



**Ana Catarina Rodrigues
Cardoso**

**Influência de isoformas de Laminina na mecanobiologia de
oligodendrócitos**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Ana Catarina Rodrigues
Cardoso**

**Influência de isoformas de Laminina na mecanobiologia de
oligodendrócitos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob orientação científica do Doutor Mário Martins Rodrigues Grãos, investigador auxiliar do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra e co-orientação da Doutora Sandra Isabel Moreira Pinto Vieira, professora auxiliar convidada do departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Fatores de Competitividade — COMPETE — através do projeto POCI-01-0145-FEDER-007440, com a referência FCT-UID/NEU/04539/2013 e através do projeto POCI-01-0145-FEDER-029516, cofinanciado pelo FEDER através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da FCT / Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através do Orçamento do Estado.

o júri

Prof. Doutor Mário Guilherme Garcês Pacheco
Presidente do júri e diretor de curso

Prof. Doutora Joana Rita Simões Correia
Arguente convidada

Prof. Doutor Mário Grãos
Investigador auxiliar do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade
de Coimbra

agradecimentos

Um especial agradecimento aos meus pais e ao meu irmão por me terem preparado para os desafios da vida, pelo apoio incondicional, por toda a ajuda que me prestaram e por estarem presentes em todos os momentos importantes desta etapa da minha vida. Agradeço especialmente a confiança depositada em mim, o carinho, o amor, a humildade e a educação. Sem eles, nada disto teria sido possível.

Um agradecimento especial ao meu namorado por todo o carinho e paciência, por todas as palavras de incentivo e por estar presente mesmo nos momentos de angústia e desespero. Aos meus amigos Martinho, Joana, Rui e Diana por todo o companheirismo, pelas palavras de incentivo e coragem nos momentos certos e acima de tudo, pela amizade. E com saudade, um agradecimento ao meu eterno amigo Rui Paulo. Até sempre amigo.

Presto um especial agradecimento ao Doutor Mário Grãos pela oportunidade de desenvolver a tese inserida no seu grupo de trabalho, bem como, por toda a orientação e aconselhamento na revisão da tese, sendo o seu contributo fundamental para a realização da mesma. À Doutora Sandra Vieira, co-orientadora, pela disponibilidade prestada.

Ainda um especial agradecimento às minhas colegas de laboratório Tânia Lourenço, Heloísa Gerardo e Catarina Domingues por partilharem comigo os seus conhecimentos e por todo o apoio dentro e fora do laboratório. À Inês Caramelo por me ter recebido e pelo auxílio durante as primeiras semanas. A todas, um grande obrigado pela partilha de ideias, experiências, conselhos, disponibilidade e, acima de tudo, amizade.

Aos demais, que de alguma forma deram o seu contributo para que chegasse com sucesso ao fim desta etapa. A todos presto o meu sincero agradecimento pela ajuda e por estarem envolvidos neste meu percurso, todos de forma diferente, mas todos de forma especial. Vão ficar guardados na minha memória.

palavras-chave

Oligodendrócitos, matriz extracelular, diferenciação, integrinas.

resumo

Uma característica proeminente do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) dos vertebrados é a mielinização, um processo realizado por oligodendrócitos (OLs), amplamente dispersos por todo o SNC adulto.

Evidências crescentes sugerem que a composição e as propriedades mecânicas da MEC (rigidez, elasticidade e topografia) regulam vários aspectos da biologia de OLs. Estudos anteriores revelaram que as proteínas da MEC, como a fibronectina (FN) ou a vitronectina (VN) estão envolvidas na proliferação e manutenção de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs), enquanto que a laminina-2/merosina (LM-211/MN) promove a sua diferenciação em OLs maduros. Evidências recentes do nosso laboratório sugerem o aumento da diferenciação e maturação de OLs *in vitro* com a utilização de substratos que mimetizam o ambiente nativo de OLs (a gama de rigidez do cérebro varia entre 0,1 e 10 KPa) e a potenciação do seu efeito pela presença de MN. No entanto, as proteínas da membrana basal, incluindo a própria MN, são frequentemente difíceis de obter na forma nativa e em quantidades suficientes a partir de tecidos e, desta forma, a produção recombinante tornou-se uma abordagem alternativa valiosa. Além de serem mais económicas, as proteínas recombinantes possuem ainda a vantagem de terem composição bem definida, em contraste com a MN purificada a partir de placenta humana que tem por base uma composição mal definida, apresentando uma mistura de proteínas de MEC.

Este trabalho tem como principal objetivo elucidar o papel da mecanotransdução e de proteínas da MEC (especificamente as lamininas) na diferenciação de OLs, com vista a determinar o seu potencial para serem utilizadas no futuro em substituição às proteínas humanas purificadas tradicionalmente utilizadas, incluindo a FN e MN, correlacionadas com a manutenção de OPCs e diferenciação em OLs maduros, respetivamente. Com vista à otimização da plataforma de diferenciação da linha celular oligodendrócito-tipo 2-astrócito (CG-4) estabelecida por Lourenço et al., 2016, substratos de 6,5 kPa foram funcionalizados com três lamininas recombinantes (LM-211, LM-411 e LM-521), descritas na literatura como sendo expressas no SNC (como a LM-211 e LM-521) e/ou com funções importantes no SNC (como a LM-211, LM-411 e LM-521), envolvidas na regulação de OLs (como a LM-211) ou por interagirem com integrinas essenciais à biologia de OLs, incluindo $\alpha6\beta1$ e $\alpha v\beta3$. Procurámos ainda, avaliar o papel das integrinas $\alpha6\beta1$ e $\alpha v\beta3$ na diferenciação de culturas oligodendrocíticas. Para tal, procedemos a um ensaio de bloqueio de função das subunidades $\beta1$ e $\beta3$ de integrina, afim de perceber o seu efeito na diferenciação da linha celular em estudo.

Os nossos resultados sugerem que a utilização de substratos de poliacrilamida com módulo de Young de 6,5 kPa funcionalizados com LM-521 ou LM-521+PDL representam uma plataforma de diferenciação eficiente, e desta forma propomos que a proteína recombinante LM-521 possa ser utilizada no futuro como alternativa à MN humana purificada, facilitando a geração de OLs maduros.

keywords

Oligodendrocytes, extracellular matrix, differentiation, integrins.

abstract

A prominent feature of vertebrate central nervous system (CNS) development is the myelination, a process performed by oligodendrocytes (OLs), widely scattered throughout the adult CNS.

Increasing evidence suggests that the composition and mechanical properties of ECM (stiffness, elasticity and topography) regulate various aspects of the biology of OLs. Previous studies have proved that ECM proteins, such as fibronectin (FN) or vitronectin (VN), are involved in the proliferation and maintenance of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), while laminin-2/merosin (LM-211/MN) promotes their differentiation in mature OLs. Recent *in vitro* evidences from our lab suggest an increase in the differentiation and maturation of OLs with the use of substrates that mimic the native environment of OLs (the range of stiffness of the brain varies between 0.1 and 10 KPa) and the potentiation of its effect by the presence of MN. However, basement membrane proteins, including MN itself, are often difficult to obtain in their native form and in sufficient amounts from tissues, and thus recombinant protein production has become a valuable alternative approach. In addition to being more economical, recombinant proteins have the advantage of having well-defined composition, in contrast to MN, which is purified from human placenta, being poorly defined and presenting a mixture of ECM proteins.

This work's main objective is to elucidate the role of mechanotransduction and ECM proteins (specifically laminins) in the differentiation of OLs, in order to determine their potential to be used in the future in replacement to the traditionally used purified human proteins, including FN and MN, correlated with maintenance of OPCs and differentiation in mature OLs, respectively. In order to optimize the differentiation platform of the oligodendrocyte-type 2-astrocyte cell line (CG-4) established by Lourenço et al., 2016, 6.5 kPa substrates were functionalized with three recombinant laminins (LM-211, LM-411 and LM-521), described in the literature as being expressed in the CNS (such as LM-211 and LM-521) and/or with important functions in CNS (such as LM-211, LM-411 and LM-521), involved in the regulation of OLs (such as LM-211) or by interacting with essential integrins in the biology of OLs, including $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$. We also tried to validate the role of $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins in the differentiation of oligodendrocyte cultures. To do this, we performed a function-blocking assay of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin subunits, in order to understand its effect on differentiation of the cell line under study.

Our results suggest that the use of 6.5 kPa polyacrylamide substrates functionalized with LM-521 or LM-521+PDL represent an efficient differentiation platform and, hence we propose that the recombinant protein LM-521 can be used in the future as an alternative of great relevance to purified human MN, facilitating the generation of mature OLs.

Índice

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
CAPÍTULO I.....	- 1 -
1 Introdução.....	2
1.1 Matriz extracelular e principais funções no sistema nervoso.....	2
1.2 Lamininas, estrutura e função	4
1.2.1 Laminina-211.....	9
1.2.2 Laminina-411.....	10
1.2.3 Laminina-521.....	11
1.2.4 Importância das lamininas no Sistema Nervoso.....	12
1.2.5 Doenças relacionadas com as lamininas	15
1.2.5.1 Condições embrionárias e letais.....	15
1.2.5.2 Defeitos nas lamininas e integrinas que afetam a junção epidérmica: epidermólise bolhosa juncional	16
1.2.5.3 Defeitos nas lamininas e nos seus recetores na distrofia muscular congénita e na junção neuromuscular.....	16
1.2.5.4 Envolvimento das lamininas em outras patologias.....	18
1.3 Integrinas e sinalização celular.....	18
1.3.1 Diferenciação de OLs e sinalização mediada por integrinas	21
1.4 Mecanotransdução, mecanosensores e sinalização celular.....	27
1.4.1 Mecanobiologia das células	32
1.4.1.1 Rigidez do substrato e comportamento celular.....	33

1.4.1.2	Modulação da diferenciação de OLs por mecanotransdução	36
1.5	Objetivos	37
CAPÍTULO II		39
2	Materiais e métodos	40
2.1	Cultura de células CG4	40
2.2	Expansão da cultura celular	41
2.3	Cultura de células B104 e preparação de meio condicionado	41
2.4	Hidrogéis de poliacrilamida	42
2.5	Tratamento de lamelas de vidro para posterior funcionalização com proteínas 43	
2.6	Revestimento e funcionalização de lamelas de vidro e géis de poliacrilamida com proteínas da MEC	44
2.7	Sedimentação de células em meio de proliferação e diferenciação	44
2.8	Imunocitoquímica	45
2.9	Contagem do número de células e quantificação do sinal	46
2.10	Análise estatística	47
CAPÍTULO III		48
3	Resultados	49
3.1	Efeito de diferentes proteínas de matriz extracelular na adesão de células CG4 49	
3.2	Efeito de diferentes proteínas de matriz extracelular na diferenciação de células CG4	51
3.2.1	Otimização das condições (concentração de proteína e densidade celular) .	55
3.3	Efeito do bloqueio de integrinas na diferenciação de células CG4	62
CAPÍTULO IV		65
4	Discussão	66

CAPÍTULO V	73
5 Conclusão	74
CAPÍTULO VI.....	75
6 Perspetivas Futuras.....	76
Referências.....	77
Material Suplementar	99

Índice de Figuras

Figura 1 Principais compartimentos da MEC do SNC. Adaptado de (Lau et al., 2013) (3)	3
Figura 2 Moléculas da MEC no neocórtex em desenvolvimento. Adaptado de (Barros et al., 2011) (15)	4
Figura 3 Representação de todos os trímeros de laminina já descritos ou propostos. Adaptado de (Durbeej, 2010) (16)	5
Figura 4 Principais funções das lamininas. Adaptado de (Aumailley, 2013) (42)...	8
Figura 5 Representação da expressão dos recetores de integrina ao longo do desenvolvimento de OLs. Adaptado de (O'Meara et al., 2011) (19)	23
Figura 6 Alternância entre proliferação e diferenciação em OLs e sinalização mediada por integrinas. Adaptado de (Colognato et al., 2004) (8)	24
Figura 7 Ciclo de ativação de Rho-GTPase. Adaptado de (Huveneers et al., 2009) (184)	25
Figura 8 Sinalização Fyn e regulação da forma celular. Adaptado de (Huveneers et al., 2009) (184)	25
Figura 9 Esquema da linhagem oligodendrocítica mostrando alguns dos fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam a diferenciação de OLs e a mielinização de axónios. Adaptado de (Emery, 2010) (192)	27
Figura 10 Mecanotransdução. Adaptado de (Seetharaman e Etienne-Manneville, 2018) (197)	29
Figura 11 Forma e função das AFs. Adaptado de (Haase et al., 2014) (220)	30
Figura 12 Ativação de diversas vias de sinalização por integrinas. Adaptado de (Srichai e Zent, 2010) (151)	32
Figura 13 O módulo da rigidez. Adaptado de (Moore et al., 2010) (234)	34
Figura 14 Efeitos da mecânica da matriz no comportamento celular. Adaptado de (Wells, 2008) (231)	35
Figura 15 Representação ilustrativa e gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na aderência de células CG4	50
Figura 16 Representação ilustrativa e gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na diferenciação de células CG4	53

Figura 17 Representação gráfica da intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP.....	54
Figura 18 Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC, em diferentes concentrações, no número de células/cm ² e número de células MBP+/cm ²	56
Figura 19 Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP	57
Figura 20 Representação ilustrativa e gráfica do efeito de diferentes densidades iniciais de sedimentação celular, em diferentes concentrações de LM-521+PDL no número de células/cm ² e número de células MBP+/cm ²	59
Figura 21 Representação gráfica do efeito das diferentes densidades iniciais de sedimentação celular, em diferentes concentrações de LM-521+PDL, na intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP..	61
Figura 22 Representação ilustrativa e gráfica do efeito do bloqueio de subunidades de integrina no número de células/cm ² e número de células MBP+/cm ²	63
Figura 23 Representação gráfica do efeito do bloqueio de subunidades de integrina na intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP	64

Figura suplementar 1 Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na diferenciação das células CG4 na percentagem de células MBP+.....	100
Figura suplementar 2 Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC, em diferentes concentrações, na percentagem de células MBP+.....	100
Figura suplementar 3 Representação gráfica do efeito das diferentes densidades iniciais de sedimentação celular, em diferentes concentrações de LM-521+PDL, na percentagem de células MBP+.....	101
Figura suplementar 4 Representação gráfica do efeito do bloqueio de subunidades de integrina na percentagem de células MBP+.....	102

Índice de Tabelas

Tabela 1 Representação das diferentes lamininas, nomenclatura alternativa e composição em subunidades. Adaptado de (Aumailley et al., 2005) (23)	5
Tabela 2 Isoformas de laminina e os principais locais da sua expressão. Adaptado de (Durbeej, 2010) (16)	6
Tabela 3 Mutações ou deleção de genes relacionados com as lamininas com consequências sobre as funções da membrana basal. Adaptado de (Aumailley and Smyth, 1998) (27).	17
Tabela 4 Integrinas e as principais cadeias de lamininas conhecidas como os seus ligandos. Adaptado de (Robert P Mecham, 2011) (161)	19
Tabela 5 Módulo de elasticidade/rigidez (<i>E</i>) dos diferentes tecidos dos mamíferos. Adaptado de (Moore et al., 2010) (234).	34
Tabela 6 Informações relativas ao anticorpo primário e respetiva diluição.	46
Tabela 7 Informações relativas ao anticorpo secundário e respetiva diluição.....	46

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Definição
AFs	Adesões focais
Akt	Proteína cinase B
BSA	Albumina sérica bovina
APS	Peroxidissulfato de amónio
CO₂	Dióxido de Carbono
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
DCDMS	Diclorometilsilano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Módulo de elasticidade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EHS	Sarcoma <i>Engelbreth Swarm</i>
ERK	Cinase regulada por fatores extracelulares
FAK	Cinase de adesão focal
FBS	Soro fetal bovino
FN	Fibronectina
G	Módulo de cisalhamento
GAPs	Proteínas ativadoras de GTPase
GDP	Guanosina difosfato
GEFs	Fatores de troca de nucleótidos de guanina
GFs	Fatores de crescimento
GTP	Guanosina trifosfato
GTPases	Trifosfatases de guanosina
H₂O mQ	Água Milli-Q
HCL	Ácido clorídrico
HDACs	Histonas desacetilases
ICAM	Molécula de adesão intercelular

ILK	Cinase ligada a integrina
kDa	Quilodalton
kPa	Quilopascal
Lm	Laminina
LB	Lâmina basal
MAPK	Proteína cinase activada por mitogénio
MBP	Proteína básica de mielina
MEC	Matriz extracelular
MPa	Megapascal
MN	Merosina
MRF	Fator regulador de genes de mielina
NGR	Neuroglina-1
NG2	Antigénio neural/gial 2
NHS	N-hidroxisuccinimida
NSCs	Células estaminais neurais
OPCs	Células progenitoras de oligodendrócitos
OLs	Oligodendrócitos
PBS	Tampão fosfato salino
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFαR	Recetor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDL	Poli-D-lisina
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
SFK	Proteína cinase da famia Src
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TCP	Placas de poliestireno de cultura de tecidos
TEMED	Tetrametiletilendiamina
T3	Hormona trioditirosina
T4	Hormona tiroxina

VCAM	Molécula de adesão vascular
VN	Vitronectina

CAPÍTULO I

Introdução

1 Introdução

1.1 Matriz extracelular e principais funções no sistema nervoso

O sistema nervoso central (SNC) é caracterizado por uma rede funcional de neurónios e células da glia. Também contém matriz extracelular (MEC) que constitui 10-20% do volume cerebral (1,2). Os constituintes da MEC são produzidos intracelularmente e secretados, formando uma densa rede de proteínas e glicanos, ocupando praticamente todo o espaço intercelular das células (3). Estruturalmente, a MEC fornece pontos de ligação às células nervosas e facilita a organização dessas células em regiões distintas do SNC (3). Quimicamente, é uma fonte de diversos sinais moleculares que orientam o crescimento, atividade e sobrevivência celular (3). Evidências crescentes sugerem que as proteínas da MEC regulam vários aspetos da biologia de oligodendrócitos (OLs) (4). Estudos anteriores revelaram que as proteínas da MEC, como a fibronectina (FN) ou a vitronectina (VN) estão envolvidas na proliferação e manutenção de progenitores de OLs, enquanto que a laminina-2/merosina (LM-211/MN) promove a sua diferenciação em OLs maduros (5–10). Estas proteínas da MEC ligam-se aos membros da família integrina, entre outros tipos de recetores, e medeiam diversos processos, incluindo adesão celular e sinalização bidirecional entre o ambiente extracelular e intracelular da célula (3).

