

**MICHEL VAZ DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO SILENCIAMENTO DA SHP-2 NA  
ATIVIDADE DA FAK DURANTE A MIOGÊNESE  
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**MICHEL VAZ DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO SILENCIAMENTO DA SHP-2 NA  
ATIVIDADE DA FAK DURANTE A MIOGÊNESE  
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

**ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

OL4e Oliveira, Michel Vaz de  
Efeito do silenciamento da SHP-2 na atividade da FAK durante a miogênese do músculo esquelético / Michel Vaz de Oliveira.  
Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Kleber Gomes Franchini  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Miogeneses. 2. Cultura celular. 3. RNA interferência. 4. Músculo esquelético. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : The effect of SHP-2 silencing in the activity of FAK during myogenesis**

**Keywords:** • Myogenesis  
• Culture cells  
• RNA interference  
• Skeletal Muscle

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**  
**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini**  
**Profa. Dra. Beatriz Gomes Tavares Murta**  
**Prof. Dr. Rovilson Gilioli**

**Data da defesa: 31 - 01 - 2008**

---

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
Michel Vaz de Oliveira

---

---

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

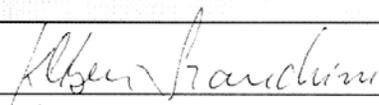
---

---

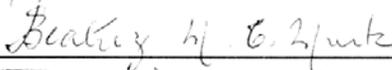
**Membros:**

---

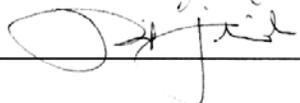
1. Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini



2. Profª. Drª. Beatriz Martins Tavares Murta



3. Prof. Dr. Rovilson Giglioli



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 31/01/2008

---

## ***DEDICATÓRIA***

*Dedico este trabalho aos meus pais Armando e Gislaine. Obrigado por sempre acreditarem em mim e pelo apoio em todas as etapas de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

---

À minha família por tudo.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pela oportunidade de desenvolver o trabalho em seu laboratório, por sua orientação e ensinamentos terem contribuído em minha qualificação profissional, e por ter contado com sua atenção e ajuda.

À Carol Clemente e Talita Marin pelo apoio com os protocolos experimentais e ensaios com RNAi.

À Antonio Calixto e Jaqueline Lima pelo apoio com as técnicas experimentais e amizade.

Aos amigos do laboratório: Aline, Alisson, Ana Deckman, Ana Helena, Ana Paula, Carla, Carol Guido, Leandro Bueno, Márcia Story, Maruska, Rodrigo Marin, Silvana Rocco, Thaís Holtz, Vivian e Wilson Malagó, pelo convívio e aprendizado no laboratório e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Anderson Gonçalves e Thaís F. Tornatore pela amizade e companhia.

Aos amigos Armando F. Lima Filho e Rovilson Gilioli pelas lições de vida e amizade nestes cinco anos de UNICAMP.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*"Uma longa jornada começa com um único passo."*

***Lao-Tsé.***

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvii</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1- Fatores de regulação miogênica (MRFs): relação hierárquica, sobreposição de funções, ativação e miogênese</b> .....	24
<b>1.2- Hormônios e fatores de crescimento na diferenciação miogênica</b> .....	29
<b>1.3- Linhagens utilizadas para o estudo da miogênese <i>in vitro</i></b> .....	32
<b>1.4- Papel da matriz extracelular no processo de diferenciação</b> .....	35
<b>1.5- FAK e sua importância no programa de miogênese</b> .....	37
<b>1.6- SHP-2 e sua importância no programa de miogênese</b> .....	43
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	46
<b>3- METODOLOGIA</b> .....	48
<b>3.1- Cultura de células</b> .....	49
<b>3.2- Ensaio de diferenciação celular</b> .....	49
<b>3.3- Transfecção das células C2C12</b> .....	50
<b>3.4- Extrato total de proteínas</b> .....	51
<b>3.5- Determinação de proteínas pelo método de Lowry</b> .....	52
<b>3.6- Western blotting</b> .....	52
<b>3.7- Coloração hematoxilina-eosina</b> .....	53
<b>3.8- Síntese de <i>siRNA in vitro</i></b> .....	54

3.9- Contagem Celular.....	55
3.10- Análise estatística.....	55
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
4.1- Expressão da FAK em células C2C12 durante a diferenciação miogênica.....	57
4.2- Atividade da FAK em células C2C12 durante a diferenciação miogênica.....	58
4.3- Associação da FAK/SHP-2 em células C2C12 durante indução à miogênese.....	59
4.4- Padronização do Silenciamento em células C2C12: <i>siRNA</i> .....	59
4.4.1- Expressão da SHP-2 em células C2C12 durante a diferenciação miogênica.....	61
4.5- Efeito do Silenciamento da SHP-2 na atividade da FAK	61
4.6- Características fenotípicas das células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação em músculo esquelético.....	62
4.7- Efeito do silenciamento de SHP-2 na proliferação das células C2C12.....	64
4.8- Efeito do silenciamento de SHP-2 na diferenciação e nas características fenotípicas das células C2C12.....	65
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

bHLH	hélice-loop-hélice básico
BMP4	bone morfogenic protein 4
CDK	quinase dependente de ciclina
DNA	ácido desoxiribonucleico
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	ácido desoxiribonucleico
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FAK	Quinase de adesão focal
FLB	formaldeído <i>loading buffer</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
HE	coloração hematoxilina-eosina
IB	<i>immunoblotting</i>
IGF	fatores de crescimento tipo insulina
KDa	quilodaltons
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
MC	meio de cultivo
MD	meio de diferenciação
MEC	matriz extracelular
MEF2	fator amplificador de expressão muscular
MHC	miosina de cadeia pesada
MRFs	fatores de regulação miogênica

PBS	tampão fosfato + solução salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PPAK	quinase de adesão focal fosforilada no resíduo tirosina 397 (forma ativa)
pRb	proteína retinoblastoma
RNAm	RNA mensageiro
RPM	rotações por minuto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SHH	sonic hedgehog
Tyr	tirosina

## LISTA DE FIGURAS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b> Modelo de um corte transversal de um embrião de camundongo entre 7 e 8.5 dias de desenvolvimento.....	22
<b>Figura 2-</b> Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético (miogênese).....	23
<b>Figura 3-</b> MRFs primários e secundários.....	25
<b>Figura 4-</b> Modelo para diferenciação miogênica.....	28
<b>Figura 5-</b> Diagrama das mudanças dos receptores de fator de crescimento de células musculares terminalmente diferenciadas.....	31
<b>Figura 6-</b> Apoptose durante a diferenciação miogênica.....	33
<b>Figura 7-</b> Representação estrutural da molécula da FAK, mostrando seus domínios e sítios de interação.....	38
<b>Figura 8-</b> Representação da maioria das possíveis interações da FAK no complexo de adesão focal.....	40
<b>Figura 9-</b> Possível mecanismo de inibição da miogênese por <i>stress</i> mecânico.....	42
<b>Figura 10-</b> Curso temporal do experimento utilizando <i>siRNA</i> .....	51
<b>Figura 11-</b> Gel representativo da quantificação de RNA.....	54
<b>Figura 12-</b> Representação da expressão de FAK no cultivo de C2C12 em MD no período inicial de indução a miogênese.....	57
<b>Figura 13-</b> Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com pFAK em células C2C12 em diferenciação.....	58
<b>Figura 14-</b> Representação gráfica da interação da proteína tirosino-fosfatase SHP-2 com a FAK em células C2C12 induzidas à miogênese.....	59

<b>Figura 15-</b>	Representação gráfica da padronização do silenciamento em células C2C12: <i>siRNA</i> .....	60
<b>Figura 16-</b>	Representação da expressão da SHP-2 em células C2C12 no período inicial de indução a miogênese.....	61
<b>Figura 17-</b>	Representação gráfica da atividade da FAK em células C2C12 transfectadas com <i>siRNA<sup>SHP2</sup></i> .....	62
<b>Figura 18-</b>	Exemplos representativos de células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação.....	63
<b>Figura 19-</b>	Gráfico representativo da proliferação das células C2C12 após horas de transfecção com <i>siRNA<sup>SHP2</sup></i> .....	64
<b>Figura 20-</b>	Exemplos representativos das células C2C12 transfectadas com <i>siRNA<sup>SHP2</sup></i> .....	65

## LISTA DE GRÁFICOS

---

	<b>PÁG.</b>
<b>Figura 12-</b> Representação da expressão de FAK no cultivo de C2C12 em MD no período inicial de indução a miogênese.....	57
<b>Figura 13-</b> Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com pFAK em células C2C12 em diferenciação....	58
<b>Figura 14-</b> Representação gráfica da interação da proteína tirosino-fosfatase SHP-2 com a FAK em células C2C12 induzidas à miogênese.....	59
<b>Figura 15-</b> Representação gráfica da padronização do silenciamento em células C2C12: <i>siRNA</i> .....	60
<b>Figura 16-</b> Representação da expressão da SHP-2 em células C2C12 no período inicial de indução a miogênese.....	61
<b>Figura 17-</b> Representação gráfica da atividade da FAK em células C2C12 transfectadas com <i>siRNA<sup>SHP2</sup></i> .....	62
<b>Figura 19-</b> Gráfico representativo da proliferação das células C2C12 após horas de transfecção com <i>siRNA<sup>SHP2</sup></i> .....	64

## **RESUMO**

Os mioblastos que formam o músculo esquelético são derivados de regiões do miótomo dos somitos. No processo de miogênese ocorre transição de estado proliferativo para um estado de diferenciação que se caracteriza por interrupção do ciclo celular, expressão de genes músculo-específico, reconhecimento célula-célula e formação de miotubos multinucleados. Para o estudo de diferenciação miogênica *in vitro* a linhagem celular C2C12 é um modelo bem estabelecido. Quando os mitógenos são retirados do meio de cultura (privação de soro fetal bovino), fatores de transcrição específicos são ativados, levando à diferenciação em miotubos. Na progressão do estado proliferativo para o de diferenciação participam diversas proteínas sinalizadoras. Em estudos anteriores demonstramos que a modulação da atividade da FAK tem papel crítico no processo de miogênese de células C2C12. Níveis relativamente elevados de atividade da FAK determinam a manutenção do estado proliferativo (indiferenciado) através de ativação de ciclinas. Também demonstramos que redução transitória da atividade da FAK é essencial para que as mioblastos C2C12 iniciem o processo de diferenciação terminal em miotubos. No presente estudo foi avaliada a hipótese de que a ação da tirosino-fosfatase SHP-2 determina a redução transitória da quinase de adesão focal (FAK) na transição do estado proliferativo para o estado de diferenciação no modelo de miogênese em células C2C12. A privação do soro fetal bovino induziu uma redução transiente (cerca de 80 % por ~2 horas) da fosforilação da FAK no resíduo de Tyr-397, detectada através de anticorpo fosfoespecífico anti-FAK-pY<sup>397</sup>. Não foi observada mudança na expressão da proteína FAK durante o período experimental. Experimentos de co-imunoprecipitação foram realizados para avaliar se a redução do nível de fosforilação da FAK é acompanhada de sua associação com SHP-2. Observou-se aumento de cerca de 2 vezes na associação entre FAK e SHP-2 no período coincidente com os níveis baixos de fosforilação da FAK. Para avaliar o efeito da SHP-2 na redução transitória da pFAK padronizou-se o silenciamento de SHP-2 em células C2C12 nos estados de proliferação e diferenciação. Após a transfecção com *siRNA*<sup>SHP2</sup> nas células C2C12 foi feita a extração total de proteínas em diferentes tempos para avaliar o nível de expressão da SHP-2 no estado de proliferação. Foi observada menor expressão desta proteína após 12 horas ao período de transfecção. Depois da transfecção em meio de cultivo com o silenciamento de SHP-2 padronizados em 12 horas as células foram induzidas a se diferenciarem através da privação de soro fetal bovino. A depleção de SHP-2 aboliu a

redução transiente da fosforilação da FAK. Observou-se que a depleção de SHP-2 também impediu a diferenciação terminal dos mioblastos privados de soro fetal bovino em miotubos. Esses dados sugerem que a SHP-2 modula o nível de fosforilação da FAK exercendo papel inibitório na ativação da FAK na transição das células C2C12 no estado de proliferação para diferenciação, influenciando a entrada destas células na diferenciação.

**ABSTRACT**

The myoblasts that form the skeletal muscle are derived from regions of the myotome of somites. In the process of myogenesis occurs transition of proliferative status to a state of differentiation which is characterised by disruption of the cell cycle, expression of muscle-specific genes, cell-cell recognition and training of myotubes multinucleate. For the study of the in vitro differentiation myogenic cell line C2C12 is a model well established. Where mitogens are moved from the culture medium (deprivation of fetal bovine serum), specific transcription factors are activated, leading to the differentiation in myotubes. The progression to the proliferative status of differentiation are involves several signaling proteins. In previous studies we showed that the modulation of the activity of FAK plays a critical role in the process of myogenesis of C2C12 cells. Relatively high levels of activity of FAK determine the maintenance of the state proliferative (indistinct) through activation of cyclin. It also demonstrated that transient reduction of the activity of FAK is essential for the myoblasts C2C12 begin the process of terminal differentiation in myotubes. In the present study was evaluated the hypothesis that the action of tirosino-phosphatase SHP-2 determines the reduction of transient focal membership of kinase (FAK) in the transition of proliferative state to the state of differentiation in the model of miogênese in C2C12 cells. The deprivation of fetal bovine serum produces a transient reduction (about 80% by ~ 2 hours) of the phosphorylation of FAK in the residue of Tyr-397, detected by antibody phsphoespecific anti-FAK-pY397. No change was observed in the expression of FAK protein during the trial period. Coimmunoprecipitation experiments were performed to evaluate whether the reduction in the level of phosphorylation of FAK is accompanied by its association with SHP-2. There was an increase of about 2 times in the association between FAK and SHP-2 in the period coinciding with the low level of phosphorylation of FAK. To evaluate the effect of SHP-2 on the reduction of transient pFAK standardized up the silencing of SHP-2 in C2C12 cells in the states of proliferation and differentiation. It was observed lower expression of this protein after 12 hours the period of transfection. After Transfection in the midst of cultivation with the silencing of SHP-2 standard in 12 hours the cells were induced to differentiate by deprivation of fetal bovine serum. The depletion of SHP-2 abolished the reduction of transient phosphorylation of FAK. It was observed that the depletion of SHP-2 also prevented the terminal differentiation of myoblasts deprived of fetal bovine serum in myotubes. These data suggest that SHP-2

modulates the level of phosphorylation of FAK acting inhibitory role in the activation of FAK in the transition of C2C12 cells in the state of proliferation to differentiation, influencing the entry of these cells in the differentiation.

# **1- INTRODUÇÃO**

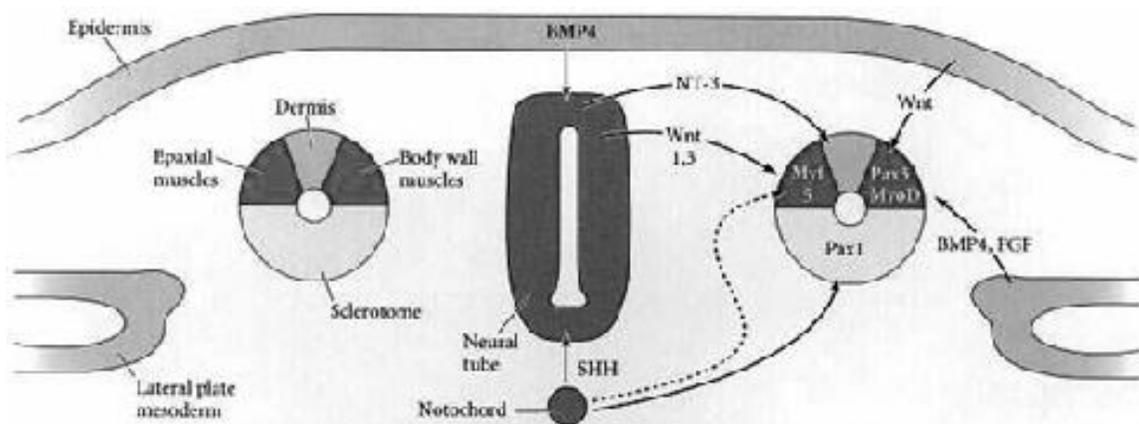
O músculo esquelético de mamíferos exibe uma grande capacidade de crescimento e reparo. No embrião, o mioblasto é responsável por este potencial. Estas células proliferam, diferenciam e fundem-se para formar miotubos e eventuais fibras musculares. No músculo pós-natal, as células satélite encontram-se entre a lamina basal e a membrana plasmática da fibra muscular e são caracterizadas por um núcleo heterocromático, citoplasma esparso com poucas organelas e ausência de miofilamentos. Embora consideradas quiescentes no músculo esquelético saudável, após um estímulo apropriado, como injúria, aumento de carga de trabalho (Snow, 1986) ou por estiramento muscular prolongado (Summers, Ashmore, Lee et al., 1985), as células satélite tornam-se ativas, proliferam e fundem-se com a fibra adjacente, aumentando o número de mionúcleos para o crescimento e reparo da fibra (Allen & Rankin, 1990).

A proliferação e diferenciação das células satélite são processos que podem ser regulados *in vitro* pela concentração de fatores de crescimento específicos. *In vivo*, estes processos são assíncronos: dentro de uma mesma região anatômica, algumas células proliferam enquanto outras diferenciam. Os mecanismos responsáveis por essa assincronia não estão totalmente entendidos, mas baseado em estudos *in vitro*, eles parecem depender da combinação local da concentração de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, interações célula-célula e atributos únicos dos mioblastos que governam a resposta à mitógenos, como receptores de fatores de crescimento na superfície celular e vias de transdução de sinal (Engel & Franzini-Armstrong, 1994; Sastry, Lakonishok, Wu, et al. 1999 ). Assim, na presença de múltiplos fatores externos, a decisão da célula de proliferar ou diferenciar é uma resposta integrada de seu ambiente adesivo e de fatores de crescimento (Sastry & Horwitz, 1996). Podendo levar então à miogênese.

