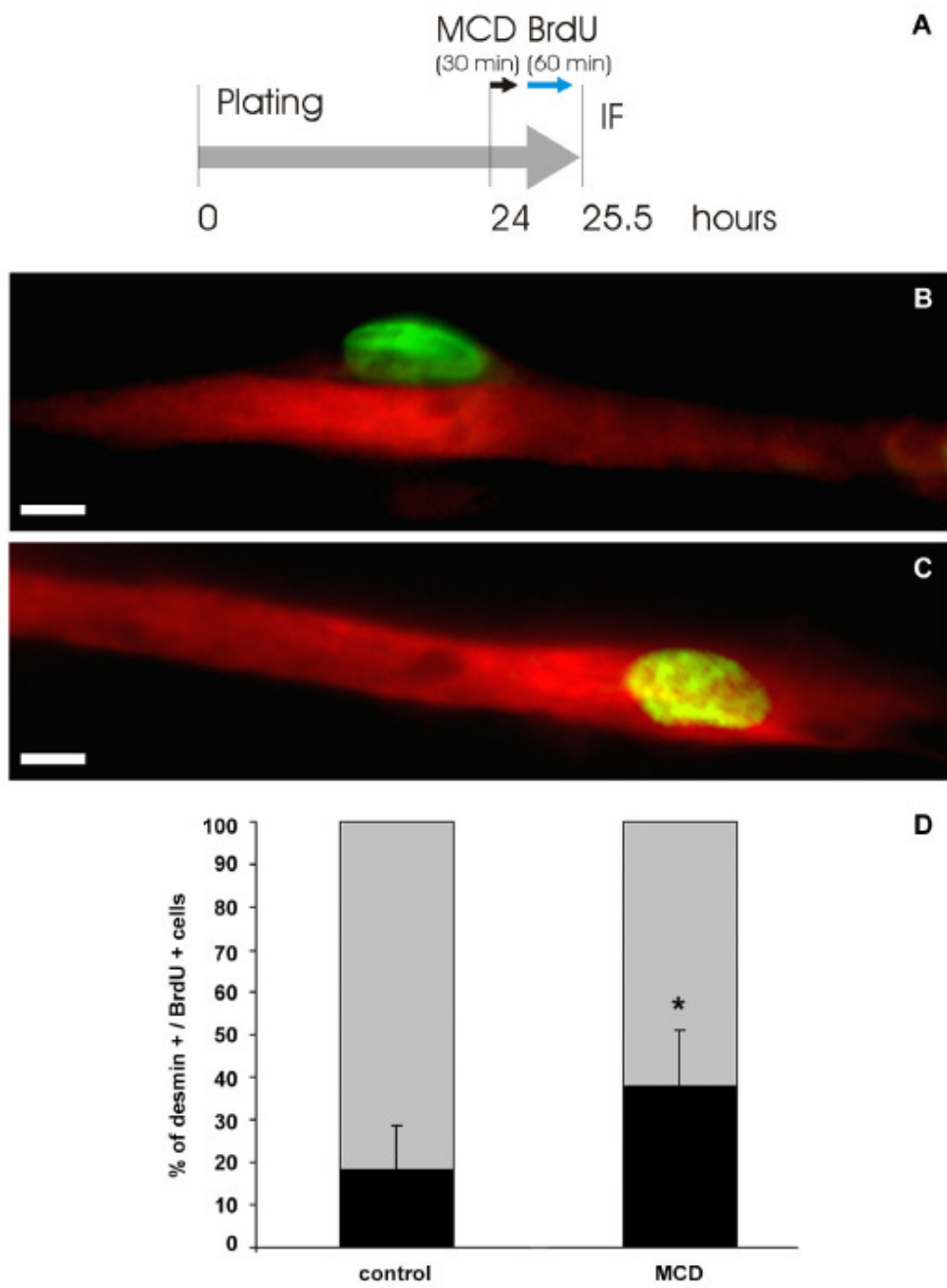


Figure 6

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](#)