A MEC do tecido cerebral adulto tem uma composição única. Durante o desenvolvimento do SNC, componentes específicos da MEC são regulados de forma temporal e espacial, de forma a facilitar a neurogénese, migração e diferenciação de células nervosas e o crescimento axonal (11). Na idade adulta, a MEC altera a sua composição e atua com o propósito de estabilizar estruturas, incluindo sinapses, com a finalidade de regular a plasticidade sináptica e evitar a remodelação sináptica anormal (12).

As moléculas que compõem a MEC localizam-se em três compartimentos principais: a membrana ou lâmina basal (LB), as redes perineuronais e a matriz intersticial neural (Figura 1) (3). Além de envolver toda a superfície pial do SNC, a

membrana basal funciona como fronteira entre as células endoteliais e o tecido parenquimatoso, sendo predominantemente composta por complexos de colagénio, complexos laminina-nidógeno (entactina), FN, distroglicano e perlecano (3). Em contraste, as redes perineuronais compreendem uma camada composta principalmente por proteoglicanos, tenascina R e proteínas de ligação que circundam as células neuronais e dendrites proximais (13) e desempenham um papel crítico na preservação da saúde neuronal e manutenção da plasticidade sináptica (3). A matriz intersticial neural compreende uma rede densa de proteoglicanos, ácido hialurónico, tenascinas e proteínas de ligação (14) e quantidades relativamente pequenas de proteínas fibrosas (colagénios e elastina) e glicoproteínas adesivas (laminina-LM e FN) (3).

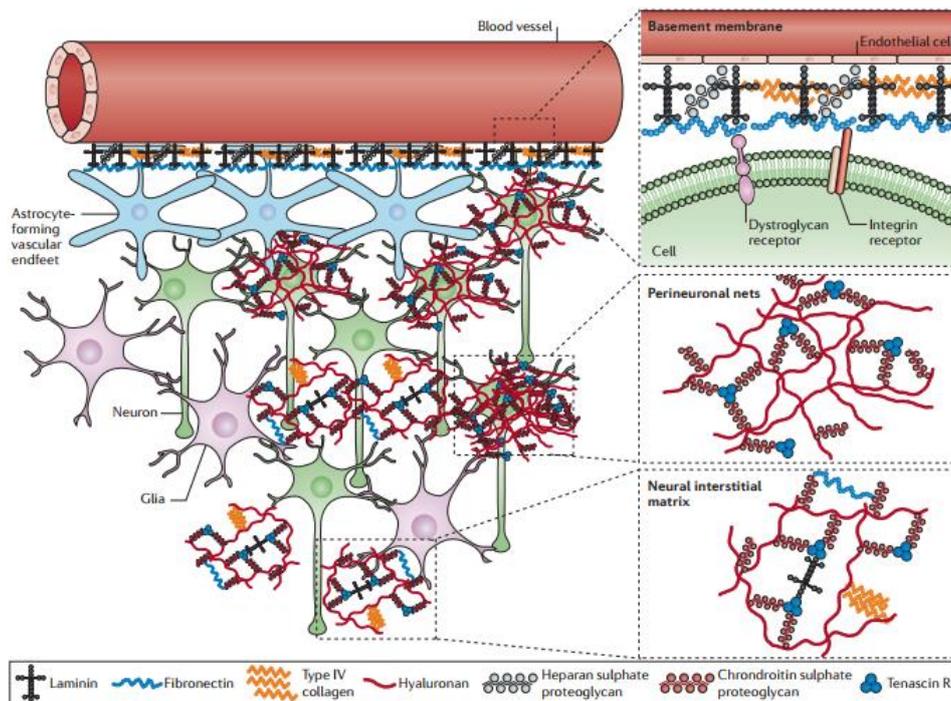


Figura 1| Principais compartimentos da MEC do SNC. Os componentes da MEC localizam-se em três compartimentos principais: a membrana ou lâmina basal (*basement membrane*), as redes perineuronais (*perineuronal nets*) e a matriz intersticial neural (*neural interstitial matrix*). Adaptado de (Lau et al., 2013) (3).

Estudos funcionais e genéticos em murganhos indicam que a MEC afeta praticamente todos os aspetos do desenvolvimento e função do sistema nervoso, incluindo a diferenciação das células estaminais neurais (NSCs), migração neuronal, formação dos tratos axonais e maturação e função das sinapses no SNC e sistema nervoso periférico (SNP) (15).

1.2 Lamininas, estrutura e função

As lamininas são uma família multifuncional de macromoléculas que constituem os principais elementos estruturais encontrados nas membranas basais da MEC (Figura 2), juntamente com colagênio tipo IV, nidogênio, perlecano e agrina (16–18). As lamininas formam redes insolúveis que estão em permanente associação com as células através de interações com recetores de superfície celular. São vitais para variadas funções fisiológicas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, organogénese e morfogénese, e desempenham funções cruciais em vários tecidos, incluindo músculo, nervo, pele, rim, pulmão e vasculatura (16,18).

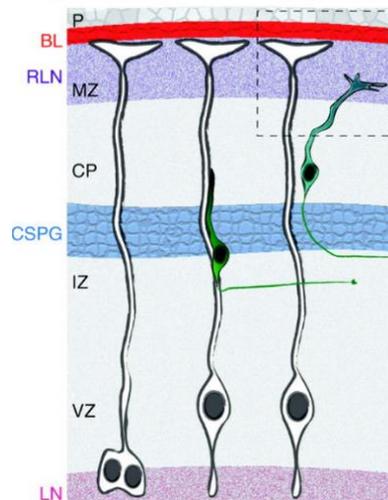


Figura 2| Moléculas da MEC no neocórtex em desenvolvimento. A laminina (LN) é um componente importante da lâmina basal (BL) e também é encontrada na zona ventricular (VZ). Adaptado de (Barros et al., 2011) (15).

As lamininas são constituídas por heterotrímeros em forma de cruz ou de “T” (16), compostos por uma cadeia alfa (α) com aproximadamente 400 quilodalton (kDa), uma cadeia beta (β) com aproximadamente 210 kDa e uma cadeia gama (γ) com aproximadamente 200 kDa, codificadas por cinco, quatro e três genes distintos, respetivamente (LAMA1-5, LAMB1-4, LAMC1-3) (19,20). A associação das isoformas em heterotrímeros origina diferentes lamininas (Tabela 1) (21). Os trímeros são denominados de acordo com a composição das cadeias α , β e γ . Por exemplo, a LM-423 é composta pelas cadeias α 4, β 2 e γ 3 (16). Cada trímero de laminina contém locais de ligação para vários recetores, incluindo integrinas (22).

Tabela 1| Representação das diferentes lamininas, nomenclatura alternativa e composição em subunidades. Adaptado de (Aumailley et al., 2005) (23).

Proteína	Cadeias	Designação corrente
Laminina-1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Laminina EHS/LM-111
Laminina-2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Merosina/LM-211
Laminina-3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	S-laminina/LM-121
Laminina-4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	S-merosina/LM-221
Laminina-5 ou 5A	$\alpha 3\alpha\beta 3\gamma 2$	LM-332/ LM-3A32
Laminina-5B	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	LM-3B32
Laminina-6 ou 6A	$\alpha 3\alpha\beta 1\gamma 1$	LM-311/LM-3A11
Laminina-7 ou 7A	$\alpha 3\alpha\beta 2\gamma 1$	LM-321/LM-3A21
Laminina-8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	LM-411
Laminina-9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	LM-421
Laminina-10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	LM-511
Laminina-11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	LM-521
Laminina-12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	LM-213
Laminina-14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	LM-423
-	$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	LM-522
Laminina-15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	LM-523

Até à data, foram identificadas cinco cadeias α ($\alpha 1-5$), três β ($\beta 1-3$) e três γ ($\gamma 1-3$) (16) que se podem associar em diversas combinações. Em organismos complexos, como os vertebrados existem, pelos menos, 16 isoformas distintas (23–26). No entanto, algumas isoformas adicionais têm sido propostas (Figura 3 e Tabela 2) (16).

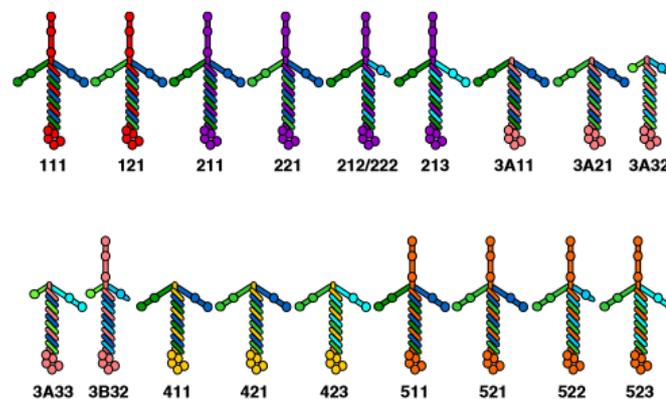


Figura 3| Representação de todos os trimeros de laminina já descritos ou propostos. Adaptado de (Durbeej, 2010) (16).

Tabela 2| Isoformas de laminina e os principais locais da sua expressão. Adaptado de (Durbeej, 2010) (16).

Isoforma de laminina	Principal local de expressão
111	Epitélio embrionário, algum epitélio adulto (rim, fígado, testículos, ovários), vasos sanguíneos cerebrais
121	Placenta
211	Múculo, coração, nervos periféricos, testículos
221	Múculo, coração, nervos periféricos, junção neuromuscular
213	Placenta, testículos
212/222 ^a	Nervos periféricos
3A11	Epiderme, âmnio
3A21	Epiderme, âmnio
3A32	Epiderme, placenta, glândula mamária
3A33 ^b	Testículos
3B32	Pele, útero, pulmão
411	Endotélio, músculo liso, gordura, nervos periféricos
421	Endotélio, músculo liso, gordura, junção neuromuscular
423	Retina, SNC
511	Epitélio em desenvolvimento, epitélio maduro, músculo liso
521	Epitélio maduro, endotélio maduro, músculo liso, junção neuromuscular, membrana basal glomerular
522 ^c	Medula óssea
523	Retina, SNC
a	A ocorrência da LM-212 e/ou LM-222 é sugerida com base na análise dos nervos periféricos em animais normais e deficientes em cadeia α de laminina
b	As análises de co-imunoprecipitação têm demonstrado interações entre as cadeias $\alpha 3$, $\beta 3$ e $\gamma 3$
c	A existência de LM-522 é proposta com base em estudos de co-imunoprecipitação em culturas mieloides da medula óssea a longo prazo

A descoberta das primeiras lamininas foi dificultada pelo seu isolamento a partir de células em cultura e extração de diferentes tecidos. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, nomeadamente a produção de fragmentos de laminina geneticamente modificados, facilitou e acelerou a identificação e caracterização de novas variantes de laminina (27). Hoje, sabe-se que as lamininas controlam diversas atividades celulares e exercem uma variedade de efeitos nas células adjacentes, incluindo adesão, migração, diferenciação, manutenção do fenótipo, e ainda resistência à apoptose (18). O papel primário das lamininas consiste na mediação da interação entre as células e a MEC (27). O segundo papel consiste na interação

com os componentes da superfície celular, como o distroglicano, de forma a fixar as células à MEC (28). Por último, sinalizam moléculas que interagem com recetores celulares, como as integrinas, transmitindo informações morfogeneticamente importantes para o interior da célula (21,29,30).

As isoformas de laminina são sintetizadas por praticamente todas as células epiteliais (células do músculo liso, esquelético e cardíaco, nervos, células endoteliais e células da medula óssea e neuroretina) de forma específica ao tecido onde se encontram (Tabela 2). Isto sugere que diferentes isoformas de laminina têm diferentes funções em diferentes tecidos (17,31). Algumas dessas interações estão envolvidas na modulação de funções específicas: a LM-111, por exemplo, tem demonstrado desempenhar um papel na morfogénese epitelial (32); a LM-221 é a isoforma predominante das membranas basais das fibras musculares estriadas e é essencial para o desenvolvimento e estabilidade do músculo esquelético (33); a LM-332 é uma importante isoforma da membrana basal da pele (34,35); a LM-411 é uma isoforma de laminina presente nos vasos sanguíneos (36) e é amplamente distribuída nas membranas basais vasculares endoteliais de vários tecidos, bem como nas membranas basais do perineurium dos nervos periféricos, coração e do rim e músculo esquelético em desenvolvimento (37,38); a LM-511 é amplamente expressa em todo o corpo, nomeadamente, em tecidos epiteliais, neurovasculares e vasculares adultos (39); a LM-521 é encontrada na membrana basal glomerular em glomérulos renais, na fenda sináptica neuromuscular do músculo esquelético e em outros tecidos, como a placenta (40).

Tipicamente, as cadeias de laminina possuem domínios terminal-N (LN), domínios do tipo fator de crescimento epidérmico (LE), domínios de laminina 4 (L4), um domínio quatro (LF) (presente nas cadeias β), um domínio LF modificado (LFx) (presente nas cadeias $\alpha 3$ e $\alpha 5$), um domínio do tipo bobina enrolada (LCC), um domínio de laminina β (L β) (presente nos domínios LCC de cadeias β) e cinco subdomínios globulares no terminal-C (presentes em cadeias α e designadas de LG1-5) (16,41).

Vários dos domínios de laminina, estruturalmente relacionados, têm funções quase idênticas ou similares em cada isoforma de laminina (Figura 4) (42). Geralmente, as extremidades terminal-C interagem com proteínas ancoradas na membrana plasmática de células ou microorganismos, transmitindo sinais bioquímicos e mecânicos entre redes moleculares intracelulares e extracelulares (42). Já as extremidades terminal-N têm vindo a ser envolvidas em interações, principalmente com outras moléculas da MEC, presentes nas membranas basais (42). A função de algumas partes que compõem as lamininas não está tão bem definida, mas pensa-se que desempenhem funções importantes como: (i) interagir com pequenas moléculas (fatores de crescimento- GFs- e citocinas), auxiliando o sequestro e armazenamento dessas pequenas moléculas; (ii) regular a sua distribuição, ativação e apresentação às células (42).

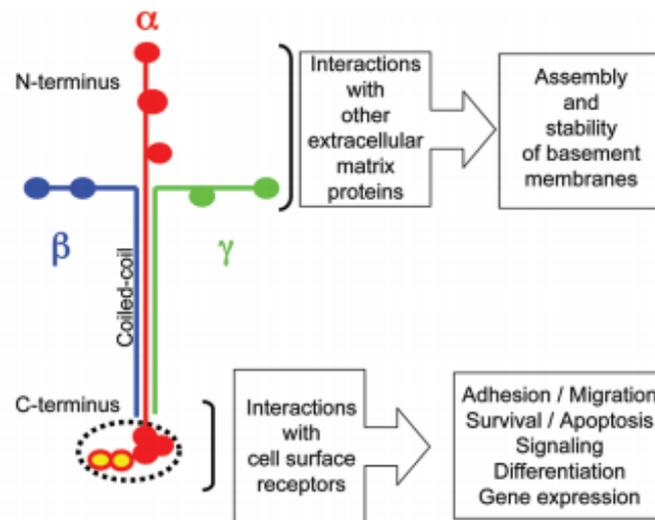


Figura 4| Principais funções das lamininas. O terminal-N está envolvido na função arquitetônica dentro da membrana basal, enquanto o terminal-C, geralmente, está envolvido em interações celulares. Adaptado de (Aumailley, 2013) (42).

As proteínas constituintes da membrana basal são frequentemente difíceis de obter na forma nativa e em quantidades suficientes a partir de tecidos. Desta forma, a produção recombinante tornou-se uma abordagem alternativa valiosa. Além de alternativas mais econômicas, as proteínas recombinantes possuem ainda a vantagem de terem composição bem definida, em contraste com as proteínas isoladas de tecidos humanos e posteriormente purificadas que têm por base uma composição que está mal definida.

Neste trabalho, surgiu a oportunidade de utilizar de três trímeros recombinantes de laminina (LM-211, LM-411 e LM-521), descritos na literatura como sendo expressos no SNC (como a LM-211 e LM-521) e/ou com funções importantes no SNC (como a LM-211, LM-411 e LM-521), envolvidos na regulação de OLs (como a LM-211) ou por interagirem com integrinas essenciais à biologia de OLs, incluindo $\alpha6\beta1$ e $\alpha v\beta3$ e avaliar o seu potencial para serem utilizados no futuro em substituição às proteínas humanas purificadas tradicionalmente utilizadas.

1.2.1 Laminina-211

Em 1990, Eva Engvall e os seus colegas identificaram a terceira isoforma de laminina, agora conhecida como LM-211 (43). A cadeia $\alpha2$ de laminina é principalmente restrita à membrana basal do músculo estriado e cardíaco, nervos periféricos, placenta e cérebro (44–49). As lamininas contendo a cadeia $\alpha2$ parecem ser importantes para a organização do músculo esquelético e para a interação nervo-músculo (50). Outra interação importante é vista na junção miotendinosa onde a cadeia $\alpha2$ interage com a integrina $\alpha7\beta1$. A ausência da subunidade $\alpha7$ de integrina conduz a uma forma de distrofia muscular (51).

Roediger et al., 2010, demonstraram que a LM-211 também desempenha um papel importante ao nível dos cardiomiócitos e desenvolvimento do músculo cardíaco (52). No coração em desenvolvimento, as isoformas LM-211 e LM-221 são expressas na MEC dos cardiomiócitos, assim como, em zonas da membrana basal do endo e pericárdio e dos capilares (52). Adicionalmente, a LM-211 também tem vindo a ser implicada na expansão de neurites e na migração neuronal (53–55).

Segundo Hagg et al., 1997, Tian et al., 1997 e Powell et al., 1998, esta isoforma de laminina é expressa no SNC (19,50,56) e a carência de LM-211 em humanos está associada a anomalias na mielinização (57–60). Tian et al., 1997 sugeriram um papel para as proteínas da cadeia $\alpha2$ de laminina na função sináptica e plasticidade do SNC (50). Já Buttery e French-Constant., 1999, demonstraram que a LM-211 não tem efeito sobre a diferenciação de OLs, no entanto, é uma isoforma de laminina expressa no SNC que melhora as alterações morfológicas associadas à formação da

bainha de mielina e, portanto, é importante para o processo de mielinização (6). Ao contrário das células de Schwann que são cercadas por uma LB que fornece uma fonte dessas moléculas, os OLs mielinizantes não possuem LB, e portanto, exigem que a MN ou outra laminina esteja presente nos axónios para que sejam mielinizados (6). No entanto, os dados referentes à distribuição de tais moléculas *in vivo* permanecem incompletos (6).