Miogênese é um programa de desenvolvimento de múltiplas etapas que geram o músculo esquelético. A miogênese é requerida para o crescimento, manutenção e reparo das fibras musculares (Parker, M.H. et al., 2003). Isto vem salientar o grande interesse no estudo e esclarecimento deste mecanismo. O conhecimento produzido pode vir auxiliar no tratamento de deficiências das fibras musculares por injúria ou doenças genéticas, além de auxiliar também no desenvolvimento e estudos de células musculares ou precursoras de músculo esquelético *in vitro*.

As células musculares são geradas a partir de células mesodérmicas localizadas nos somitos de embriões de mamíferos, aves, anfíbios entre outros vertebrados. Estas células, ao longo do desenvolvimento embrionário, podem dar origem a células de músculo esquelético, derme e cartilagem, dependendo da sua capacitação. Para serem capacitadas para qual tipo celular elas vão se comprometer, estas recebem influências de proteínas parácrinas produzidas pelo tubo neural, notocorda, epiderme e placa lateral da mesoderme. Este programa de capacitação celular está ilustrado na figura 1.

As células somíticas são então comprometidas à linhagem mioblástica devido a ação de proteínas como Wnt produzidas a partir do tubo neural e epiderme, proteína “sonic hedgehog” (SHH) produzida pela notocorda, “bone morfogenic protein 4” (BMP4) e “fibroblast growth factor” (FGF) produzidas pela placa lateral da mesoderme (Cossu, G. et al., 1996). Estas proteínas são importantes para o comprometimento espacial e temporal destas células quanto ao desenvolvimento do músculo esquelético. Este comprometimento é devido à expressão de MRFs como MyoD e Myf5 que são determinantes para o direcionamento do desenvolvimento destas células. Com a expressão de MRFs estas células precursoras do músculo esquelético são então denominadas de mioblastos.



**Figura 1-** Modelo de um corte transversal de um embrião entre 7 e 8.5 dias de desenvolvimento, mostrando a capacitação das células somíticas em células comprometidas à um determinado tipo celular: miotoma, dermatoma ou esclerotoma; a partir da ação de proteínas parácrinas (Cossu, G. et al., 1996).

Durante a miogênese no embrião, as células miooblásticas se proliferam, migram, diferenciam e fundem-se para formar miotubos e posteriormente fibras musculares. (Figura 2). Nem todas estas células que migram ao longo do organismo do embrião se diferenciam formando células musculares. Algumas células se mantêm com características não diferenciadas de mioblastos e fazem o papel de crescimento, regeneração e manutenção do músculo esquelético adulto. São células quiescentes presentes no músculo esquelético saudável denominadas células satélites, que esperam algum estímulo, como exemplo a injúria do tecido muscular, para serem ativadas e começar a proliferar e diferenciar em células de músculo esquelético, mantendo assim o reparo e o crescimento da musculatura esquelética (Snow, S., 1986; Summers, P.,1985). No músculo pós-natal, as células satélite encontram-se entre a lamina basal e a membrana plasmática da fibra muscular e são caracterizadas por um núcleo heterocromático, citoplasma esparso com poucas organelas e ausência de miofilamentos.



**Figura 2-** Modelo das etapas de desenvolvimento do músculo esquelético (miogênese) (Gilbert, S.F., 2000).

As células satélites deram origem às principais linhagens de mioblastos que são utilizadas no presente para estudos da miogênese *in vitro*, as quais serão citadas e discutidas no decorrer desta introdução.

### **1.1- Fatores de regulação miogênica (MRFs): relação hierárquica, sobreposição de funções, ativação e miogênese**

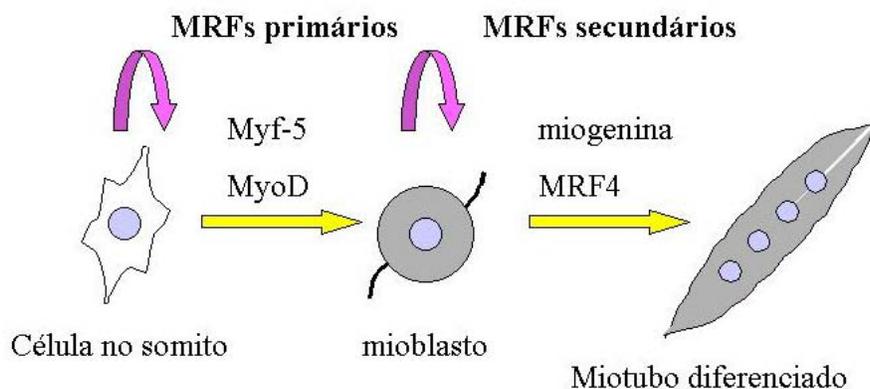
Em resposta a privação de fatores de crescimento, mioblastos em cultura suprimem o ciclo celular e sofrem um processo de comprometimento à diferenciação terminal irreversível. O comprometimento dos mioblastos à diferenciação pode ser detectado por 3 mudanças fenotípicas principais: a incapacidade para reentrar no ciclo celular quando fatores de crescimento são repostos (o estado pós-mitótico), a ativação de transcrição de genes músculo-específicos ( $\alpha$ -actina, receptor acetilcolina, creatina quinase, miosina de cadeia pesada entre outros) e as mudanças na superfície celular que fazem com que as células musculares sejam capazes de se fundirem com outras células similares ou mioblastos nascentes, formando miotubos multinucleados (Engel & Franzini-Armstrong, 1994).

O processo de diferenciação celular do músculo esquelético em vertebrados é governado por uma rede de fatores reguladores musculares. Os fatores de regulação miogênica (MRFs) são parte da superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice básico (bHLH), incluindo c-myc. A subfamília MRF consiste de MyoD (Myf-3), Myf-5, miogenina (Myf-1) e MRF4 (Myf-6/Herculina). Eles possuem a propriedade notável de quando expressos num promotor constitutivo poderem converter um grande número de diferentes tipos celulares, tanto em cultura como em animais transgênicos, em músculo esquelético (Weintraub, 1993; Lassar, Skapek & Novitch, 1994; Sabourin & Rudnicki, 2000).

As proteínas MRFs contêm um domínio básico conservado necessário para a ligação seqüência-específica ao DNA e ativação transcricional; e um sítio hélice-alça-hélice requerido para heterodimerização. Cada um dos MRFs podem heterodimerizar *in vitro* e *in vivo* com proteínas E capazes de se ligar ao DNA de maneira seqüência-específica em sítios conhecidos como E-box (CANNTG). Este motivo de DNA está presente nos promotores de muitos genes específicos de músculo esquelético ( $\alpha$ -actina, receptor acetilcolina, creatina quinase, miosina de cadeia pesada entre outros) e medeia a ativação da transcrição destes genes de maneira dependente de MRF (Lassar & Münsterberg, 1994; Sabourin & Rudnicki, 2000).

Os genes que codificam os 4 MRFs conhecidos são expressos em padrões temporais distintos. Introdução de mutações “null” nos quatro MRFs na linhagem germinativa de camundongos demonstrou a existência de uma hierarquia entre os MRFs, definindo-os em dois grupos, como ilustra a figura 3 : os MRFs primários, MyoD e Myf-5, são requeridos para o comprometimento das células no somito com a linhagem miogênica; e os MRFs secundários, miogenina e MRF4, requeridos como fatores de diferenciação terminal dos mioblastos em seqüência a MyoD e Myf-5 (Sabourin & Rudnicki, 2000).

Deste modo, os eventos no desenvolvimento que dão origem ao músculo esquelético podem ser divididos em duas etapas principais: a primeira etapa é a determinação de qual célula mesodermal multipotente torna-se restrita à linhagem miogênica e a segunda é o comprometimento das células determinadas miogenicamente (mioblastos) à diferenciação terminal. A diferenciação terminal envolve a interrupção do ciclo celular, expressão de proteínas estruturais específicas de músculo esquelético e fusão dos mioblastos levando à formação de miotubos (Song, Wang, Goebel et al., 1998).



**Figura 3-** Os MRFs são divididos em 2 grupos: os MRFs primários, MyoD e Myf-5, requeridos na etapa de comprometimento com a linhagem miogênica das células em proliferação dos somitos; e os secundários, miogenina e MRF4, requeridos para a diferenciação dos mioblastos em miotubos (Sabourin & Rudnicki, 2000).

Uma vez que MyoD seja ativado, continua sendo expresso durante todo o desenvolvimento da célula muscular, possivelmente através da habilidade da proteína MyoD ativar sua própria transcrição (Song, Wang, Goebel et al., 1998). MyoD e Myf-5 são expressos em células miogênicas em proliferação, indiferenciadas; enquanto que miogenina é apenas induzida na diferenciação miogênica e MRF4 é altamente expresso no músculo esquelético maduro (Lassar, Skapek & Novitch, 1994).

Células satélite quiescentes não possuem níveis detectáveis de qualquer um dos quatro MRFs. Após estímulos (ex.: injúria), MyoD é rapidamente superexpresso, o que ocorre anteriormente à expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de proliferação celular. Após a proliferação se encerrar miogenina e MRF4 são expressos na célula que entram no programa terminal de diferenciação. A ausência de mRNA de MRFs na células satélite anterior à ativação sugere que as células satélite representam um linhagem celular tronco que é distinta dos mioblastos. Ainda, a indução *de novo* da transcrição de MyoD e Myf-5 implica que sinais indutivos estão envolvidos nesta ativação, análogos àqueles que ocorrem durante a embriogênese (Sabourin & Rudnicki, 2000).

Estudos mostraram que alguns MRFs podem ser substituídos um pelo outro, sugerindo a existência de uma potencial redundância entre os MRFs (Sabourin & Rudnicki, 2000).

Camundongos com apenas uma cópia de *Myf-5* e nenhuma de *MyoD* não são viáveis e produzem cerca de metade ou menos de RNA de *Myf-5* e miogenina; contudo, camundongos com uma cópia de *MyoD* e nenhuma de *Myf-5* são viáveis e produzem quase a quantidade normal de RNA de *MyoD* e miogenina. Embriões sem *MyoD* ou *Myf-5* não desenvolvem células de músculo esquelético detectáveis. Estes resultados sugerem que a determinação e/ou sobrevivência de precursores miogênicos requerem *MyoD* ou *Myf-5* e que MyoD pode autoregular e compensar para a deficiência mas *Myf-5* e miogenina geralmente não devem ser capazes de fazer o mesmo nestes animais (Weintraub, 1993; Lassar & Münsterberg, 1994).

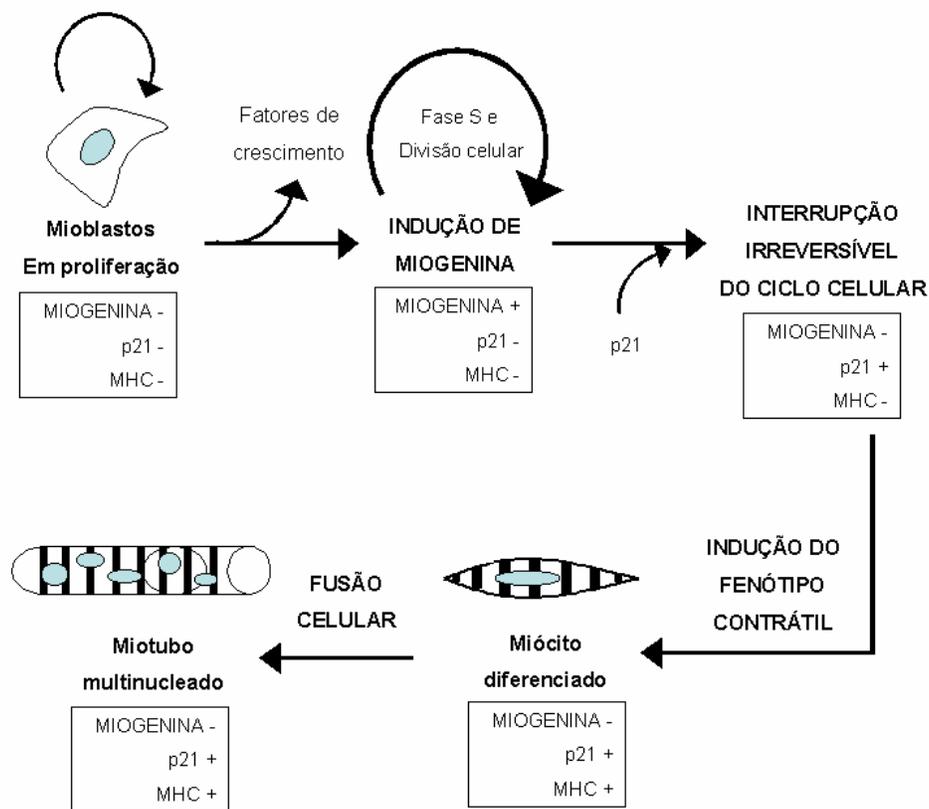
Mutação no gene da miogenina em camundongos revelou uma função crucial deste regulador na diferenciação muscular terminal. Embriões de camundongo que não possuem miogenina morrem imediatamente após o nascimento e exibem várias anormalidades do músculo esquelético. Assim, a miogenina parece ser necessária para a completar o programa de diferenciação *in vivo* (Lassar & Münsterberg, 1994).

Experimentos em cultura de células mostraram que MyoD pode ativar sua própria transcrição bem como a de miogenina; miogenina pode se autoativar assim como MyoD; Myf-5 pode se autoativar bem como MyoD e miogenina. A ativação da miogenina parece ser mediada, em parte, via “downstream” fator de transcrição muscular, MEF2 (Weintraub, 1993).

Muitos dos dados em relação a ativação, autoativação e ativação cruzada entre os membros da família MyoD sugerem que MyoD e Myf-5 *in vivo* são responsáveis primariamente pela mediação da ativação primária, pela definição do estado mioblástico e pelo posicionamento do número de células adequado nas regiões em formação muscular do corpo e pelo recebimento de sinais inibitórios do meio ambiente; que MyoD deve ser primariamente responsivo pela estabilização do estado de autoativação, e que miogenina, uma vez ativada por MyoD ou Myf-5, é usada para ultrapassar o controle negativo *in vivo* e para ativar a maioria (mas não todos) genes estruturais musculares, como creatina quinase, miosina de cadeia pesada (MHC), receptor acetilcolina entre outros (Ossees & Brandan, 2002). MRF4, que possui muitos aspectos em comum com miogenina (isto é, início de expressão tardio), deve também ter parcial sobreposição de função com miogenina, o que pode contribuir à miogênese residual presente em camundongos deficientes em miogenina; e deve possuir função na manutenção ou maturação da fibra muscular esquelética (Weintraub, 1993; Lassar & Münsterberg, 1994).

A base para o antagonismo entre proliferação e diferenciação é a expressão induzida do inibidor do ciclo celular p21 durante a miogênese. A indução de p21 diminui a atividade das quinases dependentes de ciclina (Cdk) envolvidas no controle da transição G1-S do ciclo celular nos miócitos em diferenciação e sua expressão ectópica em mioblastos é suficiente para a interrupção do ciclo celular em meio de cultura rico em mitógeno (Andrés & Walsh, 1996; Zhang, Wong, LIU et al., 1999).

Foi proposto um modelo para a miogênese, ilustrado na figura 4 , um processo altamente ordenado e regulado, separado temporalmente em 4 eventos distintos: primeiro, após a retirada dos mitógenos, MyoD é ativado levando a expressão de miogenina e outros MRFs. A expressão de miogenina marca o comprometimento dos mioblastos à via de diferenciação. Segundo, interrupção irreversível do ciclo celular é sinalizada por um aumento de p21. Terceiro, a expressão de marcadores de diferenciação terminal, como MHC e creatina quinase, que ocorre nas células em diferenciação. Finalmente, a fusão dos miócitos diferenciados leva à formação de miotubos multinucleados e músculo funcional. A perturbação de qualquer estágio deste programa miogênico resultará em comprometimento do desenvolvimento muscular (Andrés & Walsh, 1996; Squillace, Chenault & Wang, 2002).



**Figura 4-** Modelo para a diferenciação miogênica em 4 etapas (Andrés & Walsh, 1996).

## 1.2- Hormônios e fatores de crescimento na diferenciação miogênica

Em resposta a privação de fatores de crescimento, os mioblastos retiram-se do ciclo celular e sofrem um irreversível comprometimento para diferenciação terminal em células do músculo esquelético (Figura 5).

A importância dos hormônios e fatores de crescimento na regulação da proliferação e diferenciação das células musculares é amplamente reconhecida (Florini, J. et al., 1991a).

Análises de como fatores de crescimento mitogênicos controlam o crescimento de células musculares e sua diferenciação tem sido focada primariamente nos fatores “fibroblast growth factor” (FGFs) (Lathrop, B. et al., 1985; Spizz, G. et al., 1986; Spizz, G. et al., 1987; Linkhart, T.A. et al., 1981; Kardami, E. et al., 1985; Kardami, E. and Fandrich, R.R., 1989), insulina e “insulin-like growth factor” (IGFs) (EWTON, D.Z. and Florini, J.R., 1980; Florini, J.R. et al., 1986a; Florini, J.R. et al., 1991b), “platelet-derived growth factor” (PDGFs) (Yablonka-Reuveni, Z. et al., 1990a; Yablonka-Reuveni, Z. et al., 1990b; Yablonka-Reuveni, Z. and Seifert, R.A., 1993; Jin, P. et al., 1990; Jin, P. et al. 1991) e na família de “transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )” (Spizz, G. et al., 1987; Olson, E.N. et al., 1986; Florini, J.R. et al., 1986b). Outros mitógenos que parece ter o mesmo efeito estimulatório de crescimento e propriedades inibidoras de diferenciação são “epidermal growth factor (EGFs) (Lin, R.W. and Hauschka, S.D., 1984a; Han, R.G. et al., 1988) e “leukemia inhibitory factor” (LIF) (Austin, L. and Burgess, A.W., 1991).

FGF é um potente inibidor da diferenciação miogênica, sendo a forma básica a mais potente (bFGF) (Osse & Brandan, 2002). Ele bloqueia uma etapa inicial (ou etapas) nos eventos envolvidos neste processo e, como TGF- $\beta$ , não possui efeito na expressão subsequente dos MRFs. Uma possibilidade de ação do FGF é através do aumento da expressão de oncogenes celulares como *c-fos* e *c-myc* em resposta ao FGF. Estudos mostraram que FGF inibe a expressão de MyoD1 e miogenina (Florini, J. et al., 1991a).