A função da LM-211 também tem vindo a ser caracterizada *in vivo* (19). Os defeitos no gene que codifica a cadeia $\alpha 2$ conduzem ao fenótipo de distrofia muscular, quer em seres humanos (61), quer em murganhos (62,63). Estudos clínicos detetaram algumas anomalias na substância branca em humanos que não possuem a cadeia $\alpha 2$ (57,64), o que é consistente com o papel desta no SNC (19).

1.2.2 Laminina-411

A LM-411, assim como a LM-511, é expressa por células endoteliais localizadas no pâncreas (ilhas de *Langerhans*) onde conduz à ocorrência de cascatas de sinalização celular nas células β , levando à produção de insulina (65).

A LM-411 é também secretada por linfócitos, desempenhando um papel determinante como suporte durante a proliferação, adesão e migração (66). Adicionalmente, está também envolvida na sobrevivência, adesão e migração de neutrófilos do sangue (38) e funciona como um substrato adesivo para células estaminais e células progenitoras da medula óssea, promovendo a migração *in vitro* de células progenitoras (67).

Também as células endoteliais microvasculares cerebrais (principais componentes da barreira hematoencefálica) expressam LM-411 e LM-511 (68–71). A expressão da laminina- $\alpha 4$ inicia-se nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionários e é expressa de forma ubíqua ao longo das redes vasculares de todos os tipos de vasos sanguíneos (70). Estudos anteriores com murganhos transgênicos com carência da cadeia $\alpha 4$ de laminina mostraram desorganização severa dos microvasos, levando a anomalias na microcirculação (72). Outros estudos mostraram o desenvolvimento

de hemorragias no estágio embrionário/neonatal (72), sugerindo um papel crítico da cadeia $\alpha 4$ de laminina na permeabilidade vascular no estágio inicial de desenvolvimento (73).

A LM-411 é reconhecida pela integrina $\alpha 6\beta 1$ e, provavelmente, também pelas integrinas $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha V\beta 3$, e a sua interação promove a adesão e/ou a migração de vários tipos celulares, bem como a expansão de neurites (38,66,74–83).

1.2.3 Laminina-521

Das cinco cadeias α de laminina, a laminina $\alpha 5$ é amplamente expressa nos tecidos fetal e adulto (36,84). A cadeia $\alpha 5$ associa-se com as subunidades $\beta 1$ ou $\beta 2$ e $\gamma 1$ ou $\gamma 3$ para formar a LM-511, a LM-521 e a LM-523, respetivamente (39,85). Foi demonstrado que a disrupção dirigida da cadeia $\alpha 5$ em murganhos resulta em letalidade embrionária com defeitos no fecho do tubo neural, separação de dígitos, placentação, glomerulogénese, separação do lóbulo pulmonar, desenvolvimento do músculo liso intestinal, morfogénese dentária e morfogénese epitelial da glândula submandibular (86–92). Experiências adicionais em murganhos demonstraram que a laminina $\alpha 5$ é necessária para o desenvolvimento do folículo capilar (93,94) e para a maturação pulmonar (95). Em conjunto, os resultados sugerem que a laminina $\alpha 5$ desempenha múltiplos papéis no desenvolvimento e no estabelecimento da arquitetura do tecido (96).

A LM-521 (expressa por células neuroepiteliais e células gliais radiais, assim como a LM-211), é uma das principais isoformas expressas na zona subventricular, subependimária e ventricular do sistema nervoso em murganhos e humanos (65). A LM-521 está também presente nas junções neuromusculares, onde parece garantir a integração das inervações musculares (51,97). LAMA5 (que codifica para a cadeia de $\alpha 5$ de laminina) e LAMB2 (que codifica para a cadeia de $\beta 2$ de laminina) estão presentes em LBs sinápticas (51). Na ausência de LAMB2, observam-se defeitos musculares graves à medida que a entrega de neurotransmissor é obstruída por extensões de membrana das células de Schwann (51).

Recentemente, a LM-521 foi relacionada com a promoção da adesão de células estaminais embrionárias humanas e manutenção da sua pluripotência (25). É expressa no início do desenvolvimento embrionário (18) e permite o crescimento em monocamada de células embrionárias em cultura (98). Exerce efeitos sobre a proliferação, migração, estabilidade do fenótipo e sobrevivência de vários tipos celulares (99). No entanto, embora esta isoforma tenha sido desenvolvida para a cultura de células estaminais embrionárias humanas, nenhum estudo abordou a sua utilização e os seus efeitos durante a proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) e diferenciação em OLs.

1.2.4 Importância das lamininas no Sistema Nervoso

As lamininas participam em vários aspetos da fisiologia do sistema nervoso. Essas atividades incluem a expansão de neurites (100), função e estabilidade sináptica (101), adesão e crescimento neuronal (102), regeneração (100) e viabilidade neuronal (103–105).

As lamininas são expressas no sistema nervoso, particularmente durante os estádios de desenvolvimento correspondentes ao crescimento de axónios (19). Sabe-se que as células endoteliais do cérebro produzem LM-411, bem como LM-511 (69,70,84), enquanto que os astrócitos geram LM-111 e LM-211 (46,69). As isoformas de laminina têm sido melhor caracterizadas no SNP, onde a expressão persiste no estágio adulto (19).

Duas isoformas de laminina são proeminentes no SNP, a LM-211 que está associada às membranas basais das células de Schwann (45,106) e pode fornecer um substrato para a regeneração do SNP (55,107), e a LM-121 que contém a cadeia $\beta 2$ que é expressa na junção neuromuscular (45,48). Outras formas heterotriméricas contendo essas isoformas também podem existir (19).

No SNP, vários tipos de células produzem uma variedade de lamininas. Por exemplo, os elementos gliais que envolvem os nervos periféricos, as células de Schwann, têm vindo a ser conhecidos por produzir lamininas (108,109). Por outro

lado, pensa-se que as lamininas são importantes durante a diferenciação de células de Schwann (107,110,111). Também na periferia, as células musculares parecem expressar diversos trímeros de laminina à sua superfície (36,48,112–114) que aparentam ser importantes para a orientação dos neurónios motores que inervam para os seus alvos sinápticos (no músculo), bem como para a estabilização das sinapses (112,115).

Evidências substanciais indicam que as células de Schwann requerem lamininas para a mielinização apropriada dos axónios (116). Tais evidências foram confirmadas em estudos *in vitro* usando células de Schwann/co-culturas neuronais, que demonstraram que a deposição de laminina é necessária para o processo de mielinização (110,117,118). Os murganhos com células de Schwann que apresentam alterações em laminina mostraram proliferação reduzida e expressão aberrante dos fatores de transcrição necessários para a mielinização (119,120). Esses mutantes permaneceram paralisados no estágio de pré-mielinização e não conseguiram separar os axónios, indicando que as lamininas desempenham um papel fundamental na diferenciação de células de Schwann mielinizantes (121).

As células de Schwann não mielinizantes também são cercadas por uma membrana basal (121). Yu et al., 2005, mostraram que na ausência de laminina, as células de Schwann não mielinizantes não existem no SNP adulto de murganhos mutantes e, portanto, as lamininas são essenciais para o desenvolvimento das células de Schwann não mielinizantes e a função sensorial nociceptiva normal (121).

As lamininas não se encontram em muitos locais no SNC, mas parecem exercer papéis fundamentais onde estão presentes. As fontes celulares dos componentes das suas cadeias incluem as três principais classes celulares do SNC: glia, neurónios e progenitores neurogliais (85). As células da glia, incluindo astrócitos, Bergmann Glia e células Müller, são consideradas as principais fontes de lamininas do SNC adulto e em desenvolvimento (122–130). Também os neurónios (129,131–133) e os progenitores neurogliais da retina podem ser uma fonte de lamininas durante o desenvolvimento (129).

A capacidade de todos os principais tipos de células neurais do SNC produzirem lamininas é consistente com a profusão de papéis que foram propostos para as lamininas no SNC (85). Tal como acontece com as lamininas no SNP, pensa-se que as lamininas no SNC estão envolvidas no crescimento de axónios (134,135) e na sua distribuição ao longo de muitas vias de desenvolvimento (133,136–138). Pensa-se que estão ainda envolvidas na diferenciação neuronal no SNC (85).

O SNC está protegido da circulação sanguínea e do sistema imunológico pela barreira hematoencefálica, constituída células endoteliais agrupadas em capilares. A membrana subendotelial do capilar contém tipicamente LM-411 e LM-511 endoteliais, enquanto a membrana basal periférica produzida por astrócitos contém lamininas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (69). Foi relatado que no SNC, os vasos sanguíneos parecem expressar LM-111 e LM-211 (46,102,139), que não são detetadas em outros lugares das membranas basais dos vasos sanguíneos e que podem estar relacionadas com a sua estrutura altamente especializada (69). De acordo com os importantes papéis das lamininas na regulação da integridade vascular, evidências mostraram que os recetores de laminina também regulam ativamente a permeabilidade vascular (73). Por exemplo, a ligação de lamininas às integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ parece promover a diferenciação das células endoteliais e a estabilização dos vasos (9).

No SNC, a expressão das lamininas correlaciona-se com o início da mielinização (22,140) e vários graus de defeitos foram encontrados em tratos de substância branca de pacientes com distrofia muscular congénita (141,142). Os murganhos que não possuem laminina $\alpha 2$ têm atraso do desenvolvimento e maturação de OLs, resultando em hipomielinização (7,143). O grau de atraso no desenvolvimento é específico da região, o que pode refletir diferentes requisitos da laminina $\alpha 2$ (143).

Libby et al., 2000, colocaram a hipótese de que as lamininas possam ser ubíquas no sistema nervoso dos vertebrados. A este respeito, será importante definir os trímeros de laminina que estão associados ao sistema nervoso, os seus recetores e as funções que podem executar no cérebro em desenvolvimento e adulto (85).

1.2.5 Doenças relacionadas com as lamininas

Dada a vasta gama de papéis que as lamininas desempenham na estrutura do tecido e na função celular, não é surpreendente que as lamininas estejam significativamente envolvidas numa variedade de processos de doença (17). O principal desafio é atribuir a relevância funcional *in vivo* das múltiplas interações de laminina que foram observadas *in vitro* (27). Em particular, uma questão importante é determinar sob que condições fisiológicas ou patológicas as lamininas ou outras moléculas da membrana basal, bem como quais as integrinas ou outros componentes associados à superfície celular, estão envolvidas nas interações celulares e no controlo do fenótipo celular (27).

Há uma lista crescente de doenças humanas e mutações direcionadas a locais específicos em murganhos que afetam as funções da membrana basal (Tabela 3), referentes quer a alterações nas lamininas, quer nos seus recetores (27). Esses animais e linhas celulares derivadas, têm permitido fazer a ligação dos dados obtidos *in vitro* com a sua função *in vivo*.

1.2.5.1 Condições embrionárias e letais

Com base na expressão precoce da cadeia $\alpha 1$ e na expressão ubíqua das cadeias $\beta 1$ e $\gamma 1$, especulou-se que a mutação que causava ausência ou a estrutura altamente alterada dessas cadeias seria letal (27). Isto foi confirmado pela deleção do gene funcional LAMA (que codifica a subunidade α de laminina) ou LAMC1 (que codifica a subunidade γ de laminina) em *drosophila* e murganhos, respetivamente, em que ambas as condições conduziram a letalidade embrionária precoce (Tabela 3). Da mesma forma, a abolição dirigida do gene ITGB1 (que codifica para a subunidade $\beta 1$ de integrina) não é compatível com o desenvolvimento embrionário e leva à letalidade durante a peri-implantação (Tabela 3) (144,145). Esta é, provavelmente, a razão pela qual não existe uma doença conhecida associada a mutações nessas cadeias de polipéptidos e essas observações reforçam o pré-requisito absoluto da laminina e das interações de laminina-integrina para o desenvolvimento embrionário (27).

1.2.5.2 Defeitos nas lamininas e integrinas que afetam a junção epidérmica: epidermólise bolhosa juncional

Em humanos, um subconjunto de doenças de bolhas da pele, os tipos juncionais de epidermólise bolhosa, são devidos à ausência ou alteração de todas as três cadeias da LM-332 ($\alpha 3$, $\beta 3$ ou $\gamma 2$) ou das cadeias de integrina $\alpha 6$ ou $\beta 4$ (Tabela 3) (27). As alterações nestas cadeias resultam em complicações que levam, frequentemente, à morte perinatal ou, precocemente, durante a infância (27). Num caso mais severo, o tipo letal de *Herlitz*, as mutações que levam à ausência, instabilidade ou truncamento do RNA foram identificadas nos genes humanos que codificam para as cadeias $\alpha 3$, $\beta 3$ ou $\gamma 2$ de laminina (27).

A ausência ou truncamento da integrina $\alpha 6\beta 4$, um recetor de LM-332, causado por mutações nos genes *ITGA6* (que codifica para a subunidade $\alpha 6$ de laminina) ou *ITGB4* (que codifica para a subunidade $\beta 4$ de laminina) em humanos, também parece estar associado a um fenótipo de epidermólise bolhosa e, em adição, atresia pilórica (Tabela 3) (27). Em murganhos, a disfunção dirigida dos genes *ITGA6* ou *ITGB4* conduziu a fetos que aparentemente estavam em desenvolvimento e que durante o nascimento apresentaram um fenótipo de epidermólise bolhosa juncional com destacamento epidérmico extensivo, causando morte perinatal (Tabela 3) (27).

A deleção do gene *ITGA3* (que codifica para a subunidade $\alpha 3$ de laminina), que leva à ausência de outro recetor de laminina, a integrina $\alpha 3\beta 1$, causa um fenótipo diferente com desorganização da LB no rim, pulmão e pele, e morte por insuficiência renal (Tabela 3) (146,147).

1.2.5.3 Defeitos nas lamininas e nos seus recetores na distrofia muscular congénita e na junção neuromuscular

Metade dos pacientes com distrofia muscular congénita apresenta um grande número de mutações *splice-site*, *nonsense*, ou mutações *missense* no gene *LAMA2* (que codifica para a subunidade $\alpha 2$ de laminina), levando à ausência, expressão

alterada ou truncamento no domínio IVa ou VI da cadeia $\alpha 2$ de laminina (27). A ausência da cadeia $\alpha 2$ (62,148), a disfunção dirigida do gene (149), ou ausência da integrina $\alpha 7\beta 1$ (150) conduzem ao fenótipo distrofia muscular precoce e progressiva. As lamininas contendo a cadeia $\alpha 2$ estão presentes na membrana basal do músculo, onde através de interações com a integrina $\alpha 7\beta 1$ e α -dístroglicano, estão envolvidas com a distrofina e outras moléculas associadas à arquitetura de um complexo transmembranar de proteínas importante (28). A fraqueza muscular associada à doença enfatiza o papel da laminina e das suas interações com ela própria ou com outras moléculas na estabilidade e força da membrana basal (33).

Tabela 3| Mutações ou deleção de genes relacionados com as lamininas com consequências sobre as funções da membrana basal. Adaptado de (Aumailley and Smyth, 1998) (27).

Gene	Espécies	Fenótipo
Cadeias de laminina		
LAMA	Drosophila	Embrionário letal
LAMA 2	Humano	Distrofia muscular congênita
	Rato	Distrofia muscular
LAMA 3	Humano	Morte perinatal, epidermólise bulhosa juncional
LAMB2	Rato	Defeitos na membrana basal glomerular e na junção neuro-muscular
LAMB3	Humano	Epidermólise bulhosa juncional perinatal ou Epidermólise bolhosa benigna atrófica generalizada
	Rato	Epidermólise bulhosa juncional
LAMC1	Rato	Letalidade durante a peri-implantação
LAMC2	Humano	Morte perinatal, epidermólise bulhosa juncional
Cadeias de integrina		
ITGA3	Rato	Desorganização da lâmina basal
ITGA6	Humano	Atresia pilórica associada com epidermólise bulhosa juncional
	Rato	Morte perinatal, epidermólise bulhosa juncional
ITGA7	Rato	Viável, distrofia muscular progressiva
ITGB1	Rato	Letalidade durante a peri-implantação
ITGB4	Humano	Atresia pilórica associada com epidermólise bulhosa juncional
	Rato	Morte perinatal, epidermólise bulhosa juncional

1.2.5.4 Envolvimento das lamininas em outras patologias

Além das doenças referidas anteriormente, outros estudos apontaram para o papel das lamininas e dos seus recetores em outras doenças que afetam as membranas basais, como a diabetes, ou o crescimento invasivo e metástases de tumores (27).

Devido à sua complexidade, muitos mecanismos moleculares subjacentes a outros distúrbios ainda não foram esclarecidos. Melhorar o conhecimento da biologia estrutural das lamininas, certamente, ajudará na resolução dos mecanismos patogénicos envolvidos nestas doenças multifatoriais (27).

1.3 Integrinas e sinalização celular

As integrinas são uma grande família de recetores transmembranares, de glicoproteína heterodimérica, que funcionam como os principais recetores metazoários para adesão celular e conectam os ambientes intracelular e extracelular das células (151). Desde o seu reconhecimento em 1987, foram uma das famílias mais estudadas de recetores, uma vez que são expressas em todas as células multicelulares nucleadas animais e são essenciais para a adesão célula-MEC e interação célula-célula (152).

As integrinas são expressas em vários tipos celulares, incluindo células neuronais, leucócitos, células tumorais, cardíacas, musculares esqueléticas e vasculares (153). Existem como duas subunidades, α e β , ligadas de forma não covalente. Até à data, conhecem-se 18 subunidades α e 8 β que se combinam para formar, pelo menos, 25 heterodímeros distintos (154). Estes heterodímeros têm diferentes afinidades para diferentes proteínas da MEC, incluindo colagénio, FN, laminina e recetores celulares expressos por leucócitos e células endoteliais, como VCAM (molécula de adesão celular vascular) e ICAM (molécula de adesão intercelular) (155,156). Por exemplo, as integrinas $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ e $\alpha11\beta1$ servem principalmente como recetores de colagénio, enquanto que $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha v\beta1$ e $\alpha v\beta3$ têm elevada afinidade para a FN (155,157,158).

Diversas integrinas têm vindo a ser descritas como recetores de laminas, incluindo $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha v\beta 8$ (16,159,160). Destas, as principais são $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 7\beta 1$ (Tabela 4). Estas, apresentam-se ainda, como as únicas integrinas conhecidas até à data com capacidade de ligação à LM-521 (160).

Existe redundância em relação a certas interações de integrina-proteínas da MEC, uma vez que algumas integrinas ligam os mesmos ligandos extracelulares, embora com diferentes afinidades e, por outro lado, alguns ligandos são reconhecidos por diferentes integrinas (151). A capacidade das integrinas se ligarem aos seus ligandos é regulada de forma dinâmica, permitindo às células controlar cuidadosamente a sua capacidade de aderir à MEC ou estabelecer conexões com outros tipos celulares (152).

Tabela 4| Integrinas e as principais cadeias de lamininas conhecidas como os seus ligandos. Adaptado de (Robert P Mecham, 2011) (161).

Integrinas	Principais ligandos
$\alpha 3\beta 1$	Lamininas contendo cadeias $\alpha 3$ e $\alpha 5$
$\alpha 6\beta 1$	Lamininas contendo cadeias $\alpha 1$, $\alpha 3$ e $\alpha 5$
$\alpha 6\beta 4$	Lamininas contendo cadeias $\alpha 3$ e $\alpha 5$
$\alpha 7\beta 1$	Lamininas contendo cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$

Ao longo das últimas décadas, começou-se a reconhecer e entender melhor o importante papel das integrinas na mediação da adesão e sinalização celular. Esse reconhecimento conduziu ao aparecimento de novas informações estruturais da conformação das integrinas. Estudar as estruturas de alta resolução das integrinas revelou-se desafiante, particularmente porque são grandes proteínas de membrana e, portanto difíceis de purificar (151). Muitos anos de esforço foram dedicados a compreender e caracterizar a estrutura das integrinas, e o conhecimento da sua base estrutural auxiliou a obtenção de uma visão que permitiu caracterizar, ainda mais, os mecanismos subjacentes à ativação das integrinas (151).

As integrinas desempenham diversos e importantes papéis na maioria dos processos biológicos (155). Além do papel que exercem como ligações mecânicas,

também desempenham papéis fundamentais na montagem do citoesqueleto de actina, bem como na modulação das vias de transdução de sinal que controlam diversas funções, incluindo adesão, migração, proliferação e diferenciação celular e apoptose (162). Evidências crescentes sugerem ainda um papel fundamental em funções de sinalização e regulação de processos fisiopatológicos neuronais, como memória, inflamação, cicatrização de feridas, epileptogênese, angiogênese e metástase tumoral (153).

As cadeias α de integrina desempenham um papel central na determinação da especificidade do ligando. Já as subunidades β têm uma cauda citoplasmática capaz de se ligar a várias proteínas intracelulares, incluindo a talina (que desempenha um papel importante para ligar aglomerados de integrina ao citoesqueleto de actina), α -actinina (que conecta fibrilas de actina à cauda citoplasmática de recetores transmembranares, como integrinas, caderinas e ICAMs) e filamina (que liga filamentos de actina em redes ortogonais ou feixes paralelos) (163). Estas proteínas servem como âncoras celulares e podem ligar-se à actina ou a outras proteínas, possibilitando a ligação da integrina aos filamentos de actina no córtex celular (163).

A ligação das integrinas às proteínas da MEC estimula a formação de complexos multiproteicos denominados por adesões focais (AFs) (155), desencadeando sinais bioquímicos e mecânicos (164,165). Os sinais mecânicos são mediados por componentes das AFs, incluindo talina, vinculina e α -actina, que conectam funcionalmente o citoesqueleto de actina e a MEC (41). Os sinais bioquímicos são mediados por outros componentes, tais como a cinase de adesão focal (FAK), Src e paxilina, que regulam as atividades de várias enzimas, incluindo Rho GTPases (41). Distúrbios nesses eventos de sinalização podem resultar em variadas condições patológicas, incluindo cancro, distúrbios imunológicos, trombose e distrofia muscular esquelética (166–168).

1.3.1 Diferenciação de OLs e sinalização mediada por integrinas

Os OLs são gerados continuamente no cérebro adulto saudável (169). No cérebro humano, embora a rotatividade dos OLs seja muito estável, com uma mudança anual de 0,3% (170), evidências crescentes sugerem que a mielina é produzida e remodelada ao longo da vida e não apenas durante a infância e adolescência (169).

A diferenciação de OPCs em OLs e a subsequente mielinização dos axónios são passos críticos durante o desenvolvimento e regeneração do SNC dos vertebrados (171). Este processo abrange vários estágios, através dos quais as células sofrem mudanças bioquímicas e morfológicas dramáticas (migração, aumento da complexidade morfológica e expressão de padrões de marcadores específicos) (172,173). Os eventos moleculares subjacentes à proliferação, sobrevivência, diferenciação e maturação de OLs permanecem ainda mal compreendidos, mas o conhecimento desses processos é de grande valor para o desenvolvimento de terapêuticas para doenças desmielinizantes. A esclerose múltipla é uma doença inflamatória do SNC que resulta em deficiências físicas e cognitivas, que tem como principais características patológicas a perda de mielina mediada por inflamação (desmielinização) e a remielinação incompleta (4). Embora a remielinação ocorra nos estágios iniciais da doença, diminui à medida que esta progride, resultando em perda axonal e placas cronicamente desmielinizadas (174). As OPCs, células responsáveis pela remielinização do SNC (175), estão presentes na maioria das lesões características da doença, que em última análise, não conseguem diferenciar-se em OLs mielinizantes maduros, conduzindo a falhas na remielinação (176,177).

As OPCs são células altamente proliferativas, móveis e bipolares que expressam níveis elevados de gangliósidos reconhecidos pelo anticorpo A2B5, o receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF α R) e o proteoglicano antigénio neural/gial 2 (NG2) (169). À medida que as OPCs amadurecem, formam OLs mielinizantes maduros que expressam proteínas específicas, incluindo proteína básica de mielina (MBP) (178). Após se tornarem células adultas começam a estender uma rede complexa de processos com o objetivo de contactar múltiplos axónios (4). Uma vez que o contacto axoglial é estabelecido, os OLs produzem

grandes quantidades de membrana especializada (mielina) (4). Os estágios finais da mielinização envolvem a expulsão do citoplasma da membrana para formar a mielina compacta (4). A interação funcional entre as integrinas expressas por OLs e a laminina expressa na superfície celular dos neurónios é essencial para a mielinização adequada (4).

Durante o desenvolvimento, a expressão de integrinas é regulada não só pelo programa de desenvolvimento genético, mas também é afetada por componentes da MEC (4). Diferentes tipos de células expressam conjuntos distintos de integrinas, dependendo da sua linhagem e estágio de diferenciação.

As células oligodendriais são conhecidas por expressar *in vitro* um repertório limitado de integrinas, incluindo a $\alpha 6\beta 1$ e quatro membros da subfamília $\alpha \nu$ ($\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$ e $\alpha \nu\beta 8$) (Figura 5). *In vivo*, o padrão de expressão de cada uma destas integrinas parece ser regulado pelo desenvolvimento, sugerindo que cada integrina desempenha um papel vital durante a fase do desenvolvimento de OLs em que é expressa (179,180). Estudos recentes *in vitro* mostraram que a integrina $\alpha \nu\beta 1$ parece desempenhar um papel essencial no apoio à migração de OPCs (181), um papel consistente com seu padrão de expressão no qual os níveis de integrina $\alpha \nu\beta 1$ são diminuídos coincidentemente com a perda da fenótipo migratório. A sobreexpressão de $\alpha \nu\beta 3$ aparenta estimular a proliferação celular e inibir a diferenciação, enquanto o bloqueio do anticorpo $\alpha \nu\beta 5$ resulta na inibição da extensão de processos (179), sugerindo um possível papel para esta integrina durante a diferenciação (182). Pelo contrário, os níveis de integrina $\alpha \nu\beta 3$ demonstraram ser sobreexpressos antes da expressão da integrina $\alpha \nu\beta 5$ e rapidamente subexpressos coincidentemente com o início da diferenciação final, sugerindo que a integrina $\alpha \nu\beta 3$ pode desempenhar um papel importante nas células que estão a perder o potencial migratório e se preparam para suprimir o ciclo celular e iniciar a diferenciação.

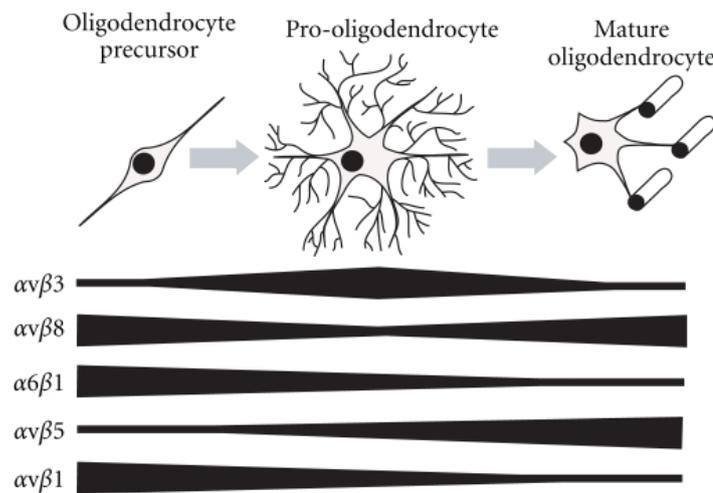


Figura 5| Representação da expressão dos recetores de integrina ao longo do desenvolvimento de OLs. Adaptado de (O'Meara et al., 2011) (19).

Por fim, a $\alpha6\beta1$ tem vindo a ser descrita como uma integrina essencial para a mielinização através da interação com LM-211 (6). Dos vários recetores de integrina expressos por OLs, a integrina $\alpha6\beta1$ é o único complexo conhecido que liga à LM-211 (155,179). A subunidade $\beta1$ deste recetor parece ser especialmente importante para a maturação de OLs, uma vez que é responsável pela transmissão dos sinais da MEC para as proteínas de sinalização a jusante, que em última instância, afetam o desenvolvimento dos OLs (4). As integrinas ativadas recrutam e ativam proteínas cinase da família Src (SFK). As SFKs são tirosina cinases não recetoras que integram sinais externos recebidos por meio de integrinas e recetores do fator de crescimento (140). Uma dessas, a Lyn, é expressa na linhagem oligodendrogliar. Outra delas, a Fyn, é expressa no cérebro (neurónios e células gliais) e o pico da sua atividade, durante o desenvolvimento, está correlacionado com a mielinização. Sabe-se ainda, que esta cinase está envolvida no processo de diferenciação de OLs (8).

No estágio de OPCs, a cinase Lyn está associada ao complexo PDGF α R-integrina $\alpha v\beta3$. A ativação de integrina $\alpha v\beta3$ promove a fosforilação da Lyn e a sua subsequente ativação (8), conduzindo à ativação das vias de sinalização que promovem a proliferação (Figura 6- 1). A Fyn é mantida no estado inativo pela fosforilação da Csk, uma cinase que regula negativamente a função das SFKs. No entanto, uma vez estabelecido o contacto axonal, a interação da integrina $\alpha6\beta1$ com

a LM-211 induz a dissociação da Lyn do complexo integrina-fator de crescimento e a desregulação da Csk, resultando na ativação da Fyn. O complexo Fyn- $\alpha6\beta1$ pode acionar a sinalização PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase) e MAPK (cinase ativada por mitogénio), dependendo da ligação com recetores PDGF α R ou ErbB2/4 e promover a sobrevivência, diferenciação de OLs e formação de mielina (Figura 6- 2) (8).

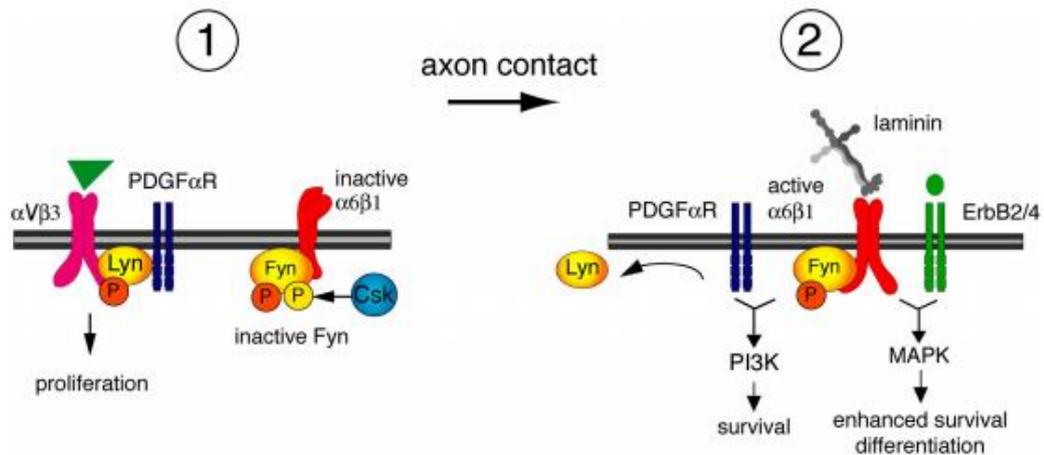


Figura 6| Alternância entre proliferação e diferenciação em OLs e sinalização mediada por integrinas. Adaptado de (Colognato et al. 2004) (8).

A Fyn desempenha um papel importante no processo de mielinização do SNC e a sua ausência conduz a uma redução dos níveis da proteína MBP e leva à hipomielinização (143). Além disso, a Fyn participa ativamente na regulação da forma celular, através da modulação de GTPases da família Rho (RhoA, Rac1 e Cdc42) que regulam a polimerização da actina e, assim, controla a estrutura e a forma do citoesqueleto (183).

As GTPases da família Rho agem como interruptores moleculares por meio de ciclos entre estados ligados a guanosina trifosfato- GTP- (*on*- forma ativa) e ligados a guanosina difosfato- GDP- (*off*- forma inativa). Os fatores de troca de nucleótidos de guanina (GEFs) estimulam a troca do PIB pelo GTP para gerar a forma ativa, enquanto que as proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) promovem a hidrólise do GTP para o GDP (Figura 7).

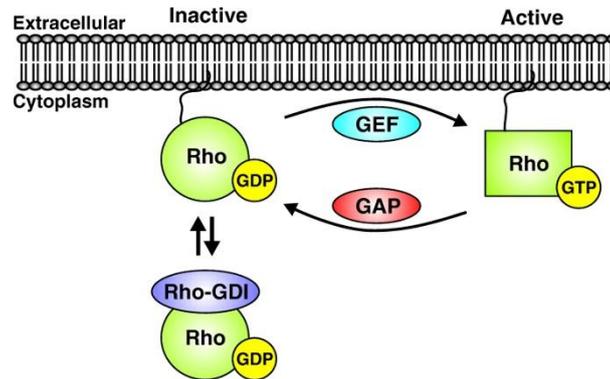


Figura 7 | Ciclo de ativação de Rho-GTPase. Os inibidores da dissociação do Rho-GDP (Rho-GDIs) sequestram no citoplasma as Rho-GTPases (Rho) inativas, ligadas a GDP. Quando libertadas dos RhoGDIs, as Rho-GTPases são direcionadas para a membrana plasmática, onde o seu ciclo de ativação é regulado por GEFs que promovem a transição de GDP para GTP e a ativação das Rho-GTPases. A inativação das Rho-GTPases é mediada por GAPs que promovem a hidrólise do GTP para o GDP. Adaptado de (Huveneers et al. 2009) (184).

Desta forma, as GTPases da família Rho desempenham um papel essencial no controlo da morfologia celular (Figura 8). A ativação da Fyn leva à ativação da Cdc42-Rac1, conduzindo à formação de filopodia e lamellipodia, respetivamente. Ao mesmo tempo, a fosforilação de p190 pela Fyn promove um aumento da atividade de p190RhoGAP, levando a uma inibição dos níveis de RhoA-GTP, suprimindo a contratibilidade da actomiosina e aumento da actina. Em conjunto, a ativação da Fyn conduz à diferenciação de OLs (185).

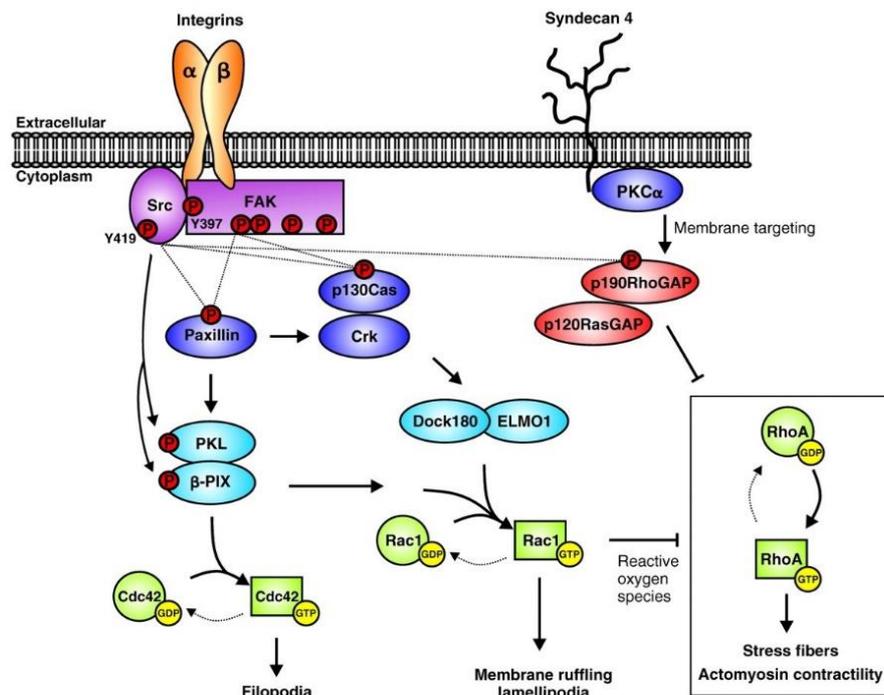


Figura 8 | Sinalização Fyn e regulação da forma celular. Adaptado de (Huveneers et al. 2009) (184).

A diferenciação de OLs é modulada não só por fatores solúveis (GFs e hormonas), bem como, por fatores insolúveis (proteínas da MEC) e outros elementos do microambiente (172). Desta forma, o desenvolvimento de OLs e a mielinização dos axónios são processos altamente regulados e controlados por uma série de mecanismos que incluem ligandos de superfície axonal, moléculas secretadas e atividade axonal (Figura 9) (186).

A sinalização através da via Wnt/ β -catenina é um regulador chave no desenvolvimento de OLs (186). Tanto a atividade da β -catenina, como a expressão de Tcf4/Tcf712 (fatores de transcrição que medeiam os efeitos transcricionais) parecem ser necessários à diferenciação (186).