Mioblastos em fase-G1 do ciclo celular quando privados de FGF por apenas 3 horas passam por um processo irreversível de diferenciação, o qual pode ser detectado por 3 principais mudanças: incapacidade de reentrar no ciclo celular quando os fatores de

crescimento são restaurados; ativação de transcrição de genes musculares estruturais; e mudança da superfície celular, fazendo com que as células comprometidas com o programa de diferenciação sejam capazes de se fundirem com células em estágios de diferenciação similares ou nascentes miotubos (Clegg, C.H. et al., 1987; Adams, J and Watt, F., 1993).

“Insulin growth factors” (IGF-I, IGF-II) e insulina são os únicos entre os fatores de crescimento que estimulam ao invés de inibir a diferenciação miogênica, tanto em células em cultura como em células satélite de ratos e células musculares de embrião de galinha. Assim, a estimulação da diferenciação pelos IGFs é um fenômeno geral. Em casos de linhagens celulares como as células C2 que secretam grandes quantidades destes hormônios e podem estimular sua própria diferenciação por mecanismos autócrinos/parácrinos quando incubadas em 2% de soro eqüino (Florini, J. et al., 1991a).

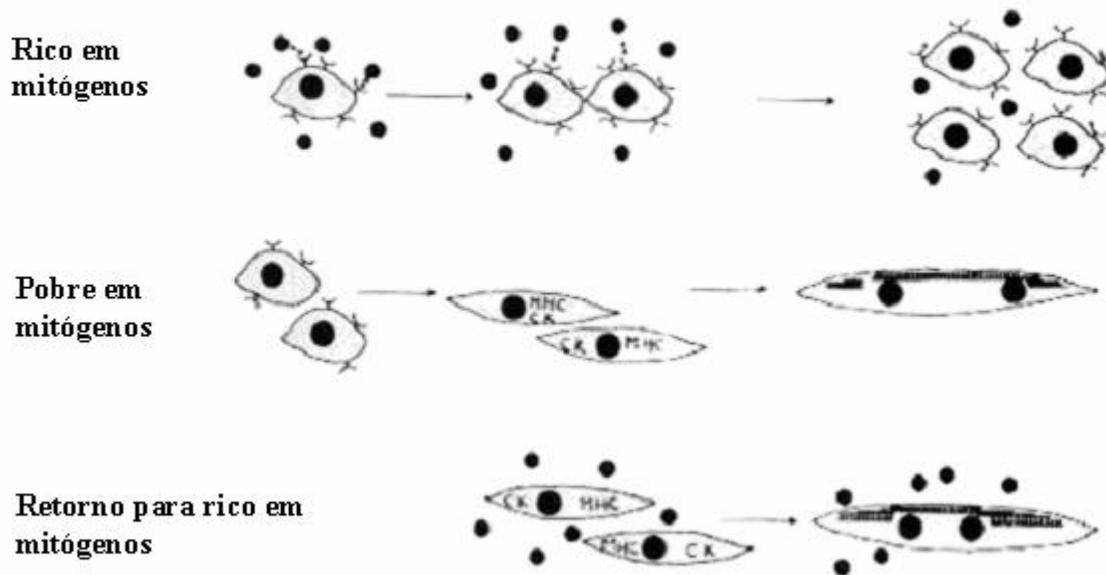
Além da função de estimular a diferenciação, IGF-I e IGF-II também estão relacionados com a sobrevivência celular uma vez que são ativadores da via da PI 3-quinase e Akt (Fujio, Y. et al., 1999).

TGF- $\beta$  bloqueia todos os aspectos da diferenciação miogênica (fusão, elevação da atividade de creatina quinase, aparecimento dos receptores acetilcolina, transição da actina da forma  $\beta$  para  $\gamma$  e expressão de outros RNAs músculo-específicos e proteínas correspondentes) numa maneira dependente de concentração. Ele age numa etapa(s) relativamente inicial (is) na cascata de eventos que levam à diferenciação terminal, pois não possui efeito se adicionado após o tempo necessário para o comprometimento das células. A inibição da diferenciação por TGF- $\beta$  é reversível, sugerindo que TGF- $\beta$  induz um sinal transiente que é rapidamente revertido e não causa danos irreversíveis aos mioblastos. TGF- $\beta$  age provavelmente pela indução da expressão dos oncogenes *jun* e/ou *ras* (Florini, J. et al., 1991a).

Um aspecto importante do comportamento dos receptores de fatores de crescimento é que o desaparecimento do receptor está associado com a diferenciação terminal, tanto *in vivo* como *in vitro* (Engel, A. and Franzini-Armstrong, C., 1994) (Figura 5). A demonstração de que a ligação de “epidermal growth factor” (EGF) em mioblastos de camundongo diminuía quando estas células diferenciavam levou a sugerir

que a perda dos receptores de fatores de crescimento (FGF, TGF- $\beta$ ) deva contribuir para o estado pós-mitótico dos miofibros. Esta generalização não se estende aos IGFs, que são mitógenos ativos para as células musculares e aumentam sua ligação às células durante o programa de diferenciação (Florini, J. et al., 1991a).

### Ambiente celular



**Figura 5-** Diagrama das mudanças dos receptores de fator do crescimento de células musculares, representando o estado pós-mitótico das células musculares terminalmente diferenciadas. Na presença de apropriados mitógenos, as células musculares crescem exponencialmente e mantêm alto nível de receptores em sua superfície. Quando os mitógenos são retirados, as células em proliferação tornam-se terminalmente diferenciadas, expressam genes estruturais músculo-específicos como creatina quinase (CK) e “myosin heavy chain”(MHC) e reprime a expressão de genes dos receptores de fatores do crescimento, que causa o desaparecimento destes receptores na superfície celular. Se os mitógenos são recolocados no ambiente, células musculares diferenciadas apresentam um fenótipo pós-mitótico porque elas não apresentam receptores de fatores de crescimento em sua superfície (Lin, R.W. and Hauschka, S.D, 1984b).

### **1.3- Linhagens utilizadas para o estudo da miogênese *in vitro***

A cultura de células mioblásticas tem sido usada extensivamente no estudo do desenvolvimento do músculo esquelético, assim como para gerar discernimentos sobre mecanismos de homeostase e doenças do músculo esquelético em níveis celulares e moleculares. O uso destas células precursoras de músculo esquelético (células satélites) ou linhagens de células miogênicas derivadas destas células tem facilitado muito estes estudos devido a elas apresentarem um fenótipo proliferativo e diferenciado referente a mioblastos e miotubos respectivamente.

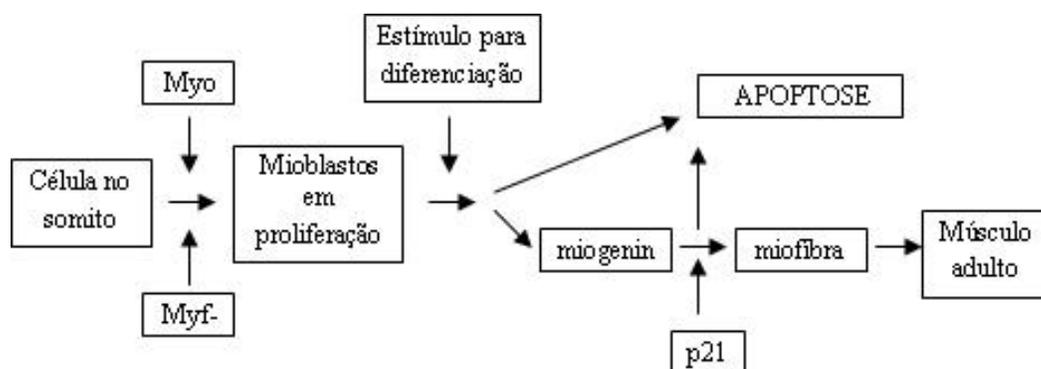
Curiosamente uma das primeiras linhagens utilizadas na determinação de MRFs, foi uma linhagem de fibroblastos embrionários murinos denominada 10T $\frac{1}{2}$ . A partir de estudos de expressão forçada de MRFs nestas células, elas se diferenciavam em células, de características contráteis, musculares (Konieczny, S.F. and Emerson, C.P.Jr., 1984; Konieczny, S.F. and Emerson, C.P.Jr., 1985).

As maiorias das linhagens utilizadas em estudos de miogênese são derivadas de células satélites de músculo esquelético maduro. A mais antiga destas linhagens mioblásticas é a linhagem derivada de tecido muscular de ratos recém-nascidos, denominada L6 (Yaffe, D., 1969). É uma linhagem com características muito semelhantes à linhagem amplamente utilizada nos dias de hoje par o estudo de células musculares, derivadas de camundongos, denominadas C2C12.

Células C2C12 são derivadas da linhagem C2, provenientes de camundongos. É uma linhagem celular miogênica bastante caracterizada e empregada atualmente como modelos de diferenciação em músculo esquelético (Andrés, V. and Walsh, K., 1996; Yoshida, N. et al., 1998; Moran, J. et al., 2002; Yeow, K. et al., 2002; Lansen, R.C.J. et al., 2003). São células que apresentam grande poder de diferenciação miogênica. Na presença de uma alta concentração de soro no meio de cultura, as células proliferam como uma população indiferenciada e expressam MyoD e/ou Myf-5. A diferenciação terminal de C2C12 é tipicamente induzida pela privação de soro, o que leva a uma série de eventos cronologicamente ordenados. Expressão de miogenina é o evento inicial seguido pela interrupção permanente do ciclo celular e expressão de p21, produção de proteínas contráteis e fusão celular resultando na formação de miotubos (Yoshida, N. et al., 1998).

Quando uma cultura de mioblastos C2C12 em proliferação é induzida a diferenciar com privação de soro no meio de cultura, uma porção significativa das células escapa da diferenciação terminal e passa a ter níveis não detectáveis de MyoD ou Myf-5. Essas novas células são referidas como indiferenciadas e quando são retornadas às condições de proliferação, elas passam pelo ciclo celular e retomam a expressão de MyoD, demonstrando-se idênticas à cultura original. Assim, elas são denominadas ‘células reserva’, lembrando algumas características das células satélites *in vivo* (Yoshida, N. et al., 1998).

Apoptose é um processo significativo durante a diferenciação miogênica das células C2C12, como mostra a figura 6. Estudos cinéticos indicaram que a privação de soro sinaliza apoptose em células em proliferação. Durante a miogênese, as células que sobrevivem ao estímulo inicial adquirem um fenótipo resistente à apoptose acompanhado pela expressão de p21, essencial para a supressão da morte celular por apoptose; mas não com o aparecimento de miogenina, um marcador inicial da diferenciação miogênica; e posteriormente fundem-se em células sinciciais, um tipo celular mais resistente aos danos subletais que os mioblastos em proliferação (Fujio et al., 1999; Sandri & Carraro, 1999).



**Figura 6-** Algumas células C2C12 sofrem apoptose durante a diferenciação miogênica (Sandri & Carraro, 1999).

Outros tipos celulares com características mioblásticas foram menos utilizados, mas não menos importantes, apresentam algumas particularidades em cultura como às células MM14 e BC3H1. A MM14 é também uma linhagem derivada de células satélites de

músculo esquelético de camundongos e apresentam características semelhantes à linhagem C2C12, mas para manter a linhagem em proliferação é necessária a adição de FGF e não apenas soro, uma vez que a maioria dos soros não apresenta quantidade significativa de FGF em sua composição (Linkhart, T.A. et al., 1981; Clegg, C.H. et al., 1987). A linhagem BC3H1 é uma linhagem surgiu a partir do tumor de cérebro induzido quimicamente em camundongos e consiste em uma linhagem permanente de células musculares (Schubert D. et al., 1974). Estas células não apresentam expressão de MyoD e não se fundem quando diferenciadas. A diferenciação também ocorre com a privação de fatores de crescimento mas é uma diferenciação reversível quando adicionado fatores de crescimento novamente ao ambiente (Lathrop, B. et al., 1985; Spizz, G. et al., 1986).

Mioblastos, como C2C12, saem irreversivelmente do ciclo celular durante o programa de diferenciação em miotubos. Enquanto a diferenciação progride, as células miogênicas mostram uma propensão reduzida para sofrer apoptose em meio de cultura pobre em mitógenos, provavelmente através da indução de um fator de sobrevivência. Fujio et. Al. (1999) mostraram que a quinase Akt é superexpressa durante a diferenciação miogênica, com conseqüência na sobrevivência do miócito, e assim, definiram um componente do mecanismo no qual a proliferação e apoptose são coordenados durante a miogênese *in vitro*.

Moran et. al. (2002) utilizaram “microarrays” de DNA para caracterizar mudanças no padrão de expressão global de RNAm durante proliferação, interrupção do ciclo celular e diferenciação terminal em mioblastos C2C12. Este estudo revelou 629 sequências reguladas entre mioblastos em proliferação e diferenciação agrupadas em categorias funcionais como contração celular, adesão celular, função da matriz extracelular, metabolismo celular, transporte mitocondrial, replicação do DNA, controle do ciclo celular, transcrição de RNAm e, inesperadamente, regulação imune. A maior parte dos genes regulados exibe marcante mudança de expressão durante as transições de células em proliferação para início de diferenciação e em células no início e final da diferenciação, consistente com a transição mitótica para pós-mitótica e a mudança dramática no fenótipo celular acompanhando a diferenciação miogênica, respectivamente.

#### 1.4- Papel da matriz extracelular no programa de diferenciação

Embora muitos fatores de crescimento afetem de maneira negativa a diferenciação muscular *in vitro*, estudos sugerem que a diferenciação está sujeita a regulação positiva por estímulos do microambiente. A matriz extracelular (MEC) exerce um papel importante na diferenciação muscular. Por exemplo, laminina-1 tem um papel proeminente na promoção da formação de miotubos, adesão e proliferação de mioblastos, enquanto que fibronectina inibe a diferenciação miogênica (Lassar, A. et al., 1994; Adams J. et. al. 1993; Shibamura M. et al., 2002).

Em 2003, Ramon C.J. Lansen e colegas cultivaram células C2C12 sobre uma matriz artificial denominada Matrigel (Kleinman, H.K. et al., 1986), que contém laminina, colágeno IV, entactina e proteoglicanos. Este produto é normalmente utilizado *in vitro* para mimetizar a MEC *in vivo*. Estes pesquisadores aumentaram o poder de diferenciação destas células em cultivo comparado aos protocolos comumente usados (Lansen, R.C.J. et al., 2003). A indução de diferenciação utilizando este protocolo com Matrigel diminuiu significativamente a proliferação celular, podendo ser muito útil para estudos que necessitam uma população homogênea de miotubos.

Estudos mais recentes mostraram que o estímulo mecânico por estiramento de células C2C12 em cultivo, foi suficiente para inibir o programa de miogênese. O estudo mostra que através do estiramento celular houve a ativação de proteínas tirosina-quinase e superexpressão do fator de transcrição NF-kB, o que manteve as células induzidas com fenótipo de proliferação e não diferenciação (Kumar, A. et al., 2004). Isto sugere e reforça a importância da matriz extracelular na regulação da miogênese.

Uma MEC organizada é requisito para a miogênese ocorrer em resposta a estímulos que sinalizam para a diferenciação em músculo esquelético. Aparentemente as interações de receptores específicos presentes na membrana plasmática anexados a MEC geram sinais necessários para guiar a diferenciação. Integrinas representam as prováveis candidatas a receptores de superfície celular para exercer este papel porque agem como componentes críticos de processos nos quais as células assimilam sinais mecânicos do microambiente e possuem papel importante na migração e posicionamento celular. Além

disso, as interações das integrinas também podem regular a expressão gênica e fornecer meios diretos para a sinalização a partir da matriz extracelular influenciando a diferenciação celular (Osses, N. et. al. 2002; Menko S. et. al. , 1987).

Integrinas são uma grande família de glicoproteínas composta por subunidades transmembrana  $\alpha$  e  $\beta$ , que basicamente ligam a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina (Xu, F. et. al. 2001; Boudreau, N. et. al. 1999). Em células cultivadas, as integrinas estão localizadas em sua superfície ventral, em estruturas denominadas complexo de adesão focal, regiões nas quais as células estão fisicamente muito próximas ao substrato. Os complexos de adesão focal consistem de proteínas estruturais (quando associadas ao citoesqueleto: paxilina, tensina, vinculina, actina, distrofina em mioblastos) e regulatórias (quando associadas às integrinas: FAK, Src, Cas entre outras), e desempenham duas funções estruturais importantes na célula: ligação da membrana ao substrato e ancoragem/estabilização do citoesqueleto de actina (Adams J. et. al. 1993; Hynes, R. O., 1992; Kornberg, L. J., 1998).

Os eventos de transdução de sinal iniciados pela MEC culminam em mudanças na expressão gênica. A diversidade das integrinas e suas diferentes especificidades para moléculas da MEC sugerem que diferentes integrinas transmitem sinais distintos para regular a proliferação, diferenciação e apoptose (Sastry, S. and Horwitz, A., 1996).

Estudos recentes de adesão e sinalização celular dependentes de integrina mostraram que a ligação celular à MEC é acompanhada pela agregação de integrina e que poderia sinalizar um aumento na fosforilação em tirosina de algumas proteínas intracelulares, emergindo como um potencial transdutor da sinalização gerada pelas integrinas (Boudreau, N. J and Jones, P. L., 1999; Hynes, R. O., 1992).

Uma vez que integrinas não exibem atividade enzimática intrínseca e que inibidores da atividade de tirosina quinase podem bloquear a formação de adesões focais, os sinais celulares iniciados pelas integrinas devem ser traduzidos através de uma cascata de eventos de fosforilação, sinalizados por proteínas intermediárias que podem iniciar a formação das adesões focais e os caminhos de sinalização intracelular. A primeira candidata para estas proteínas é a proteína tirosina quinase (PTK) pp125<sup>FAK</sup> ou quinase de

adesão focal (FAK); uma vez que, após o aglomeramento de integrinas, há um rápido aumento de fosforilação em tirosina e da atividade quinase da célula (Cary, L. A. et al., 1996; Boudreau, N. J and Jones, P. L., 1999; Schaller, M. D. and Parsons, J. T., 1993).