Também a expressão de vários outros fatores de transcrição são necessários à diferenciação de OLs (Figura 9), incluindo Olig2 (que regula a especificação inicial da linhagem de OLs) (186), Olig1 e outros a jusante, como Ascl1, Nkx2.2, Sox10, YY1 e Tcf4 (que regulam a geração de OLs pós-mitóticos maduros) (187). Todos estes estão presentes quer em OPCs, quer em OLs pós-mitóticos, com exceção de Tcf4, que é expresso transitoriamente durante a diferenciação (188,189).

Vários genes específicos de OLs também têm prováveis papéis na regulação do processo de mielinização (190–192), incluindo MRF (fator regulador de genes de mielina) expresso no SNC somente por OLs pós-mitóticos (191). Por outro lado, a diferenciação de OLs também é regulada ao nível da remodelação da cromatina por HDACs (histonas desacetilases) (193) que promovem a diferenciação de OLs através da inibição da expressão de genes e vias de sinalização que, de outra forma, agiam para bloquear a diferenciação (186). Estes, incluem a inibição mediada por HDACs da via Wnt/ β -catenina (189) e a atuação de HDACs em conjunto com o fator de transcrição YY1 para inibir a expressão de fatores como Id4 e Tcf4 (194).

O controlo pós-transcricional da expressão genética por microRNAs também desempenha um papel fundamental no controlo da mielinização (186). Vários microRNAs são induzidos simultaneamente à diferenciação de OLs (nomeadamente, miR-219 e miR-338) (186) e que têm como alvo genes que atuam

de forma a manter as OPCs no estado indiferenciado (PDGFR α , Sox6 e Hes5) (195,196). Estes microRNAs, inibem a expressão de genes que promovem a manutenção de OPCs, conduzindo à inibição da proliferação, promovendo assim a diferenciação (186).

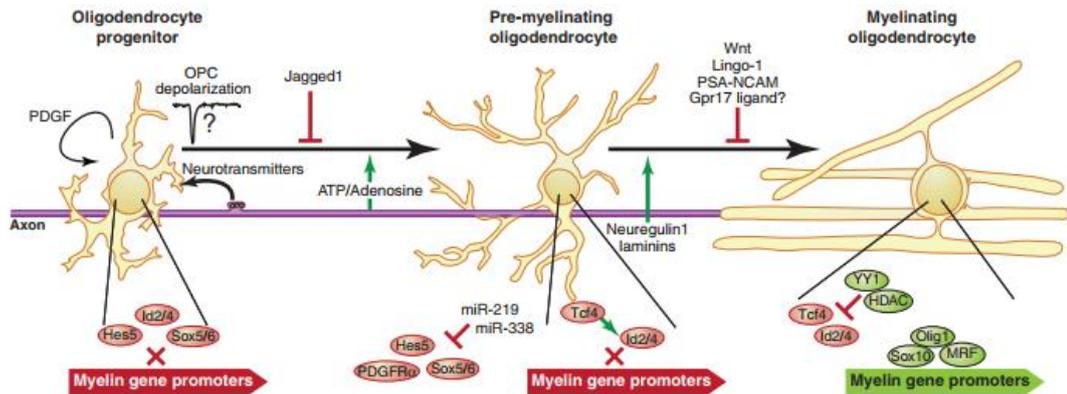


Figura 9| Esquema da linhagem oligodendrocítica mostrando alguns dos fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam a diferenciação de OLs e a mielinização de axônios. A diferenciação de OLs requer a integração de múltiplos sinais extracelulares através da coordenação de múltiplas vias de sinalizações. Adaptado de (Emery, 2010) (192).

1.4 Mecanotransdução, mecanosensores e sinalização celular

Além da composição, as propriedades físicas da MEC, incluindo a rigidez, elasticidade e topografia, são características específicas de cada tecido que surgiram recentemente como determinantes adicionais de respostas celulares à MEC (197). Sabe-se que as células são minuciosamente sensíveis aos sinais biofísicos codificados dentro dos componentes do microambiente do tecido, em particular da MEC (198). Grandes progressos têm sido feitos no que refere à compreensão do papel das propriedades físicas e químicas da MEC na resposta celular, manutenção do tecido, regeneração e doença (199), no entanto, as interações célula-MEC não são apenas influenciadas pela composição química e organização estrutural da MEC, mas também pelas suas propriedades mecânicas (200). A capacidade das células perceberem e responderem a esses estímulos mecânicos é crítica para inúmeros processos biológicos, incluindo embriogênese (201,202), desenvolvimento (201,202) e homeostase dos tecidos (203,204).

Basicamente, todos os organismos desde bactérias aos humanos são mecanossensíveis (205). Estímulos mecânicos extracelulares, incluindo rigidez do substrato (206,207), restrições geométricas que impõem a forma celular (208) e elementos micro ou nano-topográficos do ambiente extracelular (209,210) são interpretados pelas células residentes e transmitidos através dos constituintes da MEC, estruturas intracelulares e dos seus recetores (200). A deteção de forças externas ou propriedades biomecânicas e a transdução desta informação desencadeia uma resposta de sinalização intracelular específica (211), que fornece um meio simples pelo qual as células e os organismos podem garantir a estabilidade estrutural, bem como, regular os movimentos morfogénéticos para gerar estruturas tridimensionais (3D) precisas (205).

A capacidade das células interpretarem os sinais mecânicos requer o contato direto do mecanosensor (estrutura capaz de detetar alterações numa variedade de forças externas ou internas) com o espaço extracelular, ou a sua capacidade de detetar mudanças num meio interferente (212). Os mecanosensores existem em praticamente todos os tipos de células e constituem um grupo de recetores específicos que respondem à força externa com mudanças conformacionais. Podem ser proteínas, cílios primários ou estruturas celulares compósitas que interagem com proteínas celulares, alteram a composição dos lipídios da membrana ou interagem com componentes da MEC ou citoesqueleto (212). Quando um estímulo mecânico é recebido, o sinal é amplificado e propagado através de uma série de reações bioquímicas dependentes da força, por meio do qual as vias de sinalização intracelular são sequencialmente ativadas através da mecanotransdução (Figura 10) (197,213). Por exemplo, em resposta à tensão elevada nos contatos focais (que subsequentemente amadurecem, formando AFs), ocorrem aumentos no agrupamento de integrinas e fosforilação da cinase FAK, iniciando uma cascata de eventos de sinalização que inclui a ativação de GTPases da família Rho, como RhoA, que estimula a remodelação da actina, induz a fosforilação proteica para promover a sobrevivência celular e altera os níveis e a atividade dos fatores de transcrição para regular a expressão genética (214). Outra via de sinalização dependente de integrinas que é ativada em resposta à força mecânica é a via MAPK-ERK (cinase

regulada por fatores extracelulares), que parece estar implicada em vários tipos de cancro e regula a proliferação e diferenciação celular, influenciando o desenvolvimento dos tecidos (215,216).

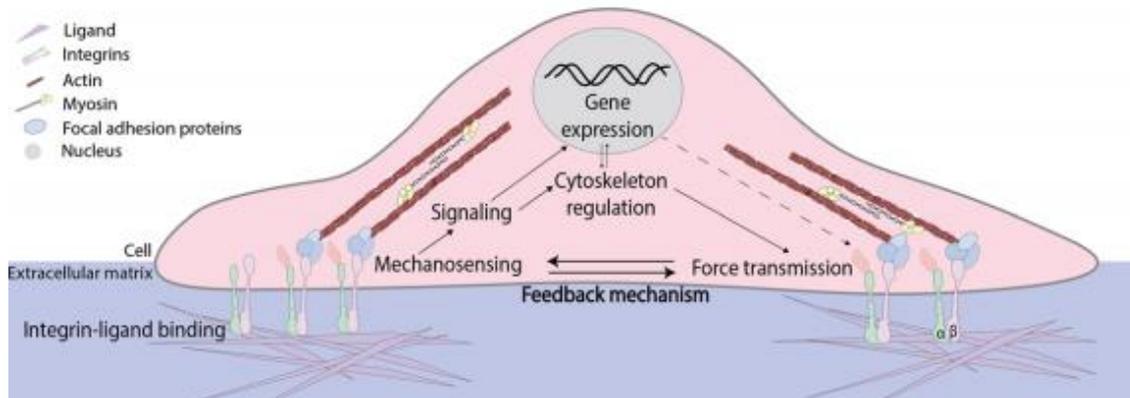


Figura 10| Mecanotransdução. As células interagem com a MEC através da adesão mediada por integrinas, permitindo às células sentir as propriedades mecânicas da MEC e convertê-las em sinais bioquímicos que, por sua vez, iniciam uma cascata de vias de sinalização que, em última instância, afeta a organização do citoesqueleto, a expressão genética e, eventualmente, as funções celulares. Adaptado de (Seetharaman e Etienne-Manneville, 2018) (197).

No citoplasma, a transmissão da força é mediada pelo citoesqueleto, uma estrutura celular altamente dinâmica composta por filamentos de actina (6 nm de diâmetro), filamentos intermédios (10 nm) e microtúbulos (23 nm) (217). Estes três elementos consistem em múltiplos monómeros capazes de abranger grandes distâncias dentro da célula (217). As tubulinas polimerizam formando cilindros ocos (microtúbulos) e fornecem uma estrutura para as proteínas motoras (cinesinas e dineínas) que viajam entre diferentes compartimentos celulares (218). Monómeros de vimentina, queratina e laminina formam filamentos intermédios que conectam o núcleo com o retículo endoplasmático, a mitocôndria e o aparelho de Golgi, proporcionando integridade estrutural à célula (217). Os monómeros de actina reúnem-se em actina filamentosa (F-actina) e juntamente com os filamentos de miosina, formam o aparelho contrátil do citoesqueleto (217). Na membrana celular, esses filamentos ancoram com conjuntos de proteínas, conhecidas por AFs (Figura 11 A). Estes complexos multiproteicos transmembranares fornecem a ligação

mecânica entre o citoesqueleto de actina e a MEC (214) via recetores de integrina (219).

A formação das AFs é iniciada por heterodímeros de integrina ativados que se ligam à MEC através dos seus domínios extracelulares, conectados ao citoesqueleto de actina intracelular através de uma multiplicidade de proteínas de sinalização (Figura 11 A) (219). A ligação das integrinas à MEC resulta no recrutamento e agrupamento de outras proteínas (Figura 11 B) (220). A montagem e maturação das AFs envolve múltiplas interações moleculares, governadas por forças internas e externas (221–223).

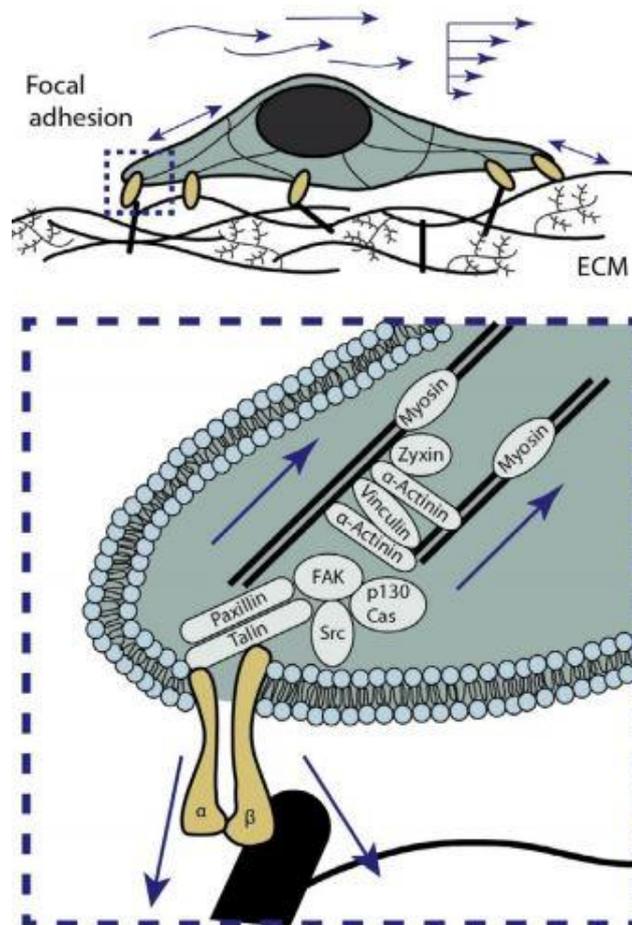


Figura 11| Forma e função das AFs. (A) Esquema de uma célula que experimenta forças tangenciais causadas pelo fluxo de fluidos e compressão e tensão entre o citoesqueleto interno da célula e a MEC subjacente. Essas forças são transmitidas entre a célula e a MEC nas AFs. (B) Reprodução ampliada de uma AF. Após o acoplamento inicial de integrinas e sua ligação com a MEC, um dímero de talina (proteína adaptadora) liga-se às caudas citoplasmáticas das integrinas, impulsionando o recrutamento de outras proteínas. Este processo é seguido pelo recrutamento de componentes adicionais mecanossensíveis, incluindo FAK e p130Cas que participam na regulação das AFs. Adaptado de (Haase et al., 2014) (220).

A aplicação de uma força externa pode influenciar diretamente a forma, tamanho e composição das AFs demonstrando assim uma correlação direta entre a força e a geração de sinais bioquímicos (224). As proteínas inseridas nas AFs (Figura 12), incluindo as próprias integrinas (225) e outras proteínas, como talina (226) e p130Cas (227), sofrem alterações conformacionais em resposta à força aplicada (214). Essas alterações conformacionais dependentes da força podem estabilizar as interações proteína-proteína, ou podem desembaraçar a molécula e revelar locais de ligação, como no caso da talina (214). A talina sofre um desdobramento dependente da força, que resulta na exposição de locais de ligação à vinculina (226,228), inacessíveis de outra forma, resultando num aumento no agrupamento das integrinas e a nucleação das proteínas adaptadoras, o que facilita a ligação célula-substrato (214). Da mesma forma, a FN também se pode desdobrar em resposta ao stresse mecânico, revelando locais de ligação que reforçam as adesões de integrina e promovem a montagem do conjunto de AFs (216). Essas proteínas adaptadoras provavelmente modulam a sinalização externa em cooperação com as integrinas (212).

Para além das proteínas referidas, outras como a α -actinina, são recrutadas para as AFs, permitindo a ligação do citosqueleto de actina (229). Outras proteínas associadas referidas anteriormente, como FAK e SFKs, regulam as GTPases da família Rho, controlando a dinâmica do citoesqueleto, a disseminação celular e a contratibilidade (184).

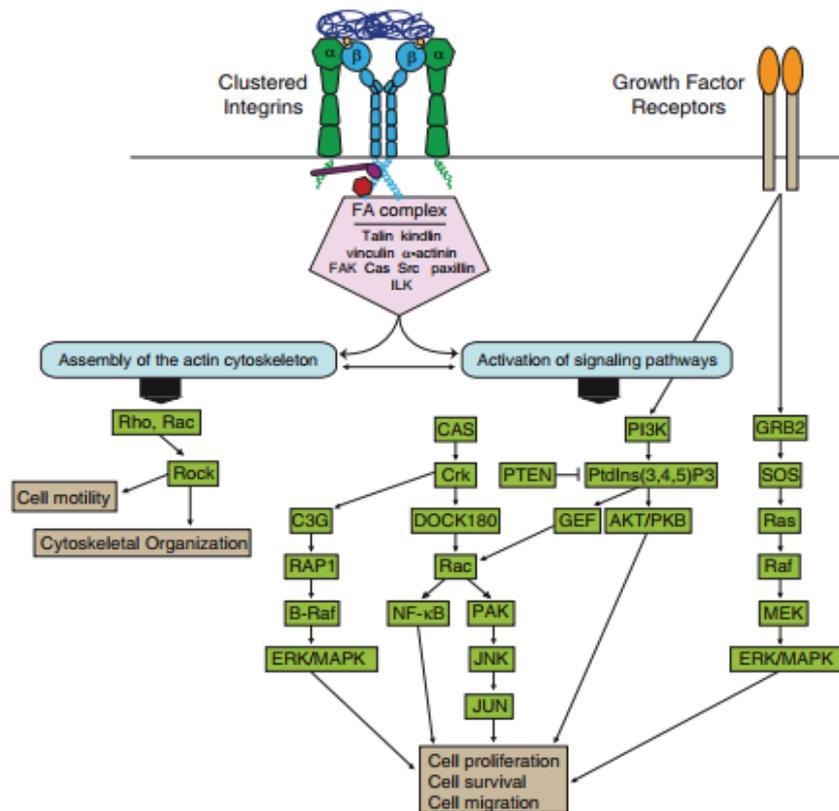


Figura 12| Ativação de diversas vias de sinalização por integrinas. As integrinas agrupam-se e desempenham um papel importante na formação do complexo macromolecular que medeia os processos a jusante, incluindo a montagem do citoesqueleto de actina e ativação das vias de sinalização: Src-FAK, Ras-MEK-MAPK e Akt/PI3K. Adaptado de (Srichai e Zent, 2010) (151).

1.4.1 Mecanobiologia das células

O rápido crescimento do campo da mecanobiologia tem permitido investigar a influência das forças mecânicas nos processos celulares e moleculares (230). As motivações primárias deste campo são a descoberta dos mecanismos que permitem às células detetar, transduzir, responder e exercer estímulos mecânicos, bem como caracterizar as propriedades mecânicas das moléculas e células (230).

Entender a dinâmica célula-MEC e as interações célula-célula e a sua relação funcional na regulação de diversas funções das células aderentes será um objetivo a longo prazo para a investigação na área da mecanobiologia.

1.4.1.1 Rigidez do substrato e comportamento celular

A rigidez da MEC é cada vez mais reconhecida como um importante mediador do comportamento celular (231), uma vez que parece exercer um papel importante na regulação da sinalização celular, com efeitos sobre crescimento, sobrevivência e mobilidade (231).

Grandes esforços foram dedicados a reproduzir *in vitro* os microambientes propícios a vários tipos celulares, de forma a controlar e direcionar o comprometimento das células. Todavia, durante muito tempo, foi dada pouca atenção ao papel dos atributos mecânicos do substrato na organização de células e tecidos (232). Substratos de vidro ou plástico são comumente usados para a cultura celular padrão 2D (bidimensional) *in vitro*, com rigidez na gama do gigapascal (GPa). Com o desenvolvimento de substratos biomiméticos de rigidez ajustável (mimetizando os tecidos nativos), novos dados continuam a revelar detalhes cada vez mais inspiradores sobre o microambiente mecânico, especialmente a rigidez, que afeta profundamente o comprometimento celular (233).

A rigidez dos materiais é medida pela relação entre as forças aplicadas e a deformação resultante de um material. Num contexto biológico, rigidez ou elasticidade são referidas como módulo de *Young* ou elástico (E), referente à quantidade de força por unidade de área necessária para deformar o material por uma dada quantidade fracional sem qualquer deformação permanente (E alto corresponde a alta rigidez e baixa deformabilidade), isto é, descreve a sua resistência (ou tendência) a deformar em resposta ao stress mecânico (230).

Para o módulo elástico a força é aplicada perpendicularmente à superfície do material, enquanto que para o módulo de cisalhamento (G) a força é aplicada paralelamente à superfície (Figura 13) (234). Como a tensão é um valor adimensional, as unidades de rigidez são força por área, sendo a unidade SI o Pascal (234). E e G estão relacionados pela seguinte função: $E = 2G(1 + \nu)$, onde ν é a razão de Poisson.

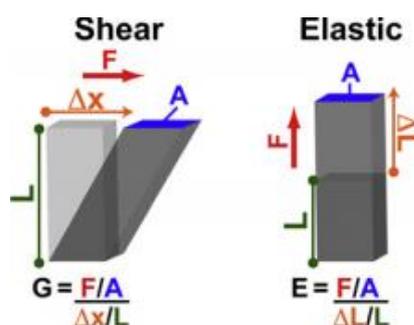


Figura 13| O módulo da rigidez. O stress é a quantidade de força aplicada por área (F/A) e a deformação é o deslocamento na direção da força aplicada em relação ao comprimento inicial ($\Delta x/L$ ou $\Delta L/L$). Ambos os módulos elástico (E) e de cisalhamento (G) representam a proporção de stress sobre a tensão, no entanto, há uma diferença na direção da força aplicada. Adaptado de (Moore et al., 2010) (234).

Dependendo das funções específicas e da localização no corpo, os tecidos exibem diferentes graus de rigidez que variam 0,1 a 30000000 kPa. Diversos estudos apontam para uma rigidez de 0,1- 10 kPa para cérebro, 10-100 kPa para músculo, 100-1000 kPa para tecido conectivo e artérias e 15000000-30000000 kPa para osso (Tabela 5) (234). Comparando estes valores com a rigidez de substratos de plástico ou vidro comumente utilizados para cultura celular, fica claro que a maioria das células em cultura está num ambiente mecânico não fisiológico (231).

Tabela 5| Módulo de elasticidade/rigidez (E) dos diferentes tecidos dos mamíferos. Adaptado de (Moore et al., 2010) (234).

Tecido/célula	Rigidez/Módulo de elasticidade (kPa)
Cérebro	0,1-10
Músculo	12-100
Gordura	20
Artérias	100-3800
Osso	17100000-28900000

Os tecidos são viscoelásticos, demonstrando algumas propriedades de um sólido elástico e algumas de um líquido viscoso (231). À medida que uma célula adere ao substrato, puxa-o através do seu citoesqueleto de actina-miosina, deteta a resistência e, por sua vez, responde a esta resistência através do citoesqueleto. Muitas dessas respostas são não-lineares, de modo que pequenas alterações na rigidez da matriz podem resultar em mudanças dramáticas no fenótipo celular

(235). Embora a rigidez ideal da matriz varie entre diferentes tipos de células, geralmente, as células em substratos mais rígidos têm maiores AFs, acompanhadas por fibras de stresse de actina aumentadas, maiores forças de tração e maior área de disseminação, conduzindo a citoesqueletos mais rígidos e organizados e AFs mais estáveis (Figura 14) (235). Estas células são proliferativas, com um fenótipo distendido e aumento do número de ligações de integrina-MEC (Figura 14). Por outro lado, células em matrizes menos rígidas são arredondadas e minimamente adesivas e o crescimento é lento (ou minimamente proliferativo) e propenso à apoptose (Figura 14) (231).

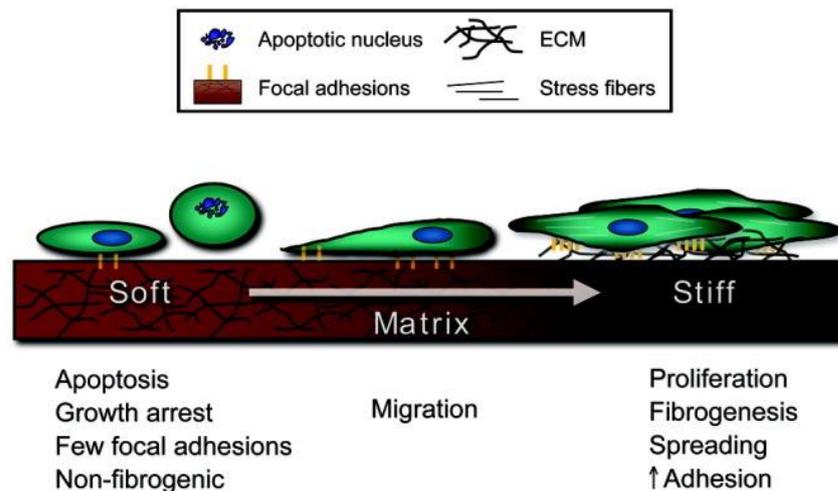


Figura 14| Efeitos da mecânica da matriz no comportamento celular. Adaptado de (Wells, 2008) (231).

Assim, as propriedades mecânicas dos tecidos não são apenas importantes para a manutenção da sua integridade, mas também para regular a função celular e, qualquer alteração poderá conduzir à disfunção celular e progressão de doença. Estratégias de medicina regenerativa bem sucedidas devem considerar o ambiente mecânico nativo, para que sejam capazes de provocar uma resposta celular favorável e integrá-la à estrutura nativa do tecido (236).

1.4.1.2 Modulação da diferenciação de OLs por mecanotransdução

Embora grandes progressos tenham sido feitos nos últimos anos, muitos aspectos da mecanotransdução continuam por desvendar. Além disso, o papel deste tipo de sinalização ainda é bastante inexplorado em muitos tipos celulares, nomeadamente em OLs, dado que a maioria dos estudos de mielinização se centra na regulação bioquímica (incluindo os aspectos bioquímicos do contato axónio-OL) e o papel das características mecânicas na diferenciação e mielinização de OLs permanece pouco estudado (171).

Em 2009 surgiu a hipótese de que as propriedades biofísicas do ambiente extracelular também desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento de OLs (237,238) e desde então, vários avanços foram feitos. A mecanobiologia de OLs emergiu como um campo vibrante com implicações importantes para estudos translacionais nas áreas da biologia dos OLs e distúrbios desmielinizantes (172). Um número crescente de estudos tem sido publicado, demonstrando o efeito das propriedades biofísicas do meio extracelular sobre a diferenciação de OLs e a importância da rigidez e topografia da MEC, forças de tensão e restrições espaciais (172). Jagielska et al., 2012, demonstraram que a diferenciação de OLs *in vitro* se correlaciona com a rigidez mecânica dos substratos subjacentes (239). No entanto, nesses estudos, a poli-D-lisina (PDL) (que não é proteína constituinte da MEC mas sim um polipéptido sintético de lisina) foi usada para promover a adesão celular, e portanto, o papel das proteínas da MEC e o envolvimento das integrinas não foram abordados diretamente. No artigo Lourenço et al., 2016, o nosso laboratório procurou esclarecer a importância da combinação de substratos sintéticos com proteínas de MEC durante a diferenciação de OLs (240). Aí foi demonstrado que a manutenção do estado progenitor de OPCs é favorecida por substratos com rigidez semelhante à dos tecidos cerebrais de ratos (241) (~6,5 kPa) funcionalizados com FN (conhecida por favorecer o estado progenitor de OLs (8)) e que a diferenciação de OPCs é aumentada quando cultivada em substratos com a mesma rigidez, mas funcionalizada com LM-211/MN (descrita como promotora da diferenciação de OPCs em OLs maduros (6)). Desde então, estudos baseados na modulação da diferenciação de OLs utilizando substratos

que mimetizam a rigidez do tecido cerebral em combinação com proteínas da MEC, têm sido realizados com LM-211/MN e/ou PDL.

Apesar das preparações comerciais de MN humana serem muito usadas em estudos funcionais, as suas propriedades moleculares permanecem ainda pouco conhecidas. Um estudo realizado por Wondimu et al., 2006, que objetivou a caracterização de várias preparações comerciais de laminina isolada de placenta humana e comparação com proteínas recombinantes, demonstrou que diferentes preparações de laminina isoladas diferiam na sua composição molecular, consistindo em proteínas altamente fragmentadas, uma mistura de isoformas de laminina e/ou contaminação com proteínas da MEC, como a FN (242). Também diferentes lotes da mesma preparação diferiram entre si, refletindo heterogeneidade molecular (242). Os autores sugerem até, que estudos anteriormente obtidos usando estas preparações necessitam de ser interpretados de forma cuidadosa e podem requerer revisão, e estudos funcionais futuros devem recorrer à caracterização molecular das lamininas (242).

A produção de proteínas recombinantes tem surgido como uma abordagem valiosa para estudos funcionais e neste trabalho, procurámos testar a utilização de isoformas recombinantes de laminina e verificar o seu efeito na diferenciação de OLs.

1.5 Objetivos

Com vista à otimização da plataforma de diferenciação de OPCs estabelecida por Lourenço et al., 2016, (usando substratos poliméricos elásticos sintéticos (6,5 kPa) que mimetizam a rigidez nativa do tecido cerebral e sua funcionalização com proteínas da MEC, permitindo estudar o efeito combinado de tais fatores durante a diferenciação de OLs) o presente trabalho tem em vista utilização de três trímeros recombinantes de laminina (LM-211, LM-411 e LM-521) no processo de diferenciação da linha celular oligodendrócito-tipo 2-astrócito (CG-4). As lamininas referidas foram descritas na literatura como sendo expressas no SNC (como a LM-211 e LM-521) e/ou com funções importantes no SNC (como a LM-211, LM-411 e

LM-521), envolvidas na regulação de OLs (como a LM-211) ou por interagirem com integrinas essenciais à biologia de OLs, incluindo $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, e determinar o seu potencial para serem utilizados no futuro em substituição às proteínas humanas purificadas tradicionalmente utilizadas (como por exemplo a MN, uma proteína purificada, enriquecida em LM-211), que são frequentemente difíceis de obter na forma nativa em quantidades suficientes a partir de tecidos ou culturas de células, e sem que apresentem contaminação com outras proteínas da MEC (242).

Embora o mecanismo geral pelo qual a adesão mediada por integrinas participa nas respostas mecânicas celulares seja conhecido, os mecanismos moleculares por detrás dos distintos papéis de cada subtipo de integrina na regulação da rigidez, geração de força de tração, organização do citoesqueleto e adesão, sinalização celular e mecanotransdução permanecem ainda pouco compreendidos. De forma a avaliar o papel das integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 6\beta 1$ na diferenciação de culturas oligodendrocíticas na presença de LM-521 (amplamente descritas na literatura como importantes para a proliferação e diferenciação de OPCs, respetivamente) procedemos a um ensaio de inibição das subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$ de integrina, afim de perceber o seu efeito na diferenciação da linha celular em estudo.

CAPÍTULO II

Materiais e métodos

2 Materiais e métodos

2.1 Cultura de células CG4

Todos os procedimentos relativos à cultura e manipulação celular foram executados em condições estéreis usando uma cabine de biossegurança classe II (câmara de fluxo laminar vertical). A linha celular escolhida foi a linha celular CG4, uma linha celular de rato que manifesta propriedades bi-potenciais de OLs 2-astrócito (O-2A) com potencial para se diferenciarem em OLs e astrócitos do tipo 2 em condições de cultura apropriadas (243). Após a retirada das ampolas do azoto líquido (onde estavam criopreservadas) e descongelamento, a solução de congelamento ((70% Dulbecco's Modified Eagle Medium- DMEM com elevado teor de glicose- 4500 mg/L- (Hyclone); 20% soro fetal bovino- FBS (Life Technologies); 10% dimetilsulfóxido- DMSO)) contendo as células foi pipetada para um falcon, ao qual foi adicionado lentamente meio de recuperação suplementado com soro ((DMEM com elevado teor de glicose- 4500 mg/L- (Hyclone), 5% (v/v) de FBS (Life Technologies), piruvato de sódio (2 mM) (Sigma-Aldrich), insulina humana (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), penicilina (10 U/mL) (Life Technologies), estreptomicina (10 µg/mL) (Life Technologies) e anfotericina B (2,5 µg/mL) (Life Technologies)). As células, juntamente com o meio de recuperação foram centrifugadas a 201g, ressuspensas em meio de recuperação e colocadas em placas de poliestireno de cultura de tecidos (TCPs) de 55 cm² (Corning-Costar), previamente revestidas com PDL (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich) e colocadas numa incubadora a 37°C, com 5% de dióxido de carbono (CO₂), 95% de ar e 95% de humidade, onde foram mantidas em cultura. Posteriormente à adesão celular (sensivelmente 30 minutos após a adição do meio de recuperação), o meio de recuperação foi substituído por meio de proliferação (DMEM com alto teor de glucose, suplementado com apo-transferrina (50 µg/ml), biotina (9,8 ng/ml), selénio (40 ng/ml) (todos os suplementos de Sigma-Aldrich), 30% de meio condicionado de linha celular B104, penicilina (10 U/ml), estreptomicina (10 µg/ml) e anfotericina B (2,5 µg/ml)). As células foram mantidas na incubadora de CO₂ a 37°C até atingirem a confluência.

2.2 Expansão da cultura celular

Atingida a sub-confluência da placa, as células foram sujeitas a passagem celular para uma nova placa. As placas contendo a cultura celular foram lavadas três vezes com solução de Pucks (80 g/L de cloreto de sódio, 4 g/L cloreto de potássio, 0,6 g/L de dihidrogenofosfato de potássio, 0,9 g/L heptahidrato dibásico de fosfato de sódio e 10 g/L de D-glucose) (pH=7,4), seguidas de dissociação e desprendimento através da incubação por um período de 5 minutos a 37°C numa solução a 5% (v/v) de 0,05% tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético (Life Technologies)). A tripsina foi inativada pela adição de 10× o volume de meio de recuperação e as células foram centrifugadas a 201g durante 5 minutos à temperatura ambiente, re-suspendidas, contadas e semeadas em meio de recuperação, em TCPs previamente revestidas com PDL (100 µg/mL). As células foram colocadas a aderir durante 30 minutos na incubadora a 37°C, com 5% CO₂, 95% de ar e 95% de humidade. Após a adesão celular, o meio de recuperação foi substituído por meio de proliferação. As células foram mantidas numa incubadora tal como indicado anteriormente até atingirem a sub-confluência, repetindo-se o procedimento.

2.3 Cultura de células B104 e preparação de meio condicionado

As células de neuroblastoma B104 foram descongeladas e mantidas em meio de proliferação de B104 (DMEM/F12 (Life Technologies), suplementado com FBS a 10% (v/v), penicilina (10 U/mL), estreptomicina (10 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL)), a 37°C, com 5% CO₂, 95% de ar e 95% de humidade. Para obter o meio condicionado, as células foram previamente semeadas a uma densidade de 15000 células/cm² em meio de proliferação durante 24h. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução de Pucks e o meio foi substituído por meio definido, composto por DMEM/F12 (1:1) suplementado com holo-transferrina (10 µg/mL), selénio (5 ng/mL), putrescina (16 µg/mL), progesterona (6,3 ng/mL)- todos da Sigma-Aldrich- e penicilina (10 U/mL), estreptomicina (10 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). Três dias depois, o meio condicionado foi recolhido e adicionou-se fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) (1 µg/mL). Em seguida, o meio foi centrifugado a

201g a 4° C durante 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado (filtro de 0,22 µm) e armazenado a -20°C.

2.4 Hidrogéis de poliacrilamida

Os hidrogéis de poliacrilamida foram preparados usando um protocolo baseado em Lourenço et al., 2016 (240). Os hidrogéis de poliacrilamida foram montados sobre lamelas de vidro reativas (15 x 15 mm, exceto para o ensaio de bloqueio de integrinas em que os géis foram polimerizados sobre lamelas redondas de 12 mm de diâmetro) permitindo o estabelecimento de ligações covalentes entre o hidrogel e o vidro (244). As lamelas de vidro foram “ativadas” pelo tratamento com uma solução (v/v) de 3-(trimetoxisilil)propilmetacrilato diluído em etanol absoluto 1:200, suplementado com 3% (v/v) de ácido acético (diluído 1:10 em água Milli-Q - H₂O mQ). Esta solução foi colocada a reagir por 3 minutos sobre as lamelas limpas e estéreis, seguindo-se uma lavagem com etanol absoluto e secagem (no interior da câmara de fluxo laminar de cultura de tecidos).

Os componentes necessários à formulação dos hidrogéis foram adicionados a um falcon estéril: água desionizada estéril, 40% de acrilamida (Bio-Rad), 2% de bisacrilamida (AppliChem) e tetrametiletilendiamina (TEMED) (0,01% v/v). De seguida, o pH da solução foi ajustado para 7,5 por adição de ácido clorídrico (HCl) (2 N) e a solução foi desgaseificada (utilizando um sistema a vácuo) durante 30 minutos. Terminada a desgaseificação, adicionou-se ao falcon contendo acrilamida, bisacrilamida e TEMED, 22% (v/v) de uma solução previamente preparada de N-hidroxisuccinimida- NHS (Santa Cruz Biotechnology) diluída em tolueno (20 mg /mL) (que é incorporada na solução acrilamida para reticular a proteína da MEC ao hidrogel) e 0,03% (v/v) de peroxidissulfato de amónio (APS) (catalisador da reação). Após a mistura cuidadosa, de forma a evitar a formação de bolhas de ar, a solução foi pipetada para um sistema de eletroforese previamente montado, composto por espaçadores de 1 mm (Mini-protean III, Bio-Rad). Para a montagem do sistema de polimerização, o espaçador e o vidro externo foram previamente siliconizados em 5% (v/v) de diclorodimetilsilano (DCDMS) diluído em tolueno (para evitar a aderência dos hidrogéis às superfícies), por 5 minutos. As lamelas

reativas foram, seguidamente, colocadas sobre o vidro que contém o espaçador tratado (com o auxílio de pequenas gotas de água entre as duas superfícies de vidro). Após o sistema montado e a solução pipetada, os géis foram deixados por 30 minutos a polimerizar à temperatura ambiente. Em seguida, os hidrogéis ligados covalentemente às lamelas de vidro, foram removidos do sistema com o auxílio de uma lâmina e colocados em placas de Petri, onde foram sujeitos a três lavagens de 5 minutos em tampão fosfato salino (PBS 1x) (pH 7,4), com suave agitação. Seguidamente, foram esterilizados sob luz UV por 30 minutos dentro da câmara de fluxo de ar de classe II, assim como todos os procedimentos de preparação dos hidrogéis de poliacrilamida, exceto os passos referentes ao tratamento do espaçador e vidro externo com DCDMS que foi realizado na *hotte*. Os géis de poliacrilamida foram funcionalizados por adição de 50 µl de solução da proteína desejada diluída em PBS 1x à concentração desejada, seguido por incubação a 4°C, durante a noite. Por fim, os géis de poliacrilamida foram lavados com PBS 1x e equilibrados em DMEM com baixa glicose durante 4h, a 37°C.