### **1.5- FAK e sua importância no programa de miogênese**

A FAK foi descrita pela primeira vez em 1992 como uma proteína de alta fosforilação em tirosina associada a v-Src oncogene e localizada nos complexos de adesão focal de células normais (Hanks, S. et al. 1992, Schaller, M. D. et al., 1992). Subsequentemente foi revelado que FAK localiza-se nos sítios de adesão focal celulares junto com a agregação de integrinas (Kornberg, L. et al., 1992; Hanks, S. et al., 2003).

A FAK é um membro da família de proteínas tirosina quinase (PTKs) que inclui Pyk2, FakB, RAFTK e CadTK (Zachary, I., 1997; Owen, J. et al., 1999). A FAK é uma PTK citosólica, não receptora, incomum, como ilustra a figura 7. Ela não contém domínios SH2 e SH3 envolvidos em interação proteína-proteína, mas possui vários sítios para ligação de SH2/SH3 proteínas sinalizadoras, podendo se envolver com uma infinidade de vias de sinalização dependendo do seu contexto de ativação (Parsons, J.T., 2003). Grandes números de estudos mostram sua importância em diferentes processos celulares como: motilidade, proliferação, invasibilidade e sobrevivência.

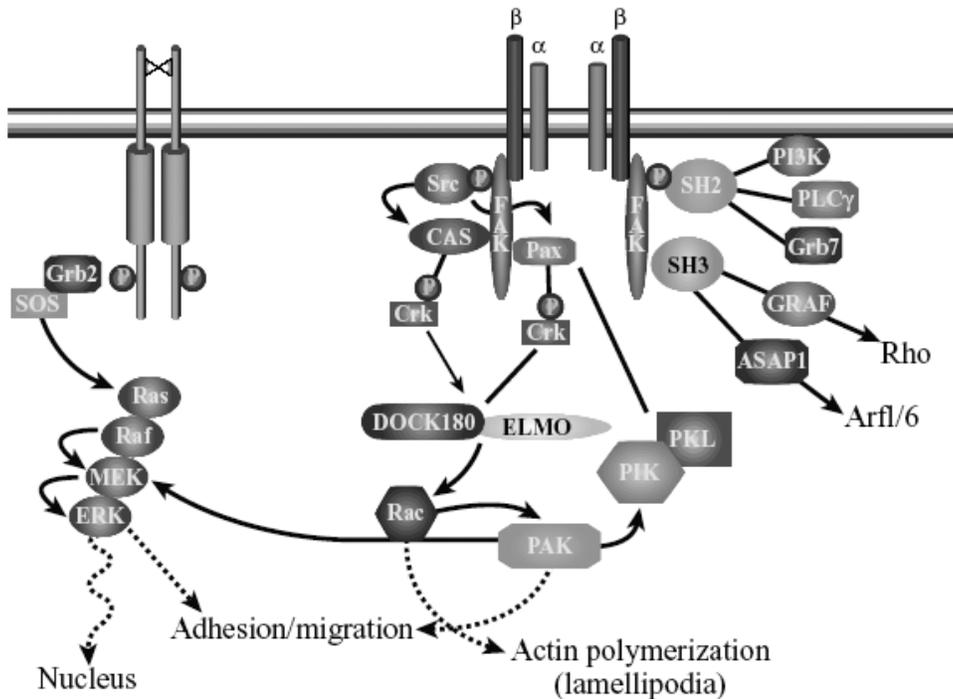
Esta PTK localiza-se no complexo de adesão focal via seu domínio FAT (focal adhesion targeting) C-terminal. Esta localização é crucial para sua função de sinalização, uma vez que mutantes C-terminal da FAK falham em manter sua localização na adesão focal, impedem sua autofosforilação e são inaptos para fosforilar os seus substratos.



aumento do poder de quinase da FAK (Wozniak, M.A. et al., 2004). A Y925 cria um sítio de ligação para o complexo Grb2-SOS, o que liga à FAK a ativação de RAS e MAPKs (Chen, Q. et al., 1994; Schlaepfer, D. D. et al., 1994; Schlaepfer, D. D. and Hunter, T., 1996). A Y861 é muito pouco estudada, mas estudos recentes indicam que pode aumentar o nível de fosforilação da Y397 via transativação (Leu, T. H. and Maa, M. C., 2002).

No seu domínio C-terminal, a FAK contém 4 sítios para fosforilação de serina (Ser722, Ser843, Ser846 e Ser910). A regra da fosforilação das serinas em regulação da função da FAK é pouco entendida; embora a proximidade destas serinas para com os sites de interação proteína-proteína sugere uma regra de modulação e estabilização da ligação de proteínas de sinalização “downstream” (Ma, A. et al., 2001).

Em adição a FAK também tem um domínio N-terminal FERM e dois motivos ricos em prolina, os quais permite a interação com múltiplos parceiros de sinalização. O domínio FERM pode exercer um papel autoinibitório da FAK pela interação com cauda citoplasmática  $\beta 1$  da integrina (Cooper, L.A. et al., 2003). Também existem estudos de interação do domínio FERM com receptores de fatores de crescimento EGF e PDGF ativados, que junto com a fosforilação da Y397, parece ser um fator importante para a motilidade celular (Sieg, D.J. et al., 2000; Schlaepfer, D.D. et al., 2004). Através dos motivos ricos em prolina (SI e SII figura 7) a FAK se liga ao domínio SH3 da Cas e e ao domínio LD2 da paxilina (Schlaepfer, D.D. et al., 2004). Ambas Cas e paxilina são altamente fosforiladas sob estimulação da integrina e isto, em parte, foi atribuída à FAK (Schlaepfer, D.D. et al., 2004). Embora aparentemente a FAK seja importante para a fosforilação dos componentes da adesão focal, modificações constitucionais eliminando sua função quinase mantém a maioria das funções da FAK, sugerindo que a principal regra para a função da FAK é funcionar como uma proteína agrupadora de outras proteínas além da sua função quinase. (Figura 8)



**Figura 8-** Representação da maioria das possíveis interações da FAK no complexo de adesão focal (Parsons, J.T., 2003).

“Splicing” alternativo do gene que codifica FAK pode levar à expressão independente da região carboxi-terminal de FAK, uma proteína chamada FRNK (“FAK related non-tyrosine kinase”) de 41-43 kDa que, provavelmente, age como um inibidor *in vivo* da função de FAK, competindo pelos sítios de ligação de adesões focais e, assim, impedindo a localização de FAK nestas estruturas, além de reduzir a fosforilação em tirosina de FAK (Rodríguez-Fernández, J. L., 1999).

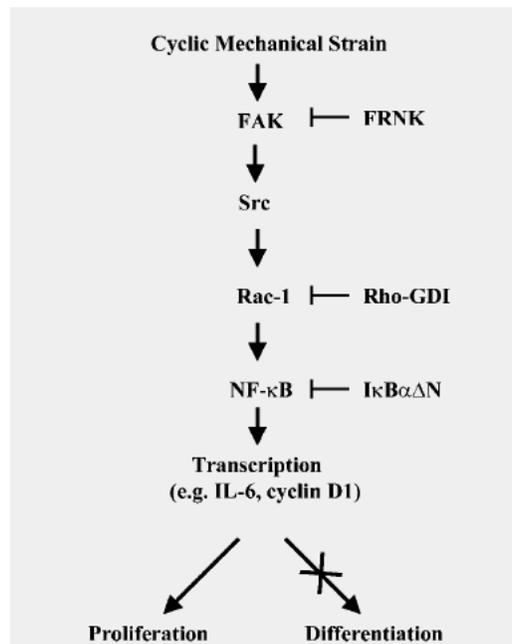
Existem alguns indícios de que a FAK esteja estreitamente relacionada com o programa de diferenciação celular, particularmente no programa de diferenciação miogênica. Experimentos em camundongos têm revelado um papel crítico da FAK na mediação do comportamento celular dependente da MEC. O fenótipo de camundongos deficientes em FAK é de letalidade embrionária, caracterizada pelo migração embrionária retardada, organogênese prejudicada e defeitos vasculares (Boudreau, N. J and Jones, P. L. 1999).

Embora estudos de expressão gênica e diferenciação *in vitro* demonstraram que mutantes de *fak* possuíam desenvolvimento vascular extra e intraembriônico gravemente prejudicado; Ilic, Kovacic, McDonagh et al. (2003), mostraram que a diferenciação tecido-específica de células endoteliais FAK<sup>-/-</sup> era comparável à contraparte selvagem, sugerindo que FAK não era essencial para a diferenciação das células endoteliais e que a deficiência de FAK (FAK<sup>-/-</sup>) prejudicava a habilidade das células endoteliais migrarem e organizarem-se de uma maneira que conduzisse ao desenvolvimento da vasculatura primitiva.

Estudos recentes têm mostrado que a adesão celular mediada por integrinas pode regular vários componentes envolvidos no controle do ciclo celular embora as vias de sinalização intracelulares sejam ainda desconhecidas. Zhao, Reiske & Guan (1998) mostraram que a ciclina D1 e p21 são os dois alvos principais na via de sinalização de FAK na regulação do ciclo celular pelas integrinas. A superexpressão induzida de FAK em células NIH3T3 elevou a expressão da ciclina D1 e diminuiu a de p21 e, assim, acelerou a transição das fases G1-S do ciclo celular.

Trabalhos recentes podem inferir a importância da FAK no programa de diferenciação muscular. O primeiro corresponde à inibição do programa de miogênese devido a expressão da molécula oncogênica constitutivamente ativa v-Src. A expressão de v-Src interferiu no processo regulatório de ativadores transcricionais músculo-específicos em células C2C12, mas os mecanismos como ocorreu esta interferência não foram estudados. Trabalhos envolvendo expressão de v-Src são claros quanto ao seu poder de ativação, via fosforilação de sítios de tirosina, diferentes proteínas sinalizadoras, inclusive sua propriedade de transativar a FAK e sua cascata de sinalização, independente de estimulação de integrinas (Roy, S. et al., 2002). Além disso, a expressão de FRNK, o dominante negativo da FAK, bloqueou efeitos de invasibilidade e metastase experimental nas células v-Src transformadas (Hauk, C.R. et al., 2002) Indicando que a FAK é um forte candidato a substrato da ação quinase da Src. A qual pode modificar o comportamento celular via transativação da FAK (Roy, S. et al., 2002; Hauk, C.R. et al., 2002).

Sastry, Lakonishok, Wu et al. (1999), demonstraram que a expressão ectópica da forma ativada da FAK - CD2-FAK (construção híbrida de FAK e domínio transmembrana da CD2) promove a proliferação e inibe a diferenciação. Outro trabalho que também infere diretamente à FAK no programa de miogênese, propondo até um mecanismo de inibição via FAK, como pode ser observado na figura 9. O trabalho mostra que devido ao *stress* mecânico de células C2C12 e consequente ativação da FAK, Rac-1 GTPase e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, houve inibição do programa de miogênese destas células (Kumar, A. et al., 2004).



**Figura 9-** Possível mecanismo de inibição da miogênese por *stress* mecânico (KUMAR, A. et al., 2004).

Trabalho realizado em nosso laboratório por Clemente et al.(2005) mostrou que a expressão transiente de uma FAK mutada na Y397, tendo a característica de um dominante negativo da FAK (Torsoni, A. et al.,2003), diminuiu a quantidade de marcadores de diferenciação muscular como miogenina e creatina quinase muscular (MCK) em células C2C12 submetidas a privação de fatores de crescimento. Mostrou-se também, um comportamento bifásico da ativação da FAK. Este comportamento bifásico foi verificado com a desfosforilação da Y397 da FAK na primeira hora após indução a diferenciação dos

mioblastos C2C12 e a ativação crescente desta proteína, caracterizada pela fosforilação da Y397, ao longo dos próximos 5 dias de diferenciação. Este comportamento bifásico da FAK indicou ser um fator crítico para a entrada da célula no programa de diferenciação. Corroborando com estes resultados, outros trabalhos de Goel e Dey em 2002 mostraram que ocorreu um aumento da fosforilação da FAK no decorrer do período de miogênese.

Evidências na literatura demonstram que o nível de fosforilação em tirosina da FAK é controlado pela tirosina – fosfatase SHP-2 (Yu et al., 1998; Manes et al., 1999; Vadlamudi et al., 2002; Wichert G.von. et al., 2003 ). Há evidências também de que a regulação da ativação da FAK por estímulo mecânico via integrina/citoesqueleto depende da modulação da atividade da SHP-2 (Wichert G.von. et al., 2003 ).

Estudos em células epiteliais gástricas mostraram que a ativação enzimática da SHP-2 é o que controla diretamente os níveis de fosforilação da FAK nos casos de gastrite, úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico infectados por *Helicobacter Pylori* CagA (Tsutsumi et al; 2006 ).

### **3.6- SHP-2 e sua importância no programa de miogênese**

SHP-2 é uma proteína tirosina-fosfatase (PTP) citoplasmática, amplamente expressa, que contém dois domínios SH2 na porção N-terminal de sua molécula e um domínio PTP na porção C-terminal. A SHP-2 pode tornar-se fosforilada em dois resíduos de tirosina Y542 e Y580, localizados na sua porção C-terminal, em resposta a ativação de receptores de fatores de crescimento (Kontaridis, M.I. et al., 2002; Bennett, A.M. et al., 1996; Feng, G.-S. et al., 1993). Resultados da análise cristalizada da estrutura 3D da SHP-2 tem revelado o mecanismo molecular ao qual o engajamento do domínio N-SH2 com um peptídeo tirosina-fosforilado lidera a atividade da PTP (Hof, P., 1998). Além disso, a ligação de peptídeos tirosina-fosforilados ao domínio N-SH2 da SHP-2 foi relatado como necessário para a ativação do domínio PTP (Lechleider, R.J. et al., 1993).

A atividade catalítica da SHP-2 é requerida em duas situações antagônicas no processo de sinalização celular. Ela pode ser requerida em uma resposta positiva, pela desfosforilação de proteínas que contém resíduos de tirosina-fosforilados que mantém sua molécula inativa. Ou em uma resposta negativa, onde a sua ação fosfatase inativa moléculas que são normalmente ativas quando os resíduos de tirosina estão fosforilados (Neel, B.G. et al., 2003).

Estudos bioquímicos em células de mamíferos sugeriram que a SHP-2 pode participar na transmissão de sinais iniciados pelos receptores de fatores de crescimento (Kontaridis, M.I. et al., 2002; Bennett, A.M. et al., 1996; Feng, G.-S. et al., 1993). A PTP interage fisicamente via seu domínio SH2 com um número de PTKs ligantes e ativadas por receptores, assim como, proteínas citoplasmáticas de sinalização e presumivelmente com funções de promover sinais mitogênicos (Xiao, S. et al., 1994; Noguchi, T. et al., 1994; Milarsky, K.L. et al., 1994; Yu, D.H. et al., 1998). Para definir a biológica função da SHP-2, uma mutação deletéria foi introduzida no locus do gene da SHP-2 em células tronco embrionárias, que resultou na deleção do exon 3, que codificam os resíduos 46-110 correspondente ao domínio N-SH2 da molécula protéica da SHP-2 (Saxton, T.M. et al., 1997). Camundongos mutantes homozigotos, com padrão SHP-2(-/-) morreram ao redor dos dias 8.5-10.5 de gestação, com múltiplos defeitos na mesoderme. Notavelmente, as anormalidades no padrão de organização da mesoderme em embriões SHP-2 (-/-) são similares ao fenótipo de embriões com deficiência em fibronectina e FAK (Furuta, Y. et al., 1995; George, E.L. et al., 1993), sugerindo que SHP-2 e FAK pertencem a uma comum via de sinalização de controle da motilidade celular. Assim como a FAK, a SHP-2 foi incumbida de exercer um papel crítico em vias de sinalização da integrina e em processo celulares como motilidade celular e organização de citoesqueleto, incluindo a regulação do complexo de adesão focal (Yu, D.H. et al., 1998; Wichert, G.V. et al., 2003; Tsuda, M. et al., 1998). Existem evidências de que a SHP-2 e a FAK agem concomitantes para regulação de vias de sinalização celular. Estudos indicam que o “turnover” da FAK; a capacidade de agrupar e desagrupar estruturas dos contatos de adesão, importante fenômeno para o mecanismo de migração celular; é regulada via ação de fosfatase da SHP-2 (Manes, S. et al., 1999). Adicionalmente, mostrou-se que a ação da SHP-2 na desfosforilação da Y925 e Y577 da FAK, foi importante para a regulação do

complexo de adesão de células de câncer de mama humano (Vadlamudi, R.K. et al., 2002). Além disso, fibroblastos SHP-2 (-/-) apresentavam a FAK hiperfosforilada, resultando em modificações da motilidade celular. Estes resultados sugerem que a fosfatase SHP-2 pode funcionar como um fator regulador da atividade da FAK (Yu, D.H. et al., 1998).

Estudos recentes fazem a conotação da SHP-2 na regulação da miogênese. Primeiramente foi evidenciado que durante a miogênese a SHP-2 apresentava-se superexpressada e formando complexo com o “SHP-2 substrate-1”(SHPS-1), inferindo a importância da SHP-2 no programa de miogênese (Kontaridis, M.I. et al., 2001). Também foi verificado a regulação positiva da miogênese pela ação da SHP-2 acoplada a via de sinalização da Rho GTPase, por ação da desfosforilação da molécula inibidora de Rho GTPase, p-190-B Rho GAP (Kontarids, M.I. et al., 2004).

Nossa hipótese é de a ação da tirosino-fosfatase SHP-2 determina a redução transitória da quinase de adesão focal (FAK) na transição do estado proliferativo para o estado de diferenciação no modelo de miogênese em células C2C12.

## **2- OBJETIVOS**

Verificar se a proteína tirosino fosfatase SHP-2 influencia o nível de fosforilação da FAK durante a miogênese.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar a expressão e fosforilação da FAK durante o período inicial de diferenciação de mioblastos
2. Padronizar o silenciamento da Shp2 em células C2C12
3. Avaliar os efeitos do silenciamento da SHP-2 no nível de fosforilação da FAK durante o período inicial de diferenciação de mioblastos.
4. Avaliar os efeitos do silenciamento da SHP-2 no processo de diferenciação do mioblastos C2C12 em miotubos.