2.5 Tratamento de lamelas de vidro para posterior funcionalização com proteínas

As lamelas de vidro utilizadas no ensaio de adesão/proliferação celular, foram submetidas a um prévio tratamento químico, com a finalidade de permitir criar ligações covalentes com o revestimento proteico que se segue, fornecendo uma ligação estável entre o substrato e a proteína. Primeiramente, as lamelas de vidro (12 mm) foram colocadas numa solução de hidróxido de sódio (NaOH) (Merck) a 1M por 30 minutos sob agitação, de forma a criar grupos silanol na superfície do vidro. Seguidamente, foram transferidas para uma solução a 10% (v/v) de (3-aminopropil)trimetoxissilano (APTMS) diluído em etanol a 96% (v/v) onde permaneceram sob agitação por 30 minutos, permitindo gerar lamelas de vidro “reativas”. Seguiu-se um conjunto de seis lavagens com H₂O mQ e, posteriormente, as lamelas foram colocadas numa solução a 3% (v/v) de glutaraldeído diluído em PBS 1x por 20 minutos sob agitação. Seguiu-se um conjunto de três lavagens com H₂O mQ e, por fim, foram colocadas em placas de Petri a esterilizar em calor seco (no interior da câmara de fluxo laminar de cultura de tecidos). De seguida, foram

funcionalizadas com as proteínas de interesse. O procedimento da funcionalização das lamelas encontra-se descrito na secção 2.6.

2.6 Revestimento e funcionalização de lamelas de vidro e géis de poliacrilamida com proteínas da MEC

De forma a revestir as placas de cultura utilizadas na cultura e expansão de células (55 cm²), a solução de PDL (peso molecular \geq 300 000) diluída em PBS 1x (100 ug/mL) foi colocada a revestir o fundo da placa (cerca de 5 mL) e incubada a 37°C durante a noite. De forma a revestir as lamelas de vidro usadas para proliferação celular e géis de poliacrilamida usados para diferenciação celular, foram utilizadas as proteínas recombinantes LM-211, LM-411 e LM-521 provenientes da BioLamina, a FN (isolada do plasma humano), a MN (isolada da placenta humana) e a PDL, provenientes da Roche, Chemicon (Millipore) e Sigma-Aldrich, respetivamente.

As proteínas recombinantes humanas LM-211, LM-411 e LM-521, provenientes da BioLamina AB, são proteínas definidas e livres de componentes animais. A sua aparência é de uma solução tamponada límpida e incolor, com pH de 7,2 com 10% de glicerol e 0,02% de NaN₃ (azida de sódio) e a sua concentração de 0,1mg/mL. Para o devido revestimento, as proteínas foram diluídas em PBS 1x na concentração desejada (5, 10, 15 e/ou 25 ug/mL) e a mistura das mesmas proteínas com PDL foi feita de 1:1 (5, 10, 15 e 25 ug/mL de LM-211, Lm 411, LM-521, FN e MN, com 5, 10, 15 e/ou 25 ug/mL de PDL). 50 μ L da solução correspondente foi pipetada para cada poço e colocada a incubar a 37°C durante a noite.

2.7 Sedimentação de células em meio de proliferação e diferenciação

Para o ensaio de proliferação, as células foram plaqueadas a uma densidade de 15000 células/cm² sobre lamelas redondas (12 mm de diâmetro) de vidro (previamente tratadas e revestidas com as proteínas de interesse) dispostas em placas de 24 poços e mantidas em cultura durante 2 dias em meio de proliferação. Para o ensaio de diferenciação, as células foram plaqueadas a uma densidade de 50000 células/cm² sobre hidrogéis de poliacrilamida (previamente revestidos com

as proteínas de interesse) dispostas em placas de 12 poços. 30 minutos após a adesão celular, o meio de recuperação foi substituído por meio de diferenciação (DMEM com alto teor de glucose, apo-transferrina (5 µg/mL), biotina (10 ng/mL), selênio (5 ng/mL), insulina (5 µg/mL), progesterona (6,3 ng/mL), putrescina (16 µg/mL), triiodotironina (T3) (30 ng/mL), tiroxina (T4) (40 ng/mL) e FBS a 5% (v/v)) e as células permaneceram em meio de diferenciação durante 5 dias, com mudança total do meio ao fim de 2 dias.

Para o ensaio de bloqueio de subunidades de integrina, as células previamente expandidas, foram plaqueadas a uma densidade de 50000 células/cm² sobre hidrogéis de poliacrilamida (previamente revestidos com LM-521+PDL (15 µg/mL)) dispostos em placas de 24 poços. 30 minutos após a adesão celular, seguiu-se a substituição do meio de recuperação por meio de diferenciação contendo os anticorpos de bloqueio anti-β1- CD29 (10 µg/mL) e anti-β3- CD61 (10 µg/mL) e o controlo isotópico (10 µg/mL), da Biolegend. Ao fim de 2 dias, o meio foi substituído por novo meio contendo os anticorpos diluídos e ao quinto dia de diferenciação procedeu-se à fixação das células e imunocitoquímica (2.8).

2.8 Imunocitoquímica

O meio foi removido e as células foram lavadas com solução de Pucks. Seguidamente, as células foram fixadas por 25 minutos à temperatura ambiente em solução de fixação - 4% (v/v) de paraformaldeído (PFA). Seguiu-se uma série de três lavagens com PBS 1x. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com uma solução de PBS-Triton 0,3% (v/v) durante 20 minutos, seguidas de duas lavagens de 5 minutos com PBS 1x e uma lavagem de 5 minutos com PBS-Tween 0,1% (v/v). Posteriormente, as células foram bloqueadas com 1% (v/v) albumina sérica bovina (BSA) em PBS 1x durante 30 minutos. O anticorpo primário (Tabela 6) foi utilizado na diluição recomendada pelo fabricante e diluído em solução de bloqueio. O volume colocado em contacto com as células foi de 25 µL para as lamelas de vidro e 50 µL para os géis de poliacrilamida. Para evitar a evaporação, as lamelas de vidro e/ou géis de poliacrilamida foram colocados sob parafilme em recipientes com papel

molhado (atmosfera húmida) hermeticamente fechado. As células foram deixadas durante a noite a 4°C em contacto com o anticorpo primário.

Tabela 6| Informações relativas ao anticorpo primário e respetiva diluição.

Anticorpo	Empresa	Breve descrição	Espécie	Diluição utilizada
α -MBP	Abcam ab7349	Marcador de OLs maduros	rato	1:200

Após duas lavagens de 5 minutos com PBS 1x e uma com PBS-Tween 0,1% (v/v), as células foram colocadas durante 1h em contacto com o anticorpo secundário (Tabela 7), diluído em solução de bloqueio.

Tabela 7| Informações relativas ao anticorpo secundário e respetiva diluição.

Anticorpo	Empresa	Espécie	Diluição utilizada
α -rat Alexa 568	Molecular Probes - Invitrogen A11077	caprino	1:200

Para a devida marcação dos núcleos, as células foram colocadas em contacto com DAPI (200 ng/mL) por 5 minutos, à temperatura ambiente.

A microscopia de fluorescência foi realizada usando o *software* AxioVision Release 4.8 (Zeiss) para aquisição de imagens. O tempo de exposição foi o mesmo para cada marcador analisado e para cada experiência independente.

2.9 Contagem do número de células e quantificação do sinal

A contagem do número de células, assim como a quantificação do sinal de MBP foram realizadas com auxílio do *software* Image J. Para quantificar o estado de diferenciação de OLs entre as condições experimentais, a fluorescência total corrigida (CTCF) por célula usando um anticorpo que reconhece o marcador de diferenciação, MBP, foi calculada. A CTCF de MBP reflete o estado de diferenciação de OLs, tendo em conta (i) a área de coloração do marcador de diferenciação, correlacionando com o estado de diferenciação morfológica, e (ii) o valor médio da intensidade de fluorescência (MFI), que espelha o nível de expressão da proteína marcada por célula.

2.10 Análise estatística

A análise foi feita usando o software GraphPad Prism 7. Os valores representam média \pm SEM de, pelo menos, três experimentos independentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ para diferenças estatisticamente significativas).

CAPÍTULO III

Resultados

3 Resultados

3.1 Efeito de diferentes proteínas de matriz extracelular na adesão de células CG4

De forma a explorar se proteínas específicas da MEC suportam a adesão e proliferação *in vitro* de uma linha celular de OPCs (células CG4 não diferenciadas), investigámos o potencial papel de adesão das células CG4 a lamelas de vidro funcionalizadas com as proteínas de interesse. Primeiramente, a população de OPCs foi expandida em TCPs, previamente revestidas com PDL. Atingida a sub-confluência, as células foram plaqueadas à densidade de 15000 células/cm² em lamelas de vidro revestidas com as diferentes proteínas: as proteínas recombinantes LM-211, LM-411 e LM-521 (todas a 10 µg/mL), as proteínas humanas purificadas MN ou FN (ambas a 10 µg/mL), a mistura de cada uma das anteriores com PDL (10/10 µg/mL) e PDL (10 µg/mL) como controlo. A adesão celular foi avaliada após 2 dias em meio de proliferação através da marcação dos núcleos com DAPI e contagem dos mesmos com o *software* Image J.

Os resultados referentes à proliferação celular (Figura 15) demonstraram que, do ponto de vista estatístico, substratos funcionalizados com LM-521 (p <0,05), MN+PDL (p <0,05), FN+PDL (p <0,01) e FN (p <0,05) proporcionaram às células boa capacidade de aderir e proliferar. Também substratos funcionalizados com PDL e LM-521+PDL demonstraram fornecer essa capacidade, no entanto, não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, substratos revestidos pelas proteínas LM-211 (p <0,001), LM-411, LM-411+PDL e MN não forneceram essa capacidade.

Os resultados sugerem ainda, que o efeito proliferativo observado em substratos funcionalizados com a combinação de proteínas LM-211+PDL, parece ter a ver com a presença de PDL e não de LM-211, dado que esta última, quando utilizada isoladamente, não forneceu às células a capacidade de aderir e quando utilizada em combinação com PDL demonstrou exibir um comportamento semelhante a esta, em termos de número final de células aderentes. Adicionalmente, observou-se uma tendência para que a MN, comumente denominada por LM-211, funcione melhor em termos de adesão celular que a proteína recombinante LM-211.

Em conjunto, os nossos dados referentes à adesão das células CG4 em condições *standard* demonstraram que as várias proteínas testadas têm diferentes efeitos no processo de adesão celular, indicando que são funcionalmente distintas. De todo o conjunto de proteínas testadas, a PDL, a LM-211+PDL, a LM-521+PDL, a LM-521, a MN+PDL, a FN+PDL e a FN demonstram fornecer às células boa capacidade de aderir e proliferar. Das três isoformas de lamininas recombinantes testadas, a LM-521 demonstrou fornecer muito boa capacidade de aderência às células, mesmo na ausência de PDL, a qual suscitou de imediato o nosso interesse.

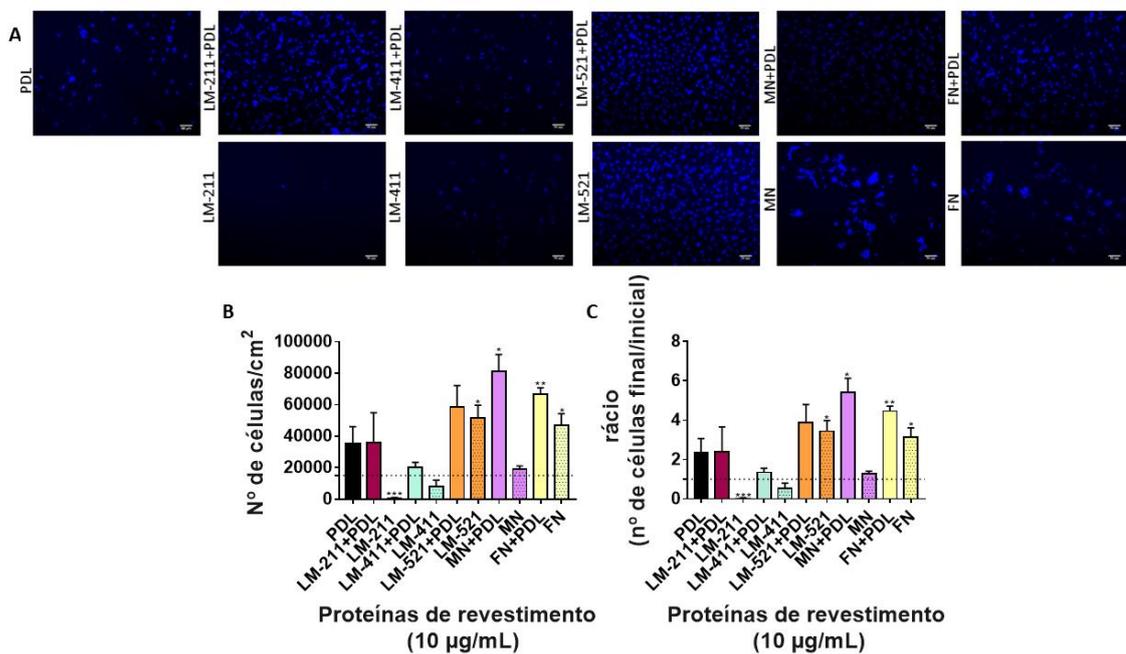


Figura 15| Representação ilustrativa e gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na aderência de células CG4. (A) Imagens representativas que evidenciam a adesão e/ou proliferação celular obtidas para cada proteína e combinação de proteínas, após 2 dias em meio de proliferação. A barra corresponde a 50µm; (B) Quantificação do número total de células/cm² ao fim de 2 dias de proliferação; (C) Quantificação referente ao rácio do número de células final/inicial. As células foram cultivadas e mantidas durante 2 dias em meio de proliferação em lamelas de vidro funcionalizadas com as diferentes proteínas: LM-211, LM-411, LM-521, MN ou FN (todas a 10 µg/mL), substratos mistos de LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, MN+PDL ou FN+PDL (todas a 10/10 µg/mL), ou PDL (controlo). Após 2 dias de proliferação, as células foram fixadas e procedeu-se à marcação dos núcleos com DAPI (azul), aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados referentes à quantificação são representados por: (B) Média ± erro padrão do número total de células/cm² ao fim dos 2 dias (*n*=3). A linha preta a tracejado representa o número de células inicial em cada condição (15000/cm²); (C) Média ± erro padrão do rácio do número de células final/número de células inicial (*n*=3). A linha preta a tracejado representa o rácio em que o número de células final é igual ao número de células inicial (rácio=1). Significância estatística comparando com (B) a densidade inicial de sedimentação (15000/cm²) ou (C) rácio = 1 por One Sample t test (***p* < 0,001 ** *p* < 0,01 e * *p* < 0,05).

3.2 Efeito de diferentes proteínas de matriz extracelular na diferenciação de células

CG4

Com vista à otimização da plataforma de diferenciação de OPCs estabelecida por Lourenço et al., 2016, procurámos explorar se a utilização de lamininas recombinantes (LM-211, LM-411 e LM-521) suporta a diferenciação *in vitro* da linha celular CG-4. Com o objetivo de investigar o efeito dos diferentes substratos na diferenciação de células CG4, a população de OPCs foi previamente expandida em TCPs, revestidas com PDL. Atingida a sub-confluência, as células foram plaqueadas a 50000 células/cm² em géis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com as diferentes proteínas de interesse: as proteínas recombinantes LM-211, LM-411 e LM-521 (todas a 25 µg/mL), as proteínas humanas isoladas e purificadas MN ou FN (ambas a 25 µg/mL), a mistura das anteriores com PDL (25/25 µg/mL), e PDL (25 µg/mL) como controlo. A diferenciação celular foi avaliada após 5 dias em meio de diferenciação com recurso à imunocitoquímica com o marcador MBP, marcação dos núcleos com DAPI e contagem e quantificação com recurso ao *software* Image J.

Os resultados referentes à diferenciação de OLs em diferentes proteínas da MEC encontram-se ilustrados nas Figuras 16 e 17 e Figura suplementar 1. Substratos funcionalizados com as proteínas LM-211 ($p < 0,001$), MN ($p < 0,05$) e FN ($p < 0,05$) apresentaram diferenças estatísticas significativas no número de células/cm² ao final de 5 dias de diferenciação (Figura 16 C), exibindo números de células aderentes bastante inferiores ao número inicialmente plaqueado. Logo após 30 minutos em cultura, verificou-se probreza na aderência das células às proteínas LM-211 e MN (Figura 16 A) e, desta forma, ao final de 5 dias de diferenciação, o número de células/cm² existente em substratos funcionalizados com estas proteínas foi praticamente nulo, com uma diminuição abrupta do número de células final em relação ao número de células plaqueado. Consequentemente, estes substratos demonstraram baixo número de células MBP+/cm² e percentagem de MBP+ (Figura 16 D e Figura suplementar 1, respetivamente). Ainda que substratos funcionalizados com FN permitissem alguma aderência celular (Figura 16 A), demonstraram uma tendência para a diminuição do número de células aderentes

até ao quinto dia de diferenciação (Figura 16 C) e, conseqüentemente, baixo número de células MBP+ (Figura 16 D) e percentagem de células MBP+ (Figura suplementar 1). Todas as outras proteínas demonstraram uma tendência para manter o número de células mais ou menos constante ao longo da diferenciação e elevado número de células MBP+/cm², com exceção da LM-411. Apesar de na ausência de PDL demonstrar uma tendência para a obtenção de elevado número de células aderentes (Figura 16 C), esta proteína não demonstrou fornecer estímulos à diferenciação celular, apresentando baixo número de células diferenciadas ao fim dos 5 dias de diferenciação (Figura 16 D). Já em combinação com PDL, esta proteína demonstrou funcionar bem em termos de diferenciação, com uma tendência para a obtenção de elevado número de células/cm² (Figura 16 C), bem como elevado número de células MBP+ (Figura 16 D).