### **3- METODOLOGIA**

### **3.1- Cultura de Células**

Foi utilizada a linhagem celular C2C12 (ATCC#CRL-1772) derivada da linhagem C2 proveniente de células do somito embrionário de camundongo C3H que são precursoras de músculo esquelético.

As células C2C12 foram cultivadas em 20 ml de meio de cultivo composto por DMEM (Gibco) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Nutricell) e 1% de penicilina estreptomicina (Penicilina 10.000.000 UI/L - Streptomicina 10g/L - Nutricell), em garrafas de cultura (Corning® 75 cm<sup>2</sup> Flask Cell Culture) mantidas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para não perder a população mioblástica pela confluência, ao atingirem 70% de confluência as células foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos a 1.500 rpm. O pellet formado foi homogeneizado em meio de cultura de cultivo, as células foram contadas com o auxílio do corante de exclusão azul de tripan (0,1% v/v), que seleciona as células viáveis (incolores) das células inviáveis (azuis), na câmara de Neubauer em microscópio invertido e plaqueadas na densidade de 10<sup>5</sup> céls/mL na mesma ou numa nova garrafa esterilizada por calor úmido contendo 15 ml de meio de cultivo. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias para manter seu valor nutritivo até confluência de 70% das células e novo repique.

### **3.2- Ensaio de diferenciação celular**

Caracteristicamente as células C2C12 diferenciam-se em miotubos quando cultivadas em meio pobre em fatores de crescimento como é amplamente descrito em literatura, foi utilizado o protocolo de restrição de nutrientes do meio de cultivo induzindo as células à miogênese.. No presente estudo, as células C2C12 foram plaqueadas em placas de vidro de 90mm de diâmetro na densidade de 10<sup>5</sup> céls/mL. Após 48 horas de plaqueamento, com as células apresentando 70% de confluência, o meio de cultura foi trocado pelo meio de diferenciação (MD) constituído de DMEM (Gibco) acrescido de 2% soro eqüino (Gibco) e 1% de penicilina-streptomicina (Penicilina 10.000.000 UI/L - Streptomicina 10g/L - Nutricell). As células foram mantidas em MD, sendo trocado a cada

24 horas, por períodos variando dentre 1 hora e 2 dias, quando já atingiram certo grau de diferenciação.

### **3.3- Transfecção de *siRNA*<sup>*SHP2*</sup> em células C2C12**

Esta técnica induz a diminuição da expressão gênica por ação pós-transcricional. O siRNA é incorporado em um complexo multiprotéico de silenciamento induzido por RNA (*RISC*). O duplex siRNA é desfeito, a fita anti-sense guia o complexo *RISC* ao mRNA-alvo homólogo que é então degradado.

As células foram plaqueadas em placas de vidro, na densidade de  $10^5$  céls/mL. Após 48 horas de plaqueamento, os mioblastos foram transfectados. Para cada placa, foram incubados 1 $\mu$ g de siRNA em 799  $\mu$ L (DMEN) e 20  $\mu$ L de Lipofectamina (Invitrogen®) em 780  $\mu$ L (DMEN), por 15 minutos em temperatura ambiente, para a formação dos complexos siRNA-lipossoma, conforme bula Lipofectamina Invitrogen®. Durante este período, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 4.8mL de DMEM sem antibiótico em cada da placa. Após a incubação, adicionaram-se 1,6mL da solução de transfecção em cada placa, diretamente sobre as células, e a transfecção prosseguiu por 2 horas, de acordo com Dodds, Dunckley, Naujoks et al., 1998; em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para finalizar a transfecção, foram adicionados 3,6mL de DMEM acrescido de 10% SFB e 1,0% de antibióticos em cada placa, sem a remoção da solução de transfecção.

Após 12 horas, foi feita a troca do meio de cultura para o meio de diferenciação. O extrato total de proteínas das células foi retirado num período de até 48 horas de cultura em meio de diferenciação. A figura 10 mostra o curso temporal do experimento.

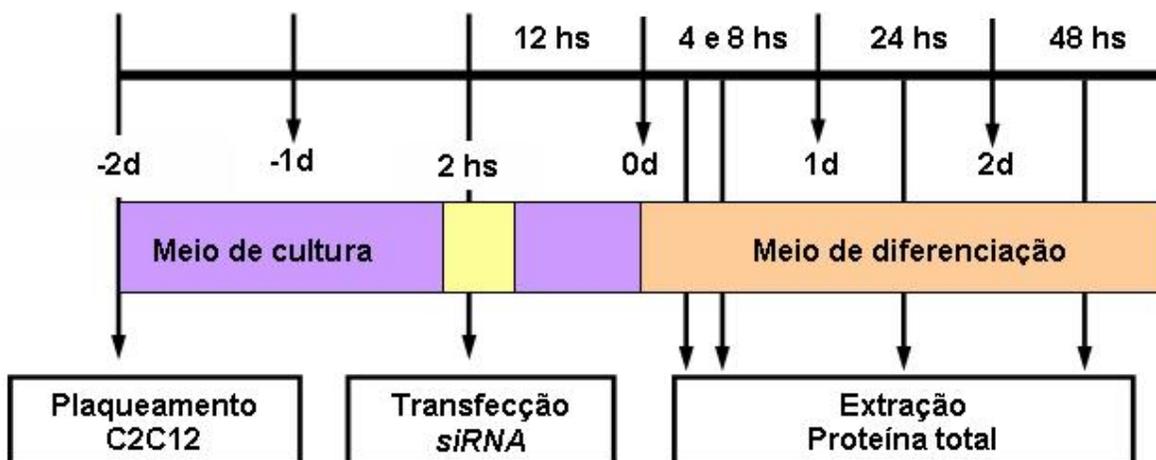


Figura 10- Curso temporal do experimento utilizando siRNA .

### 3.4- Extrato Total de proteínas

As células foram lavadas com PBS e removidas das placas de cultivo em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) e lisadas pela passagem em agulha ultra fina. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry.

Após quantificação das proteínas, 400µL de amostra acrescida de 100µL de tampão de Laemmli (0,0625M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e 0,015g de DTT, foram aquecidos a 100°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer (80°C negativos) para posterior análise das proteínas por western blotting.

### 3.5- Determinação de proteínas pelo método de Lowry

Este método foi escolhido por ser mais sensível e preciso em amostras de baixa concentração protéica e cada amostra foi analisada em triplicata.

Neste método, a cada 1mL de solução C foram adicionados 10µL de amostra e os tubos de ensaio foram incubados por 10 minutos protegidos da luz. Após este período, adicionaram-se 50µL *Folin Chateau (Folin-Ciocalteu)* e as amostras foram incubadas por mais 30 minutos protegidas da luz. Após esta última incubação, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 660nm - Ultrospec 2100 pro Amersham Bioscience®.

Para o cálculo da concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina bovina (Sigma), variando em concentrações de 5,5 µg/µL a 0,5 µg/µL, e os valores de absorbância obtidos das amostras foram comparados para estimar a concentração de proteínas correspondente.

Solução A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,1N NaOH

Solução B<sub>1</sub>: 1% CuSO<sub>4</sub>

Solução B<sub>2</sub>: 2% NaK tartarato

Solução C: para cada 1 mL de solução A, adicionar 100µL de solução B<sub>1</sub> e 100µL de solução B<sub>2</sub>.

### 3.6- Western Blotting

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 10%, utilizando-se o aparelho de eletroforese BIO-RAD miniature lab gel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca); em tampão de corrida (4X: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina).

A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V, em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

A membrana foi incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente, em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos e depois lavadas por 15 minutos em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-FAK (diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) , anti-pFAK 397 (diluição 1:2000, BioSource) e o monoclonal anti-SHP2 (diluição 1:2000, Santa Cruz) em tampão de anticorpo (3% leite em pão desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante toda a noite, a 4°C.

Após serem lavadas por 15 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas com 5µCi de [<sup>125</sup>I] Proteína A (30µCi/Ug) em 10 ml de tampão de iodo (1% leite em pão desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) por 6 horas, em temperatura ambiente, para a imunodetecc o. Após este período, as membranas foram novamente lavadas por 15 minutos em solução basal e postas para secar a temperatura ambiente.

A proteína A [<sup>125</sup>I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada por auto-radiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). As imagens obtidas das membranas foram então quantificadas no programa *Image J 1.36b* .

### **3.7- Colora o hematoxilina-eosina**

Para avaliar a morfologia das células C2C12 nos diferentes estados de prolifera o e diferencia o, foi feita a colora o hematoxilina-eosina (HE).

As células C2C12 foram lavadas com PBS 0,2M e fixadas com metanol por 20 minutos a -20°C. Após o período de fixa o, foram lavadas rapidamente 2 vezes com água destilada.

Adicionou-se hematoxilina de Harris e a lâmina foi incubada por 3 minutos a temperatura ambiente e logo depois lavada 3 vezes e incubada por 10 minutos com água destilada a temperatura ambiente para melhorar o contraste.

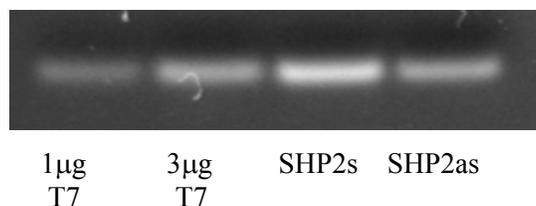
Após esta incubação, a lâmina foi incubada em eosina por 5 minutos e então lavada 3 vezes com água destilada.

Para montar a lâmina, seguiu-se um processo de desidratação pela passagem em bateria de álcoois (70%, 80%, 95%, 2x 100%) e xilol (1 e 2) e para a fixação entre lâmina e lamínula utilizou-se meio de inclusão rápida para microscopia - *entellan*® (Merck).

### 3.8- Síntese de *siRNA*<sup>SHP2</sup> *in vitro*

Foi utilizado um molde de DNA correspondente a posição 797 no mRNA do gene da SHP2 (NM\_011202.2). Como controle foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma seqüência irrelevante (GFP), sem homologia com genes de camundongo. A síntese *in vitro* do *siRNA*<sup>SHP2</sup> e *siRNA*<sup>GFP</sup> foi realizada sob domínio do promotor da RNA polimerase III T7, utilizando o kit Ampliscribe T7 high yield transcription (Epicentre), de acordo com o protocolo do fabricante. 1µL dos RNAs e 1 e 3µg de T7, utilizados como padrão para a quantificação, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM tris-acetato, 2mM EDTA, pH 8,5), e visualizados com luz UV.

As bandas dos géis foram quantificadas por densitometria óptica através do software Image J , e a concentração dos RNAs foi determinada com base no padrão de T7, como mostra o gel representativo da Figura 11 .



**Figura 11-** Gel representativo da quantificação das fitas de RNA. T7= promotor da RNA polimerase III (padrão de quantificação), SHP2s = fita de RNA SHP2 sense, SHP2 as = fita de RNA SHP2 anti-sense.

Após quantificação, quantidades iguais, em  $\mu\text{g}$ , das fitas senso e anti-senso foram incubadas por 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$  e aneladas por resfriamento lento durante a noite. O *siRNA* resultante foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.9- Contagem Celular**

Para avaliar o crescimento das células C2C12 nos diferentes estados de proliferação, diferenciação e após silenciamento da tirosina-fosfatase SHP-2 foi feita a coloração hematoxilina-eosina (descrito anteriormente). Foram colocadas quatro lamínulas em placas em diferentes grupos, proliferação (controle), lipofectamina (controle lipofectamina) e placas com células transfectadas com *siRNA<sup>SHP2</sup>* coradas em diferentes tempos de diferenciação. Foi utilizado o programa *Image Pro Express* para a captura de imagem das lamínulas, sendo necessário a captura de 8 imagens de cada lamínula para realizar a varredura para a contagem, o programa *Biocolor Scanner Pro 2* desenvolvido em nosso laboratório foi utilizado para a contagem celular .

### **3.10- Análise estatística**

Os dados foram apresentados em distribuição normal e variância homogênea. Diferenças entre três ou mais grupos foram testadas por análises de variância (ANOVA) sendo o teste *post hoc* o de Bonferroni para avaliar as diferenças entre os grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

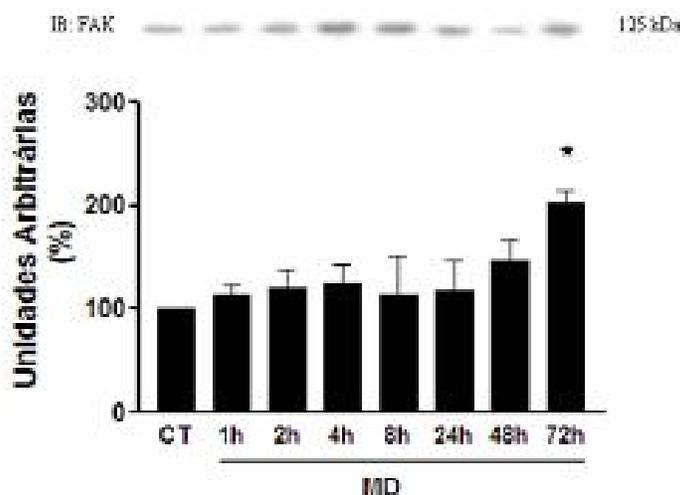
## **4- RESULTADOS**

#### 4.1- Expressão da FAK em células C2C12 durante a diferenciação miogênica

Para avaliar a importância da FAK no processo de diferenciação de células C2C12 inicialmente examinamos sua expressão nos estágios de proliferação e diferenciação através de *western blotting*. Mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de vidro de 90 mm, após 48 horas foi adicionado meio de diferenciação. Os mioblastos em proliferação que não foram estimulados à diferenciação, no início do experimento, foram utilizados como controle.

Células em proliferação e nos diferentes dias de diferenciação foram extraídas e seus homogenatos separados em SDS-PAGE 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imunomarcadas com anticorpo primário anti-FAK (porção N-terminal) e reveladas com o Kit *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent* para quimioluminescência.

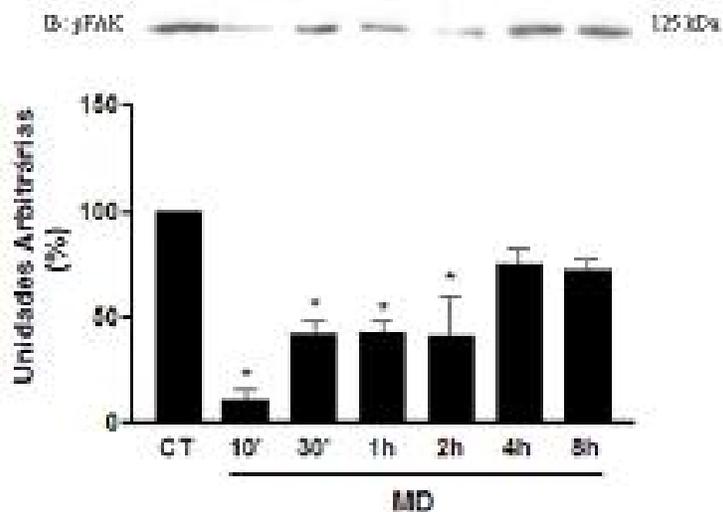
Como demonstrado na figura 12, durante a diferenciação miogênica, a expressão de FAK não varia significativamente.



**Figura 12-** Representação da expressão de FAK no cultivo de C2C12 em MD no período inicial de indução a miogênese.

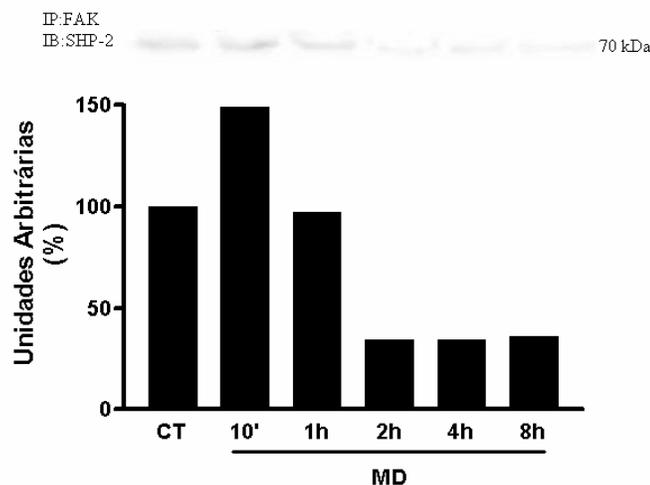
#### 4.2- Atividade da FAK em células C2C12 durante a diferenciação miogênica

A fosforilação no resíduo 397 da FAK e, portanto, sua atividade, diminui nas primeiras horas de diferenciação e aumenta gradualmente nas horas seguintes em meio de diferenciação. A análise da atividade da FAK (pFAK) indicou diminuição na atividade durante o período curto inicial (figura 13).



**Figura 13-** Representação de valores percentuais médios (n=6) da quantidade de proteínas marcadas com pFAK em células C2C12 em proliferação (CT) e diferenciação (10'-8h). \*P < 0,05

### 4.3- Associação da FAK/SHP-2 em células C2C12 durante indução à miogênese



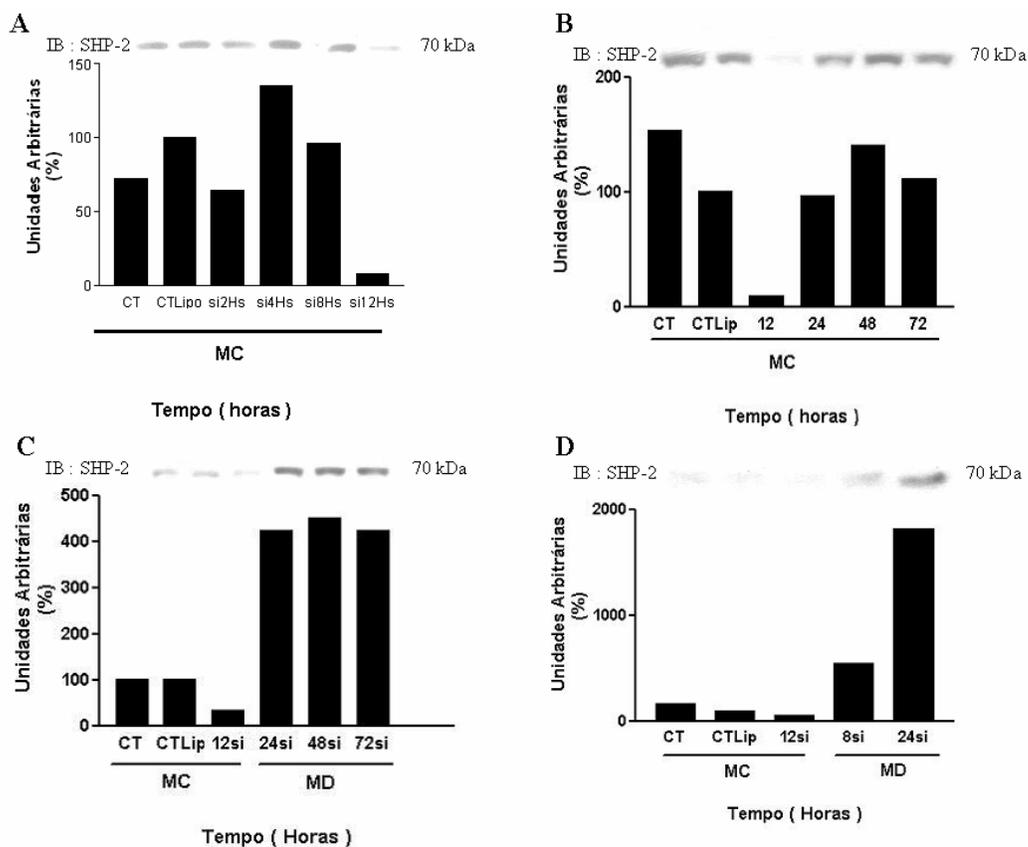
**Figura 14-** Representação gráfica da interação da proteína tirosino-fosfatase SHP-2 com a FAK em células C2C12 induzidas à miogênese. Ensaio de coimunoprecipitação do anticorpo específico anti-FAK e blot com anti-SHP-2 das amostras de proteínas controle (CT), 10 minutos (10'), 1 hora (1h), 2 horas (2h), 4 horas (4h) e 8 horas (8h) de indução a diferenciação de células C2C12 em meio de diferenciação (MD). IP=imunoprecipitado; IB=imunoblotting. (Experimento representativo: cada tempo possui extração de proteínas de 3 placas de petri . n=3)

Como podemos observar o nível de interação da FAK com a SHP-2 tem um aumento exatamente no período da primeira hora correspondente ao período de desfosforilação da Y-397 da FAK, observado por Clemente *et al.* 2005.

### 4.4- Padronização do Silenciamento em células C2C12: *siRNA*

Após a transfecção com *siRNA* nas células C2C12 foi feita a extração em diferentes tempos para avaliar o nível de expressão da SHP-2 em meio de cultivo. Foi observada menor expressão desta proteína após 12 horas ao período de transfecção. Conseqüente a este tempo houve retorno normal na expressão de SHP-2 ( Figura 15B).

Logo à transfecção em meio de cultivo (MC) e indução destas células a se diferenciarem (MD), após o silenciamento de SHP-2, houve superexpressão desta proteína sugerindo aumento na proliferação celular.



**Figura 15- A** - Representação de valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com SHP-2 em células C2C12 em meio de cultivo transfectadas com *siRNA<sup>SHP2</sup>* com extrato total de proteínas em diferentes tempos (horas).

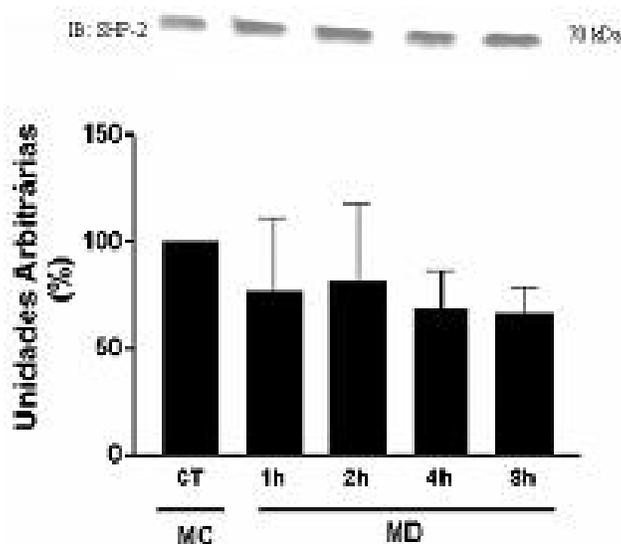
**B** - Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com SHP-2 em células C2C12 nas mesmas condições de “A”, extrato total de proteína com tempos adicionais, 24; 48 e 72 horas após observação do silenciamento em 12 horas.

**C** - Exemplos representativos de *blots* realizados com extrato total de proteína de C2C12 transfectadas com *siRNA<sup>SHP2</sup>* e anticorpo anti-SHP-2, em proliferação (MC – meio de cultivo) e diferenciação (MD – meio de diferenciação).

**D** – Representação de valores percentuais médios de extrato total de C2C12 em mesmas condições de “C” das amostras controle (CT), controle de células com lipofectamina (CTLipo), 12 horas após transfecção com *siRNA<sup>SHP2</sup>* (12si), 8 horas após transfecção (8si) e 24 horas após transfecção (24si). IB=imunoblotting. (Experimento representativo: cada tempo possui extração de proteínas de 3 placas de petri . n=3)

#### 4.4.1- Expressão da SHP-2 em células C2C12 durante a diferenciação miogênica

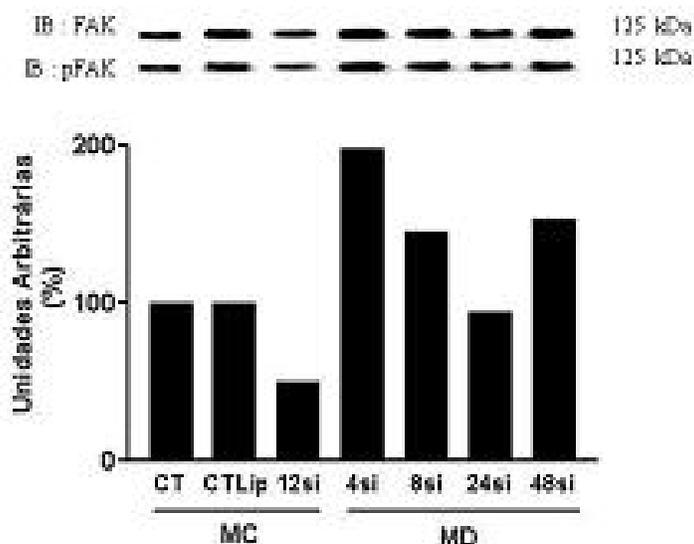
Para avaliar a importância da SHP-2 no processo de diferenciação de células C2C12 inicialmente examinamos sua expressão nos estágios de proliferação e diferenciação através de *western blotting*. Mioblastos C2C12 foram plaqueados em placas de vidro de 90 mm, após 48 horas foi adicionado meio de diferenciação. Os mioblastos em proliferação que não foram estimulados à diferenciação, no início do experimento, foram utilizados como controle. Durante a diferenciação miogênica, a expressão de SHP-2 não varia significativamente (Figura 16).



**Figura 16-** Representação da expressão da SHP-2 em células C2C12 no período inicial de indução a miogênese. (n=6) \*P< 0,05

#### 4.5- Efeito do Silenciamento da SHP-2 na atividade da FAK

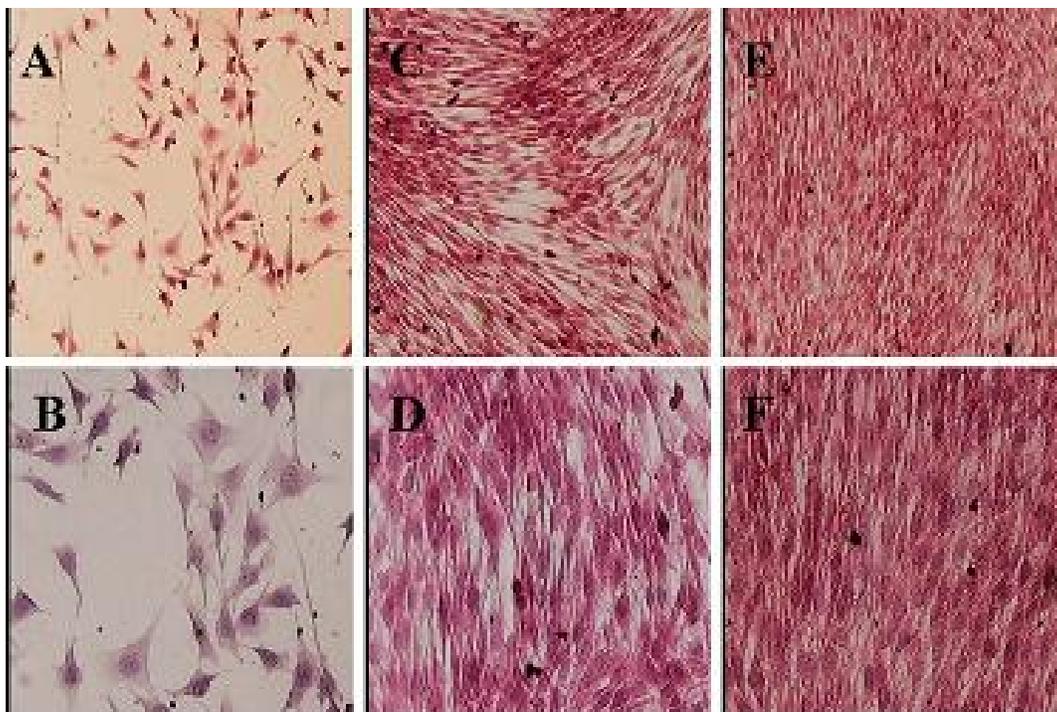
Para avaliar a atividade da FAK nas primeiras horas ao silenciamento da SHP-2 nas células C2C12 induzidas à diferenciação foi feita extração total de proteínas e transferidas para membranas de nitrocelulose, marcadas com anticorpo pFAK e normalizadas pela quantidade de FAK nestas células. Foi observado um aumento em sua atividade (fosforilação) nestas células induzidas ao estímulo para diferenciarem, principalmente no período de 4 horas após transfecção com *siRNA*.



**Figura 17-** Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com pFAK normalizada pela quantidade de FAK em células C2C12 transfectadas com *siRNA<sup>SHP2</sup>* em proliferação (MC) - controle (CT), controle de células com lipofectamina (CTLip) e 12 horas após transfecção (12si) ; com meio de diferenciação (MD) – 4 horas (4si) ,8 horas (8si) ;24 horas (24si) e 48 horas (48si) após transfecção em meio de diferenciação. (Experimento representativo: cada tempo possui extração de proteínas de 3 placas de petri . n=3)

#### 4.6- Características fenotípicas das células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação em músculo esquelético.

Para a análise das características fenotípicas de células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação, mioblastos C2C12 foram plaqueados na densidade de  $10^5$  céls/mL em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. Após 48 horas, quando atingiram 70% de confluência, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se meio de diferenciação (soro equino 2%, sem soro fetal bovino). Após 24 horas em meio de diferenciação os miotubos já podiam ser observados e após 48 horas a fusão celular se completou (figura 18 C-D, E-F). Durante os primeiros dias em cultura, antes do aparecimento dos miotubos, são observadas células com citoplasma e núcleo aumentados em relação às células em proliferação. Na Figura 18 são apresentados exemplos representativos de células C2C12 coradas com HE observadas em microscopia convencional, respectivamente, nos estágios de proliferação e diferenciação.



**Figura 18-** Exemplos representativos de células C2C12 nos estágios de proliferação e diferenciação  
**A, B**-proliferação; **C, D**-24 horas de diferenciação; **E, F**-48 horas de diferenciação.  
 HE - Aumento 100x: (“A”; “C” e “E”). Aumento 200x: (“B”; “D” e “F”)

Como demonstrado na figura 18A, os mioblastos são células pequenas, com morfologia semelhante à dos fibroblastos, que em meio de cultura rico em mitógenos mantém-se em proliferação. Quando atingem a confluência, algumas células entram em diferenciação terminal pelo contato célula-célula. Assim, a cultura foi mantida em cerca de 70% de confluência para evitar a perda da população de mioblastos. Assim, foi possível observar que os mioblastos emitem prolongamentos para manter contato com células próximas. Além disso, estas células apresentam características do processo de migração celular, como demonstrado pela presença de lamelipódios (figura 18B).

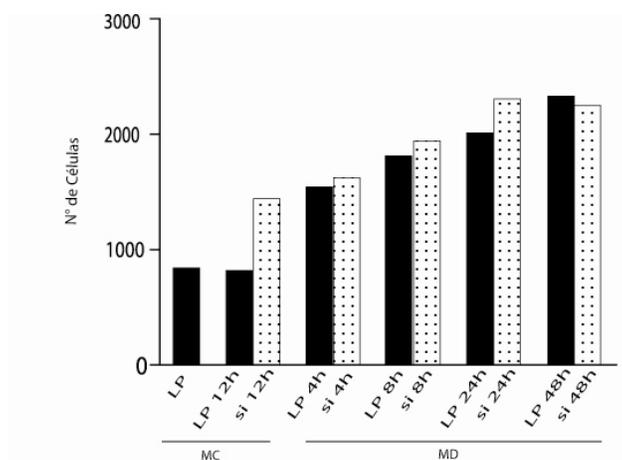
A presença de lamelipódios já não é mais constante (figura 18C, D). A análise por microscopia óptica permite observar que, em relação aos mioblastos em proliferação, estas células passam a apresentar arranjos celulares definidos, a análise de microscopia confocal observado por Clemente et al. 2005 mostra organização dos filamentos de actina

corados por rodamina, quando comparado os resultados a organização celular é evidente, sugerindo aos arranjos definidos uma organização de fibras de actina.

Após 48 horas em cultura, os miotubos começam a se formar. Os miotubos caracterizam-se pela presença de núcleos enfileirados, formando sincícios que se organizam de forma semelhante às fibras musculares (figura 18E). A figura 18F ilustra um exemplo representativo dos miotubos, observados em microscopia óptica, aumento 200x. Nota-se que os miotubos possuem mais actina e são células mais alongadas que os mioblastos em proliferação. Além disso, não se observam os prolongamentos característicos de células em migração.

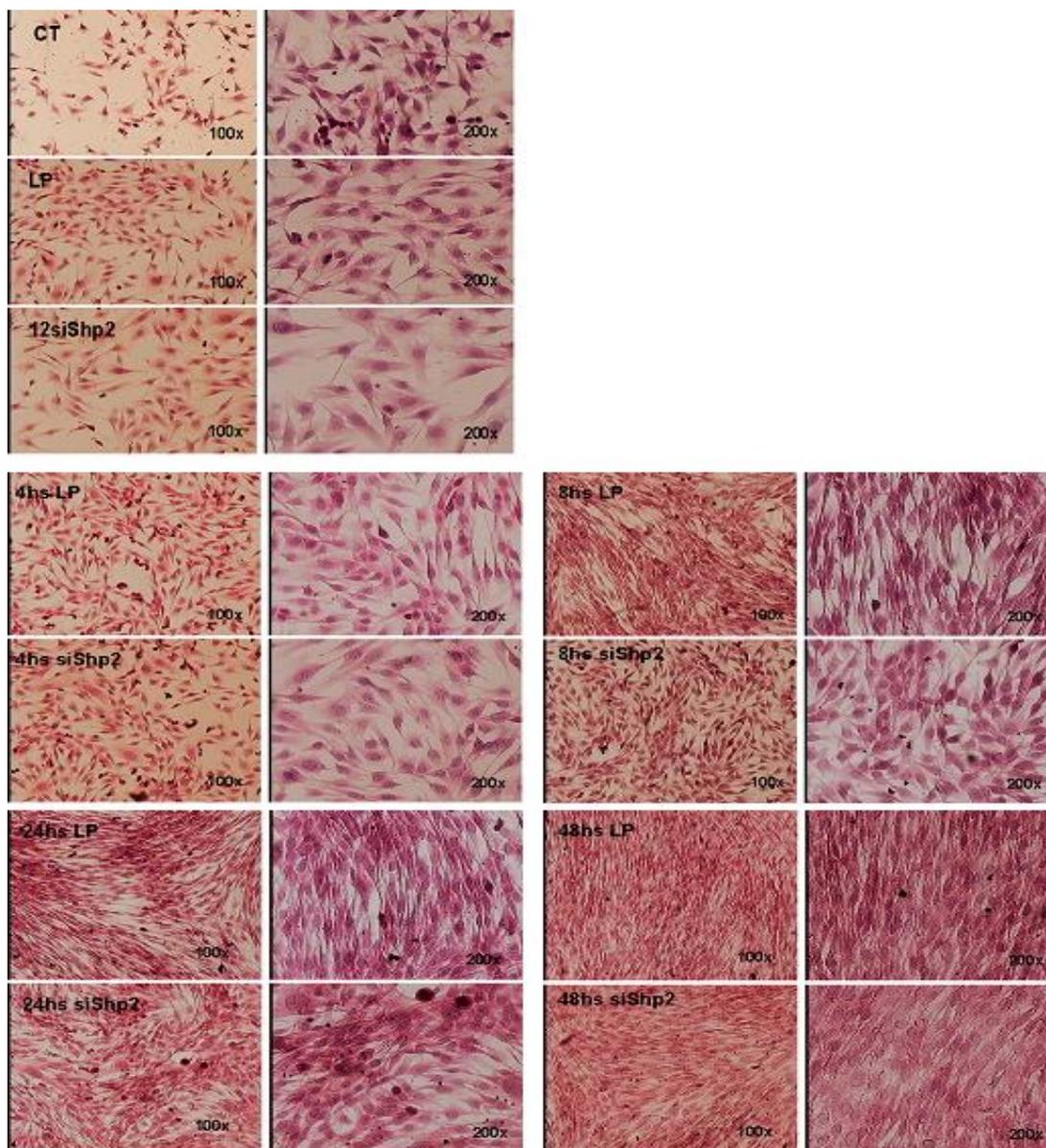
#### 4.7- Efeito do silenciamento de SHP-2 na proliferação das células C2C12

Na avaliação da proliferação celular foram analisados dois grupos em mesmas condições de cultivo e indução ao estímulo para diferenciação: Grupo de células com Lipofectamina e grupo de células transfectadas com *siRNA*. Após contagem das células e comparação entre os grupos foi observado aumento na proliferação celular no grupo transfectado com *siRNA<sup>SHP2</sup>* com significativo aumento no tempo de 12 horas após transfecção (Figura 19).



**Figura 19-** Gráfico representativo da proliferação das células C2C12 em meio de cultivo (MC) e meio de diferenciação (MD) após horas de transfecção com *siRNA<sup>SHP2</sup>* (4;8;24 e 48 horas)

#### 4.8- Efeito do silenciamento de SHP-2 na diferenciação e nas características fenotípicas das células C2C12



**Figura 20-** Exemplos representativos das células C2C12 transfectadas com *siRNA*<sup>SHP2</sup> e coradas em diferentes tempos, 12 horas em meio de cultivo, 4;8;24 e 48 horas com meio para indução à diferenciação, e grupos controle de lipofectamina nas mesmas condições das células transfectadas.

Para avaliação fenotípica das células C2C12 transfectadas com *siRNA* as células foram divididas em grupos : Transfectadas com *siRNA*<sup>SHP2</sup> (siShp2) e Lipofectamina (LP) conforme experimento realizado para análise da proliferação celular.

Em análise de observação foi identificado que as células controle (CT), e controle lipofectamina (LP) possuem características de células em normal proliferação, mioblastos pequenos com emissão de lamelipódios, melhor visualizados no aumento 200x. (Figura 20)

No grupo de células transfectadas com *siRNA*<sup>SHP2</sup> as células apresentam-se com núcleos maiores, conseqüentemente, possuem a característica de um estado celular hipertrófico. Até 24 horas após a transfecção é observada uma desorganização dos arranjos celulares em comparação ao grupo Lipofectamina. Com 48 horas nota-se a reorganização celular, levando a uma possível formação de miotubos com destaque para os grandes núcleos que as células transfectadas possuem em comparação ao grupo controle lipofectamina.

## **5- DISCUSSÃO**

O presente estudo foi avaliar o papel da tirosino-fosfatase SHP-2 nos níveis de fosforilação da FAK, no período inicial de diferenciação da linhagem celular miogênica C2C12.

Demonstramos que a redução transitória da atividade da FAK é essencial para que as mioblastos C2C12 iniciem o processo de diferenciação terminal em miotubos. A privação do soro fetal bovino induziu uma redução transiente (cerca de 80 % por ~2 horas) da fosforilação da FAK.

É possível que a inibição inicial da atividade da FAK decorre da retirada súbita dos fatores de crescimento quando o meio de cultura é substituído por meio próprio para a diferenciação. Sabe-se que a atividade da FAK é regulada por sinais do ambiente através da adesão celular e por fatores de crescimento e agonistas (e.g. angiotensina II e endotelina) de receptores acoplados à proteína G (GPCR – G protein coupled receptors), sendo lhe atribuída à função de coordenação de respostas celulares a sinais de natureza mecânica e humoral (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Juliano, 2002). Níveis relativamente elevados de atividade da FAK determinam a manutenção do estado proliferativo (indiferenciado) através de ativação de ciclinas.

A ativação transiente da FAK seja pela adesão, seja pela ação de fatores crescimento, estimula vias de sinalização celular que controlam as ciclinas responsáveis pela manutenção das células em proliferação (Gilmore & Romer, 1996; Schwartz & Assoian, 2002), salientando a importância da FAK em manter as células no ciclo celular (proliferação). Evidências experimentais também indicam que a ativação da FAK ativa vias de sinalização responsáveis pela sobrevivência celular e inibição de mecanismos de ativação das vias celulares que culminam com a apoptose (Gervais, Thornberry, Ruffolo Et Al., 1998; Alahari, Reddig & Juliano, 2002; Hanks, Ryzhova, Shin et al., 2003).

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstrados por Clemente et al 2005 avaliou a importância da FAK na diferenciação dos mioblastos C2C12 em miotubos através da transfecção com o plasmídeo contendo a construção do genótipo mutado da FAK, o códon correspondente a tirosino 397 foi substituído por uma fenilalanina (dominante negativo F397). Estes resultados mostraram que a expressão induzida da FAK mutante em

células C2C12 induziu a expressão elevada do marcador de diferenciação muscular miogenina ainda nas células em proliferação, durante o processo de diferenciação miogênica, mas aboliu substancialmente a fusão das células em miotubos impedindo a progressão das células C2C12 para a diferenciação terminal, mantendo-as então em processo de proliferação.

Nossos resultados de co-imunoprecipitação mostraram aumento de cerca de 2 vezes na associação entre FAK e SHP-2 no período coincidente com os níveis baixos de fosforilação da FAK indicando que a SHP-2 está envolvida no processo de desfosforilação da Y397 da FAK no período inicial da miogênese.

Observamos que o aumento da associação FAK/SHP-2 durante a miogênese ocorreu com os níveis de expressão de SHP-2 inalterados, isto pode estar envolvido com a regulação da atividade da SHP-2. O mecanismo pelo qual a SHP-2 exerce sua função, bem como seus alvos na célula, ainda não está bem elucidado. Tem sido descrito que a ativação da SHP-2 é dependente da ligação de uma proteína fosforilada em resíduo de tirosina no domínio N-SH2 (Hof. et al, 1998; Feng, 1999; Neel, Lu, Pao, 2003), e que a autodesfosforilação é característico dessa enzima quando não está associada à uma proteína ligante (Lu,Shen,Cole,2003; Araki, Neel, 2003). Assim a dissociação da FAK/SHP-2 permite que a FAK aumente sua autofosforilação no resíduo tirosino 397, sendo que esta dissociação seja suficiente para que esta molécula se auto-fosforile ao longo da diferenciação miogênica.

Para avaliar o efeito da SHP-2 na redução transitória da pFAK padronizamos o silenciamento de SHP-2 em células C2C12 nos estados de proliferação e diferenciação, utilizando a técnica de interferência por RNA (iRNA), que implica na introdução de uma dupla fita de RNA na célula, sendo uma ferramenta altamente eficiente na determinação da função gênica [Tuschl T & Borkhardt A 2002; Dykxhoorn D et al., 2003]. Esta técnica induz a diminuição da expressão gênica por ação pós-transcricional. O siRNA é incorporado em um complexo multiprotéico de silenciamento induzido por RNA (*RISC*). O duplex siRNA é desfeito, a fita anti-sense guia o complexo *RISC* ao mRNA-alvo homólogo que é então degradado. Esta degradação diminui a tradução do gene em proteína [Dykxhoorn D et al., 2003].

Nossos resultados indicam um silenciamento da SHP-2 após 12 horas da transfecção de siRNA<sup>SHP-2</sup> nas células em proliferação. A partir desses dados o tempo de 12 horas após a transfecção foi o ponto inicial para induzir as células a se diferenciarem, substituindo o meio de cultura (proliferação) pelo meio de diferenciação e então observar os efeitos do silenciamento da SHP-2 na diferenciação dessas células.

Observamos que após o silenciamento e indução de diferenciação nas decorrentes horas (8 a 48 horas) houve uma superexpressão da proteína SHP-2, indicando que nas células após o silenciamento da SHP-2 a FAK manteve-se fosforilada permitindo à estas células permanecerem no ciclo celular no estado de proliferação. Podemos especular que a expressão de SHP-2 nas decorrentes horas após diferenciação decorreu do aumento da proliferação celular mantida pela FAK fosforilada em seu resíduo tirosino 397 neste curto período inicial na indução da diferenciação não permitindo a fusão celular e conseqüente formação de miotubos.

Confirmando estes achados, observamos nas primeiras horas ao silenciamento da SHP-2 nas células C2C12 induzidas à diferenciação um aumento na atividade (fosforilação) da FAK, principalmente no período de 4 horas, estando estes níveis maiores em relação ao mesmo período nas células não transfectadas.

Corroborando com estes resultados a avaliação da proliferação celular mostrou um aumento na proliferação principalmente no grupo transfectado com siRNA<sup>SHP-2</sup> no período de 12 horas em comparação ao grupo controle (Lipofectamina) no mesmo período. Este é o período em que há maior silenciamento da SHP-2 e conseqüente manutenção da fosforilação da FAK, não sofrendo a ação fosfatase da SHP-2, e permitindo a permanência destas células no ciclo celular. No decorrer das horas no grupo de células transfectadas houve um discreto aumento na proliferação celular em comparação ao grupo controle (Lipofectamina) indicando a dificuldade de se manter o silenciamento por siRNA em células em proliferação, devido ao fato que o siRNA não é transferido para as novas células durante a mitose, e sendo permitido a estas novas células já em meio de diferenciação entrarem em diferenciação.

Em análise de observação através de microscopia óptica foi identificado que as células controle (CT), e controle lipofectamina (LP) possuem características de células em normal proliferação, mioblastos pequenos com emissão de lamelipódios, melhor visualizados no aumento 200x. (Figura 21)

No grupo de células transfectadas com *siRNA*<sup>SHP2</sup> as células apresentam-se com núcleos maiores, conseqüentemente, possuem a característica de um estado celular hipertrófico. Até 24 horas após a transfecção é observada uma desorganização dos arranjos celulares em comparação ao grupo Lipofectamina. Com 48 horas nota-se a reorganização celular, levando a uma possível formação de miotubos com destaque para os grandes núcleos que as células transfectadas possuem em comparação ao grupo controle lipofectamina.

Semelhante aos nossos resultados, dados recentes da literatura mostram que experimentos com fibroblastos deficientes em SHP-2 (SHP-2<sup>-/-</sup>) aumentam de tamanho em comparação aos fibroblastos wild type (WT). Isto decorre através da regulação do crescimento celular pelo controle da via mTOR/S6K1 pela SHP-2. A regulação negativa de SHP-2, através do fibroblastos deficientes em SHP-2 em meio de privação a fatores de crescimento superexpressou a S6K1. A S6K1 (*S 6 ribosomal kinase 1*) é um membro da família AGC de proteínas kinases que controlam o crescimento celular, esta é diretamente ativada por mTOR (*mammalian of target rapamycin*) que atua na integração de sinais de mitógenos, nutrientes, e *status* de energia para o controle de crescimento celular (tamanho e massa celular), e progressão do ciclo celular, em parte da ativação da S6K1. (C. Zito, H. Qin, Bennett; 2007). Mais evidências mostra que TSC2 (*tumor suppressor proteins*) regula negativamente o crescimento celular através da inibição da via mTOR, através de uma GTPase Rheb ligando-se diretamente à mTOR e estimulando a atividade kinase. Neste estudo foi identificada a interação FAK/TSC2 e mostrado que TSC2 é fosforilada por FAK na regulação da ativação da S6K1 e crescimento celular (B. Gan, Y. Yoo, J. Guan; 2006).

Estes achados indicam que com a depleção de SHP2 a FAK permanece fosforilada, fosforilando a TSC2 que por sua vez quando permanece ativa inibe a Rheb, esta GTPase quando inibida deixa de inibir a mTOR, a S6K1 ativada pela mTOR ativa o ciclo e o crescimento celular.

Observou-se que a depleção de SHP-2 impediu a diferenciação terminal dos mioblastos privados de soro fetal bovino em miotubos, sugerindo que a SHP-2 modula o nível de fosforilação da FAK exercendo papel inibitório na ativação da FAK na transição das células C2C12 no estado de proliferação para diferenciação, influenciando a entrada destas células na diferenciação.

## **6- CONCLUSÃO**

A depleção de SHP2 por silenciamento gênico induz a proliferação em células C2C12, e bem como observado a hipertrofia nessas células, é possível que estes efeitos sejam desencadeados pela ativação simultânea da FAK. Estudos adicionais com inibição simultânea da FAK deverão confirmar esta hipótese e também avaliar os mecanismos transcricionais e de pós-tradução envolvidos neste processo.

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, J.; WATT, F.. "Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix". **Development**, 117: 1183-98, 1993.

AKAGI, T.;MURATA, K.;SHISHIDO, T. AND HANAFUSA, H.. "V-Crk activates the phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras".**Mol. Cell. Biol.** 22:7015-7023, 2002.

ALLEN, R.; RANKIN, L.. "Regulation of satellite cells during skeletal muscle growth and development". **P S E B M**, 194: 81-6, 1990.

ANDRÉS, V.; WALSH, K.. "Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis". **J Cell Biol**, 132 (4): 657-66, 1996.

AUSTIN, L.; BURGESS, A.W.. "Stimulation of myoblast proliferation in culture by leukemia inhibitor factor and other cytokines. **J. Neurol. Sci.** 101: 193, 1991.

BENEZRA, R.; DAVIS, R.L.; LASSAR, A. et al.. "Id: A negative regulator of helix-loop-helix dna binding proteins: control of terminal myogenic differentiation". **Ann. Ny Acad. Sci.** 599: 1, 1990

BENNETT, A.M.; HAUSDORFF, S.F.; O'REILLY, A.M.; FREEMAN, R.M.; AND NELL, B.G.. "Multiple requirements for shptp2 in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression". **Mol. Cell. Biol.** 16: 1189-1202, 1996.

BOUDREAU, N. J; JONES, P. L.. "Extracelular matrix and integrin signaling: the shape of things to come". **Biochem J**, 339: 481-8, 1999.

CHEN, H. C. AND GUAN, J. L.. "Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase". **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa** 91: 10148-10152, 1994.

CHEN, H. C.;APPEDDU, P. A.;ISODA, H. AND GUAN, J. L.. "Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase". **J. Biol. Chem.** 271: 26329-26334, 1996.

CLEGG, C.H.; LINKHART, T.A.; OLWIN, B.B.; HAUSCHKA, s.d.. "Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in g1 phase and is repressed by fibroblast growth factor". **J. Cell. Biol.** 105: 949, 1987.

CLEMENTE, C.F.M.Z.; CORAT, M.A.F.; SAAD S.T.O.; FRANCHINI, K.G.. "Differentiation of c2c12 myoblasts is critically regulated by fak signaling" . *Am. J. Physiol.* 289:862-870, 2005.

COOPER, L.A.; SHEN, T.-L.; GUAN, J.-L.. "Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction". **Mol. Cell Biol.** 23: 8030-8041, 2003.

COSSU, G.; TAJBAKSH, S.; AND BUCKINGHAM, M.. "How is myogenesis initiated in the embryo?". **Trends genet.** 12: 218-223, 1996.

DODDS, E.; DUNCKLEY, M.; NAUJOKS, N.; MICHAELIS, U.; DICKSON, G.. "Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of lipofectamine and dosper". **Gene therapy**, 5: 542-51, 1998.

DYKXHOOM DM. ; NOVINA CD.; SHARP PA. "Killing the messenger: short rnas that silence gene expression" **nat rev mol cell biol.** 2003 jun;4(6):457-67. Review

ENGEL, A.; FRANZINI-ARMSTRONG, C.. **Myology. 2a. Edição.** New york: ed. Mc graw-hill, 1994. P.3-118, v.1.

EWTON, D.Z.; FLORINI, J.R.. "Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity, and growth hormone on myoblasts and myotubes in culture". **Endocrinology** 106: 583, 1980.

FLORINI, J.; EWTON, D.; MAGRI, K.. "Hormones, growth factors, and myogenic differentiation". **Annu rev physiol**, 53: 201-16, 1991a.

FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z.; FALEN, S.L.; VAN WYK, J.J.. "Biphasic concentration dependency of stimulation of myoblast differentiation by somatomedins". **Am. J. Physiol.** 250: c78, 1986a.

FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z.; ROOF, S.L.. "Insulin-like growth factor-i stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenic gene expression". **Mol. Endocrinol.** 5: 718, 1991b.

FLORINI, J.R.; ROBERTS, A.B.; EWTON, D.Z. et al.. "Transforming growth factor-beta: a very potent inhibitor of myoblast differentiation, identical to the differentiation inhibitor secreted by buffalo rat liver cells". **J. Biol. Chem.** 261: 16509, 1986b.

FUJIO, Y.; GUO, K.; MANO, T.; MITSUUCHI, Y.; TESTA, J.; WALSH, K.. "Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of akt, a positive modulator of myocyte survival". **Mol cell biol**, 19(7): 5073-82, 1999.

FURUTA, Y.; ILIC, D; KANAZAWA, S.; TAKEDA, N.; YAMAMOTO, T.; AND AIZAWA, S. **Oncogene** 11: 1989-1995, 1995.

GEORGE, E.L.; GEORGES-LABOUESSE, E.N.; PATEL-KING, R.S.; RAYBURN, H.; AND HYNES, R.O. **Development (camb.)** 119: 1079-1091, 1993.

GILBERT, S.F.. **Developmental biology**- sexta edição. Sinauer association, inc., publisher. Sunderland, massachusetts. 453-454, 2000.

GOEL, H.L.; DEY, C.S.. "Focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation is associated with myogenesis and modulated by insulin". **Cell prolifer**, 35: 131-42, 2002.

GOEL, H.L.; DEY, C.S.. "Pkc-regulated myogenesis is associated with increased tyrosine phosphorylation of fak, cas, and paxillin, formation of cas-crk complex, and jnk activation". **Differentiation** 70: 257-271, 2002.

HAN, D. C. AND GUAN, J. L.. "Association of focal adhesion kinase with grb7 and its role in cell migration". **J. Biol. Chem.** 274: 24425-24430, 1999.

HAN, R.G.; ST CLAIR, J.A.; WEBSTER, C.; BLAU, H.M.. "Improved media for normal human muscle satellite cells: serum-free clonal growth and enhanced growth with low serum". **In vitro cell dev. Biol.** 24: 833, 1988.

HANKS, S.; CALALB, M.; HARPER, M.; PATEL, S.. "Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin". **Proc natl acad sci**, 89: 8487-91, 1992.

HANKS, S.; RYZHOVA, L.; SHIN, N.; BRABEK, J.. "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility". **Front biosci**, 8: d982-96, 2003.

HAUK, C.R.; HSIA, D.; PUENTE X.S.; CHERESH, D.A. AND SCHLAEPFER, D.D.. "Frnk blocks v-src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth". **The embo journal** 21: 6289-6302, 2002.

HEININGER, Y.M.W.. "Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stage of myogenesis". **In vitro cell dev. Biol.- animal** 39: 163-169, 2003.

HOF, P.; PLUSKEY, S.; DHE-PAGGANON, S.; ECK, M.J.; AND SHOELSON, S.E.. "Crystal structure of the tyrosine phosphatase shp-2". **Cell** 92: 441-450, 1998.

HYNES, R. O.. "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion". **Cell**, 69: 11-25, 1992.

ILIC, D; KOVACIC, B.; MCDONAGH, S.; JIN, F.; BAUMBUSCH, C.; GARDNER, D.; DAMSKY, C.. "Focal adhesion kinase is required for blood vessel morphogenesis". **Circ res**, 92: 300-7, 2003.

JEN, Y.; WEINTRAUB, H.; BENEZRA, R.. "Overexpression of id protein inhibits the muscle differentiation gene myod1". **Genes dev**. 6: 1488, 1992.

JIN, P.; RAHM, M.; CLAEISSON-WELSH, L.; HELDIN, C.H.; SEJERSEN, T.. "Expression of pdgf alpha-chain and beta-receptor genes during rat myoblast differentiation". **J. Cell biol.** 110: 1665, 1990.

JIN, P.; SEJERSEN, T.; RINGERTZ, N.R.. "Recombinant platelet-derived growth factor-bb stimulates growth and inhibits differentiation of rat l6 myoblasts". **J. Biol. Chem.** 266: 1245, 1991.

KARDAMI, E.; FANDRICH, R.R.. "Basic fibroblast growth factor in atrial and ventricles of the vertebrate heart". **J. Cell biol.** 109: 1865, 1989.

KARDAMI, E.; SPECTOR, D.; STROHMAN, R.C.. "Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography. **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa** 82: 8044, 1985.

KIN, S.J.; KIN, K.Y.; TAPSCOTT, S.J. et al.. "Inhibition of protein phosphatases blocks myogenesis by first altering myod binding activity". **J. Biol. Chem.** 267: 15140, 1992.

KLEINMAN, H.K.; MCGARVEY, M.L.; HASSEL, J.R. et al.. "Basement membrane complexes with biological activity". **Biochemistry** 25: 312-318, 1986.

KONIECZNY, S.F.; EMERSON, C.P.JR.. "5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10t1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination". *Cell* 38: 791, 1984.

KONIECZNY, S.F.; EMERSON, C.P.JR.. "Differentiation, not determination, regulates muscle gene activation: transfection of troponin i genes into multipotential and muscle lineages of 10t1/2 cells". **Mol. Cell Biol.** 5: 2423, 1985.

KONTARIDIS, M.I.; LIU, X.; ZHANG, L.; AND BENNETT, A.M.. "Role of shp-2 in fibroblast growth factor receptor-mediated suppression of myogenesis in c2c12 myoblasts". **Mol. Cell. Biol.** 22: 3875-3891, 2002.

KONTARIDIS, M.I.; LIU, X.; ZHANG, L.; AND BENNETT, A.M.. "Shp-2 complex formation with the shp-2 substrate-1 during c2c12 myogenesis". **J. Cell sci.** 114: 2187-2198, 2001.

KONTARIDS, M.I.; EMINAGA, S.; FORNARO, M.; ZITO, C.I.; SORDELLA, R; SETTLEMAN, J.; AND BENNETT, A.M.. "Shp-2 positively regulates myogenesis by coupling to the rho gtpase signaling pathway". **Mol. Cell. Biol.** 24: 5340-5352, 2004.

KORNBERG, L. J.. "Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis". **Head & neck**, 20: 745-52, 1998.

KUMAR, A.; MURPHY, R.; ROBISON, P.; WEI, L.; AND BORIEK, A.M.. "Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, rac-1 gtpase, and nf-kb transcription factor". **the faseb journal**, 18: 1524-1535, 2004.

LANSEN, R.C.J.; SCHOLS, A.M.W.J.; KELDERS, M.C.J.; WOUTERS, E.F.M.; AND JANSSEN-HEININGER, Y.M.W.. "Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stage of myogenesis". **In vitro cell dev. Biol.- animal** 39: 163-169, 2003.

LASSAR, A.; MÜNSTERBERG, A.. "Miring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis". **Curr opin cell biol**, 6: 432-42, 1994.

LASSAR, A.; SKAPEK, S.; NOVITCH, B.. "Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal". **Curr opin cell biol**, 6: 788-94, 1994.

LATHROP, B; OLSON, E.; GLASER, L.. "Control by fibroblast growth factor of differentiation in the bc3h1 muscle cell line". **J cell biol**. 100: 1540, 1985.

LECHLEIDER, R.J.; SUGIMOTO, S.; BENNETT, A.M.; KASHISHIAN, A.; COOPER, J.A.; SHOELSON, S.E.; WALSH C.T.; AND NELL, B.G.. "Activation of the sh2-containing phosphotyrosine phosphatase sh-ptp2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ ". **J. Biol. Chem**. 268: 21478-21481, 1993.

LEU, T. H. AND MAA, M. C.. "Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at tyr-397". **Oncogene** 21: 6992-7000, 2002.

LIN, R.W.; HAUSCHKA, S.D.. "A rapid decrease in epidermal growth factor-binding capacity accompanies the terminal differentiation of mouse myoblast in vitro. **J. Cell biol**. 98: 739, 1984b.

LIN, R.W.; HAUSCHKA, S.D.. "Egf responsiveness and receptor regulation in normal and differentiation-defective mouse myoblasts". **Dev. Biol**. 105: 48, 1984a.

LINKHART, T.A.; CLEGG, C.H.; HAUSCHKA, S.D.. "Myogenic differentiation in permanent clonal myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in culture medium. **Dev. Biol**. 86: 19, 1981.

MA, A.; RICHARDSON, A.; SCHAEFER, E. M. AND PARSONS, J. T.. "Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(cas)". **Mol. Biol. Cell** 12: 1-12, 2001.

MANES, S.; MIRA, E.; GOMEZ-MOUTON, C.; ZHAO, Z.J.; LACALLE, R.A.; MARTINEZ, A.. "Concerted activity of tyrosine phosphatase shp-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility". **Mol. Cell Biol.** 19: 3125-3135, 1999.

MENKO, S.; BOETTIGER, D.. "Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation". **Cell**, 51:51-7, 1987.

MILARSKY, K.L.; AND SALTIEL, A.R.. "Expression of catalytically inactive shp-2 tyrosine phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin". **J. Biol. Chem.** 269: 21239-21243, 1994.

MORAN, J.; LI, Y.; HILL, A.; MOUNTS, W.; MILLER, C.. "Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling". **Physiol genomics**, 10: 103-11, 2002.

NEEL, B.G.; GU, H.; AND PAO, L.. "The 'shp'ing news: sh2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling". **Trends biochem. Sci.** 28: 284-293, 2003.

NOGUCHI, T.; MATOZAKI, T.; HORITA, K.; FUJIOKA, Y.; AND KASUGA, M.. "Role of sh-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with src homology 2 domains, in insulin-stimulated ras activation". **Mol. Cell Biol.** 14: 6674-6682, 1994.

OLSON, E.N.. "Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage". **Dev. Biol.** 154: 261, 1992.

OLSON, E.N.; STERNBERG, E.; HU, J.S. ET AL.. "Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor". **J. Cell Biol.** 103: 1799-1986.

OSSES, N.; BRANDAN, E.. "Ecm is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression". **Am j physiol cell physiol**, 282: c383-94, 2002.

OWEN, J.; RUEST, P.; FRY, D.; HANKS, S.. "Induced focal adhesion kinase (fak) expression in fak-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of pyk2". **Mol cell biol**, 19(7): 4806-18, 1999.

PARKER, M.H.; SCALE, P.; AND RUDNICKI, M.A.. "Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis". **Nat. Rev. Genet.** 4:497-507, 2003.

PARSONS, J.T.. "Focal adhesion kinase: the first ten years". **Journal of cell science** 116: 1409-1416, 2003.

PORRELLO, A.; CERONE, M.; COEN, S.; GURTNER, A.; FONTEMAGGI, G.; CIMINO, L.; PIAGGIO, G.; et al.. "P53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of prb". **J cell biol**, 151(6): 1295-303, 2000.

RODRÍGUES-FERNÁNDEZ, J. L.. "Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of fak?". **Bioessays**, 21: 1069-75, 1999.

ROY, S.; RUEST, P.J.; HANKS, S.K.. "Fak regulates tyrosine phosphorylation of cas, paxillin, and pyk2 in cells expressing v-src, but is not a critical determinant of v-src transformation". **J. Cell. Biochem.** 83: 377-388, 2002.

SABOURIN, L.; RUDNICKI, M.. "Development biology: frontiers for clinical genetics". **Clin genet**, 57:16-25, 2000.

SANDRI, M.; CARRARO, U.. " Apoptosis of skeletal muscle during development and disease". **Int j biochem cell biol**, 31: 1373-90, 1999.

SASTRY, S.; LAKONISHOK, M.; THOMAS, D.; MUSCHLER, J.; HORWITZ, A.. "Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation". **J cell biol**, 133:169-84, 1996.

SASTRY, S.; LAKONISHOK, M.; WU, S.; TRUONG, Q.; HUTTENLOCHER, A.; TURNER, C.; HORWITZ, A.. "Quantitative changes in integrin and focal adhesion signaling regulate myoblast cell cycle withdrawal". **J cell biol**, 144 (6): 1295-309, 1999.

SASTRY,S.; HORWITZ, A.. "Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response". **Dev Biol**, 180:455-67, 1996.

SAXTON, T.M.; HENKEMEYER, M.; GASCA, S.; SHEN, R.; ROSSI, D.J.; SHALABY, F.; FENG, G.S.; AND PAWSON , T.. "Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the sh2 tyrosine phosphatase shp-2. **Embo j.** 16: 2352-2364, 1997.

SCHALLER, M. D.; BORGMAN, C. A.; COBB, B. S.; VINES, R. R.; REYNOLDS, A. B. AND PARSONS, J. T.. "Pp125fak a structurally distinctive proteintyrosine kinase associated with focal adhesions". **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa** 89: 5192-5196, 1992.

SCHALLER, M. D.; HILDEBRAND, J. D. AND PARSONS, J. T.. "Complex formation with focal adhesion kinase: a mechanism to regulate activity and subcellular localization of src kinases". **Mol. Biol. Cell** 10: 3489-3505, 1999.

SCHALLER, M. D.; HILDEBRAND, J. D.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W.; VINES, R. R.; AND PARSONS, J. T.. "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125fak, directs sh2- dependent binding of pp60src". **Mol. Cell Biol.** 14: 1680-1688, 1994.

SCHALLER, M. D.; PARSONS, J. T.. "Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase". **Trends cell Biol**, 3: 258-62, 1993.

SCHLAEPFER, D. D. AND HUNTER, T.. "Evidence for in vivo phosphorylation of the grb2 sh2-domain binding site on focal adhesion kinase by src-family protein-tyrosine kinases". **Mol. Cell. Biol.** 16: 5623-5633, 1996.

SCHLAEPFER, D. D.; HANKS, S. K.; HUNTER, T. AND VAN DER GEER, P.. "Integrin-mediated signal transduction linked to ras pathway by grb2 binding to focal adhesion kinase". **Nature** 372: 786-791, 1994.

SCHLAEPFER, D.D.; MITRA, S.K.; ILIC, D.. "Control of motilite and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase". **Bioch. Bioph. Acta** 1692: 77-102, 2004.

SHIBANUMA M, IWABUCHI Y, NOSE K.. "Possible involvement of hic-5, a focal adhesion protein, in the differentiation of c2c12 myoblasts". **Cell struct. Funct.** 27(1):21-7, 2002.

SCHUBERT, D. et al. "Clonal cell lines from the rat central nervous system". **Neurobiology**. 1974;4(6):376-87.

SIEG, D.J.; HAUCK, C.R.; ILIC, D.; KLINGBEIL, C.K.; SCHAEFER, E.; DAMSKY, C.H.; SCHLAEPFER, D.D.. "Fak integrates growth-factor and integrin signal to promote cell migration". **Nat. Cell biol.** 2: 249-256, 2000.

SNOW, S.. "Satellite cell activity during hypertrophy of the rat soleus muscle following surgical ablation of the soleus synergists". **Anat rec**, 214: 125a, 1986.

SONG, A.; WANG, Q.; GOEBL, M.; HARRINGTON, M.. "Phosphorylation of nuclear myod is required for its rapid degradation". **Mol cel biol**, 18(9): 4994-9, 1998..

SPIZZ, G.; HU, J.S.; OLSON, E.N.. "Inhibition of miogenesis differentiation by fibroblast growth factor or type beta transforming growth factor does not require persistent c-myc expression". **Dev. Biol.** 123: 500, 1987.

SPIZZ, G.; ROMAN, D.; STRAUSS, A.; OLSON, E.N.. "Serum and fibroblast growth factor inhibit myogenic differentiation through a mechanism dependent on protein synthesis and independent of cell proliferation. **J. Biol. Chem.** 261: 9483, 1986.

SQUILLACE, R.; CHENAULT, D.; WANG, E.. " Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein chcr". **Dev boil**, 250: 218-30, 2002.

SUMMERS, P.; ASHMORE, C.; LEE, Y.; ELLIS, S.. "Stretch-induced growth in chicken wing muscles: role of soluble growth-promoting factors". **J cell physiol**, 125: 288-94, 1985.

TORSONI, A.; CONSTÂNCIO, S.; NADRUZ JÚNIOR, W.; HANKS, S.; FRANCHINI, K.. "Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes". **Circ res**, 93: 2003.

TSUDA, M.; MATOZAKI, T.; FUKUNAGA, K.; FUJIOKA, Y.; IMAMOTO, A; NOGUCHI, T.; TAKADA, T.; YAMAO, T.; TAKEDA, H.; OCHI, F.; YAMAMOTO, T.; AND KASUGA, M. "Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of shps-1 and its association with shp-2". **J. Biol. Chem.** 273: 13223-13229, 1998.

TSUTSUMI R.; TAKAHASHI A.; TAKESHI A.; HIGASHI H. AND HATAKEYAMA M.. "Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of shp-2 complexed with helicobacter pylori caga". **Mol. Cell biol.**, 2006; 26(1) : 261-276.

TUSCHUL T.; BORKHARD A. "Small interfering rnas: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy." **Mol. Intery** 2002 jun;2(3):158-67

VADLAMUDI, R.K.; ADAM, L.; NGUYEN, D.; SANTOS, M.; AND KUMAR, R.. "Differential regulation of components of the focal adhesion complex by heregulin: role of phosphatase shp-2". **J. Cell. Phys.** 190: 189-199, 2002.

WEINTRAUB, H.. "The myod family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds". **Cell**, 75: 1241-4, 1993.

WICHERT, G.V.; HAIMOVICH, B.; FENG, G.S.; AND SHEETZ, M.P.. "Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by shp2". **The embo j.** 22: 5023-5035, 2003.

WOZNIAK, M.A.; MODZELEWSKA, K.; KWONG, L.; KEELY, P.J.. "Focal adhesion regulation of cell behavior". **Bioch. Bioph. Acta** 1692: 103-119, 2004.

XIAO,S.; ROSE, D.W.; SASAOKA, T.; MAEGAWA, H.; BURKE, T.JR.; ROLLER, P.P.; SHOELSON, S.E.; AND OLEFSKY, J.M.. **J. Biol. Chem.** 269: 21244-21248, 1994.

XING, Z.; CHEN, H. C.; NOWLEN, J. K.; TAYLOR, S. J.; SHALLOWAY, D. AND GUAN, J.L.. "Direct interaction of v-src with the focal adhesion kinase mediated by the src sh2 domain". **Mol. Biol. Cell** 5: 413-421, 1994.

XU, F.; ZHAO, Z. J.. "Cell density regulates tyrosine phosphorylation and localization of focal adhesion kinase". **Exp cell res**, 262: 49-58, 2001.

XUN JIN; JONG-GUN KIM, "Opposite roles of mrf4 and myod in cell proliferation and myogenic differentiation". **Biochemical and Biophysical Research Communications** 364 476-482, 2007.

YABLONKA-REUVENI, Z.; BALESTRERI, T.M.; BOWEN-POPE, D.F.. "Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoform of pdgf". **J. Cell biol.** 111: 1623, 1990a.

YABLONKA-REUVENI, Z.; BOWEN-POPE, D.F.; HARTLY, R.S.. "Proliferation and differentiation of myoblast: the role of platelet-derived growth factor and the basement membrane", in pette d (ed): **The dynamic state of muscle fibers, berlin, de gruyter**, pp. 693-706,1990b.

YABLONKA-REUVENI, Z.; SEIFERT, R.A.. "Proliferation of chicken myoblasts is regulated by specific isoforms of platelet-derived growth factor: evidence for differences between myoblasts from mid and late stage of embryogenesis". **Dev. Biol.** 156: 307, 1993.

YAFFE, D.. "Cellular aspects of myogenesis in vitro. **Curr. Top. Dev. Biol.** 4:37, 1969.

YEOW, K.; CABANE, C.; TURCHI, L.; PONZIO, G.; DÉRIJARD, B.. "Increased mapk signaling during in vitro muscle wounding". **Biochem biophys res commun**, 293: 122-9, 2002.

YOSHIDA, N.; YOSHIDA, S.; KOISHI, K.; MASUDA, K.; NABESHIMA, Y.. "Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of myod and myf-5 generates 'reserve cells'". **J cell sci**, 111: 769-79, 1998.

YU, D.H.; QU, C.K.; HENEGARIU, O.; LU, X.; AND FENG, G.S.. "Protein-tyrosine phosphatase shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion". **J. Biol. Chem.** 273: 21125-21131, 1998.

ZACHARY, I. "Focal adhesion kinase". **Int j biochem cell biol**, 29(7): 929-34, 1997.

ZHANG, P.; WONG, C.; LIU, D.; FINEGOLD, M.; HARPER, J.; ELLEDGE, S.. "P21cip1 and p57kip2 control muscle differentiation at the myogenin step". **Genes dev**, 13(2): 213-24, 1999.

ZHAO, J.; REISKE, H.; GUAN, J.. "Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase". **J cell biol**, 143(7): 1997-2008, 1998.