Em conjunto, estes resultados demonstraram que as proteínas LM-211, MN e FN, quando utilizadas isoladamente, não parecem ser adequadas à diferenciação de OLs, dado que permitem baixa aderência das células e, por sua vez, baixa diferenciação celular. Apesar de a LM-411 funcionar bem isoladamente em termos de adesão celular, não demonstrou fornecer estímulos às células para diferenciar e, portanto, também não parece ser adequada à diferenciação celular. Por outro lado, substratos revestidos pelas proteínas LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, LM-521, MN+PDL e FN+PDL parecem ser adequados à diferenciação das células CG4, sendo que a LM-521 foi a única que demonstrou ter a capacidade de providenciar adesão e estímulo para diferenciação assinaláveis na ausência de PDL.

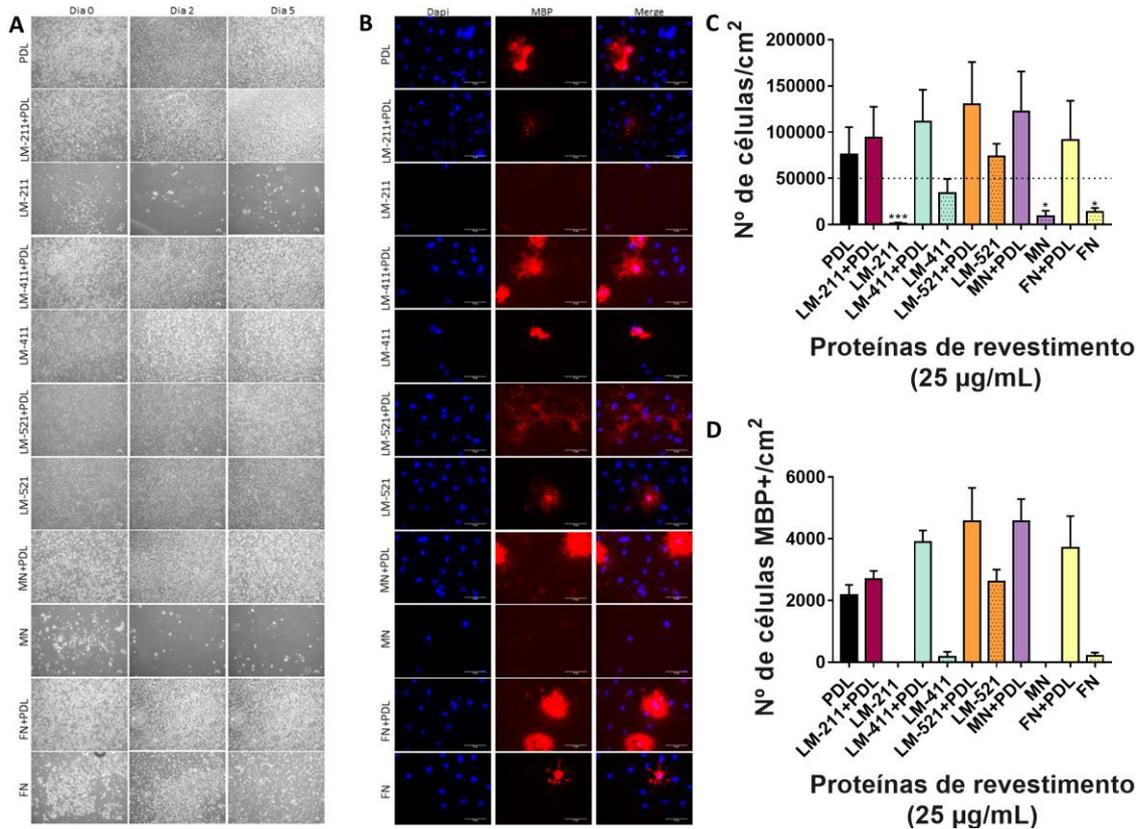


Figura 16 | Representação ilustrativa e gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na diferenciação de células CG4. (A) Imagens de microscopia de contraste de fase representativas de células em cultura ao final de 0 (30 minutos após o sedimentação), 2 (48 horas após o sedimentação) e 5 (120 horas após o sedimentação) dias de diferenciação; (B) Imagens de microscopia de fluorescência representativas de células após 5 dias de diferenciação; (C) Quantificação do número de células/cm² ao fim de 5 dias de diferenciação. (D) Quantificação do número de células MBP+/cm² ao fim de 5 dias de diferenciação. As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com as diferentes proteínas: LM-211, LM-411, LM-521, MN ou FN (todas a 25 µg/mL), substratos mistos de LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, MN+PDL ou FN+PDL (todas a 25/25 µg/mL), ou PDL como controle. Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados referentes à quantificação são representados por: (C) Média ± erro padrão do número de células/cm² ao fim de 5 dias (n=3). A linha preta a tracejado representa o número de células inicial em cada condição (50000/cm²); (D) Média ± erro padrão do número de células MBP+/cm² ao fim de 5 dias (n=3). Significância estatística para C comparando com a densidade inicial de sedimentação (50000/cm²) por One Sample t test (***) p <0,001 e * p <0,05). Significância estatística para D comparando com o controle (PDL) por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test.

A avaliação da MFI e CTCF de MBP expresso por células mantidas em substratos revestidos com as diferentes proteínas demonstrou uma tendência para que todas apresentem médias de intensidade de fluorescência e valores de fluorescência total semelhantes entre si (Figura 17), sem diferenças significativas em relação ao controle (PDL).

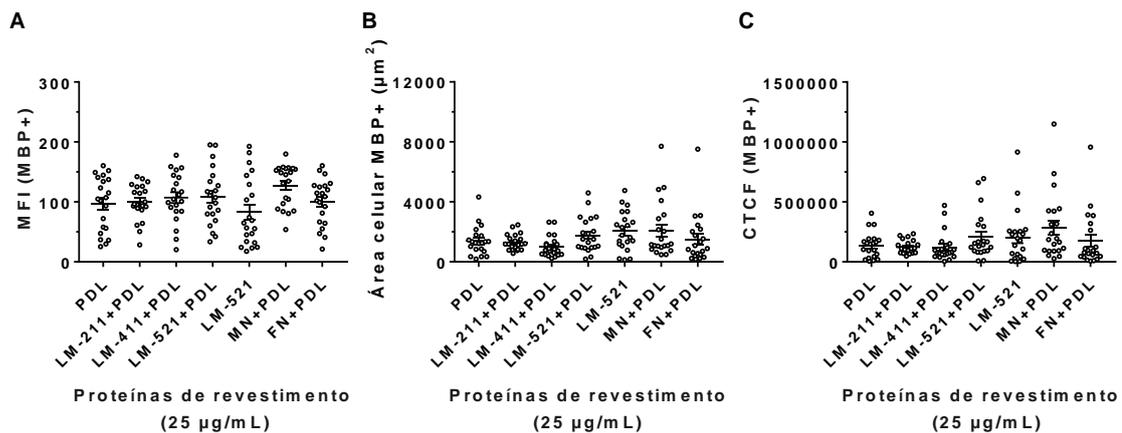


Figura 17 | Representação gráfica da intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP. (A) Quantificação da MFI por célula; (B) Quantificação da área celular MBP+ por célula; (C) Quantificação da CTCF por célula. As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com as diferentes proteínas: LM-211, LM-411, LM-521, MN ou FN (todas a 25 µg/mL), substratos mistos de LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, MN+PDL ou FN+PDL (todas a 25/25 µg/mL), ou PDL como controlo. Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Para cada n foram selecionadas 7 células e os resultados são representados por: (A) MFI \pm erro padrão por célula ao fim dos 5 dias ($n=3$); (B) Área celular MBP+ \pm erro padrão por célula ao fim dos 5 dias ($n=3$); (C) CTCF \pm erro padrão por célula ao fim dos 5 dias ($n=3$). Significância estatística comparando com o controlo (PDL) por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test.

Tendo em conta os resultados obtidos, globalmente, as proteínas que demonstraram favorecer a diferenciação foram PDL, LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, LM-521, MN+PDL e FN+PDL. No entanto, de forma a prosseguir o estudo com vista à otimização das condições (concentração inicial de proteína e densidade inicial de sedimentação de células) e dado o elevado número de condições de análise, descartámos as proteínas que demonstraram não ser adequadas ao processo de diferenciação das células CG4 e, de entre as proteínas que demonstraram favorecer a diferenciação celular, seleccionámos a LM-521 (na presença e ausência de PLD) por ser uma proteína que aparenta favorecer a diferenciação, mesmo quando utilizada na ausência de PDL, e a MN (na presença de PLD) por ser a proteína *standard* utilizada na atual plataforma estabelecida por Lourenço et al., 2016. A este conjunto de proteínas, adicionámos a LM-211 (na presença de PDL) por estar descrita como sendo a proteína proeminente no efeito da MN em OLS, e PDL como controlo.

3.2.1 Otimização das condições (concentração de proteína e densidade celular)

De forma a otimizar as condições de diferenciação, procurámos perceber qual a concentração de proteína, bem como qual a densidade inicial de palqueio celular ótima com vista à obtenção do maior número de células diferenciadas (MBP+).

Procedemos ao ensaio de diferenciação celular utilizando diferentes concentrações (5, 10 e 15 µg/mL) das proteínas de interesse (PDL, LM-211+PDL, LM-521+PDL, LM-521 e MN) e comparação com os resultados obtidos na concentração de 25 µg/mL, anteriormente utilizada.

Os resultados referentes ao ensaio de otimização da concentração de proteína encontram-se ilustrados nas Figuras 18 e 19 e Figura suplementar 2. Os resultados demonstraram uma tendência para a obtenção de maior número de células/cm² (Figura 18) com a utilização de concentrações mais baixas de proteína em relação ao controlo (25 µg/mL). A concentração de 15 µg/mL demonstrou favorecer a obtenção de maior número de células/cm², com diferenças estatísticas em relação ao controlo observadas para as proteínas PDL ($p < 0,05$), LM-521+PDL ($p < 0,05$) e LM-521 ($p < 0,05$). Para concentrações inferiores a 25 µg/mL, observou-se ainda uma tendência para a ocorrência de elevada taxa de proliferação celular numa fase inicial, com a obtenção de números de células finais bastante superiores ao inicialmente plaqueado.

Observando todas as diferentes proteínas (Figura 18), verificámos uma tendência para a obtenção de maior número de células aderentes e células MBP+/cm² em substratos funcionalizados com LM-521+PDL. Para este substrato, a concentração de 15 µg/mL permitiu obter maior número de células aderentes/cm², com diferenças significativas relativamente à concentração controlo ($p < 0,05$) e, da mesma forma, esta concentração e a de 5 µg/mL demonstraram uma ligeira tendência para a obtenção de maior número de células MBP+/cm².

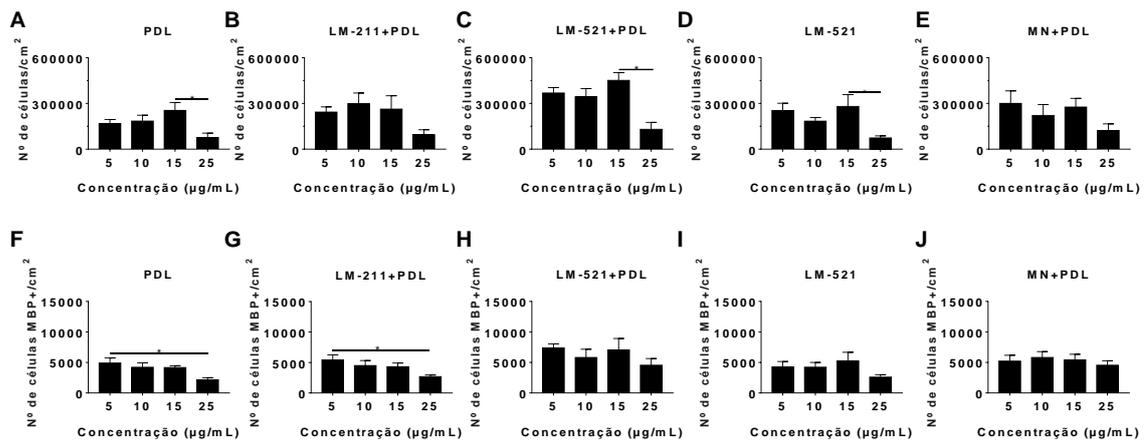


Figura 18| Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC, em diferentes concentrações, no número de células/cm² e número de células MBP+/cm². Quantificação do número de células/cm² em substratos de: (A) PDL; (B) LM-211+PDL; (C) LM-521+PDL; (D) LM-521; (E) MN+PDL. Quantificação do número de células MBP+/cm² em substratos de: (F) PDL; (G) LM-211+PDL; (H) LM-521+PDL; (I) LM-521; (J) MN+PDL. As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com as diferentes proteínas. As proteínas utilizadas isoladamente (LM-521 e PDL) foram adicionadas nas concentrações de 5, 10, 15 e 25 µg/mL e as proteínas utilizadas em substratos mistos contendo PDL (LM-211+PDL; LM-521+PDL; MN+PDL) foram adicionadas nas concentrações 5/5, 10/10, 15/15 e 25/25 µg/mL. Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados para A, B, C, D, e E são representados por média ± erro padrão do número de células/cm² ao fim de 5 dias (n=3). Os resultados para F, G, H, I e J são representados por média ± erro padrão do número de células MBP+/cm² ao fim de 5 dias (n=3). Significância estatística para A, B, D, E, G, I e J comparando com o controlo (25 µg/mL) por One-way ANOVA (* p <0,05). Significância estatística para C, F e H comparando com o controlo (25 µg/mL) por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test (* p <0,05).

A análise de MFI e CTCF relativo a expressão de MBP por células diferenciadas em substratos funcionalizados com as várias proteínas, utilizando diferentes concentrações, encontra-se ilustrada na Figura 19. Os resultados demonstraram uma tendência para a obtenção de valores mais elevados de CTCF para substratos funcionalizados pelas proteínas à concentração 25 µg/mL em relação às restantes concentrações, com a obtenção de diferenças estatísticas significativas para substratos funcionalizados com LM-211+PDL, LM-521+PDL e MN+PDL. Estes resultados podem ser explicados, em parte, pela tendência no aumento da área celular (MBP+) para células plaqueadas nos diferentes substratos revestidos a essa concentração, estatisticamente significativa em substratos funcionalizados com LM-211+PDL, LM-521+PDL, LM-521 e MN+PDL. Por sua vez, esse aumento de área poderá ser devido à diminuição da densidade celular, observada para substratos revestidos a essa mesma concentração (Figura 18).

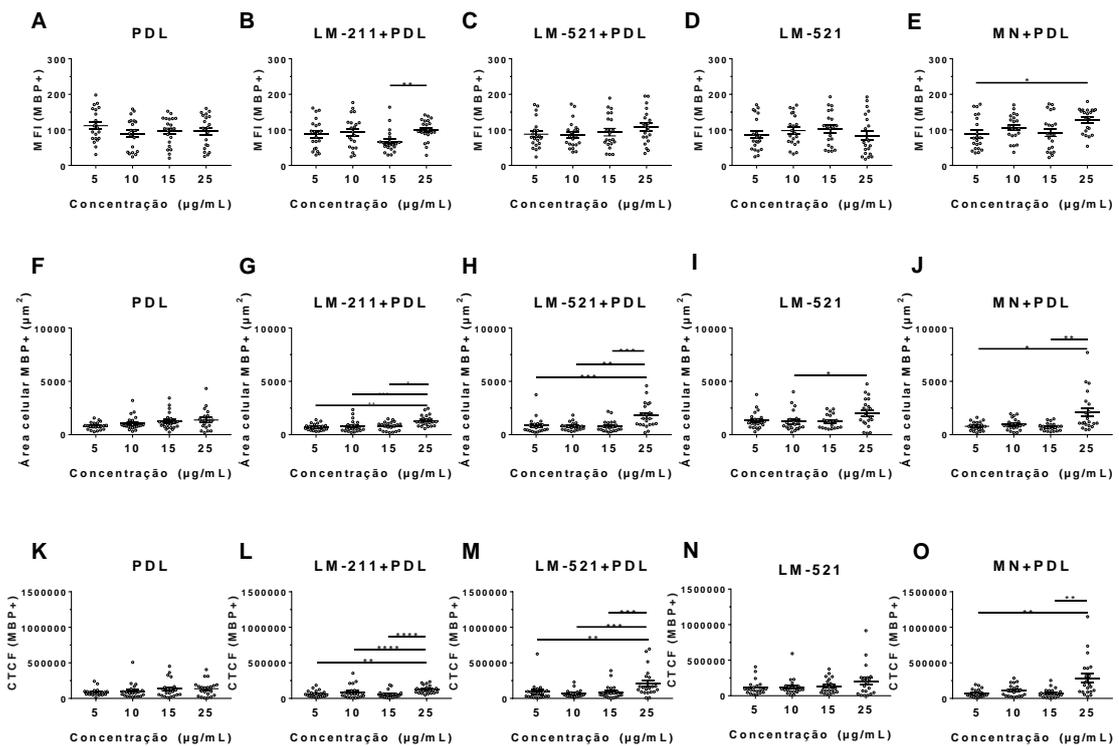


Figura 19| Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP. (A, B, C, D e E) Quantificação da MFI por célula para PDL, LM-211+PDL, LM-521+PDL, LM-521 e MN+PDL, respectivamente; (F, G, H, I, J) Quantificação da área celular MBP+ por célula para PDL, LM-211+PDL, LM-521+PDL, LM-521 e MN+PDL respectivamente; (K, L, M, N, O) Quantificação da CTCF por célula para PDL, LM-211+PDL, LM-521+PDL, LM-521 e MN+PDL, respectivamente. As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com as diferentes proteínas: LM-211, LM-411, LM-521, MN ou FN a (5, 10, 15 e 25 µg/mL), substratos mistos de LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, MN+PDL ou FN+PDL (5/5, 10/10, 15/15 e 25/25 µg/mL), ou PDL como controle. Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Para cada *n* foram selecionadas 7 células e os resultados são representados por: (A, B, C, D e E) MFI ± erro padrão da intensidade média de fluorescência de MBP por célula ao fim de 5 dias (*n*=3). (F, G, H, I e J) Área celular MBP+ ± erro padrão por célula ao fim de 5 dias (*n*=3); (K, L, M, N e O) CTCF ± erro padrão da intensidade média de fluorescência de MBP por célula ao fim dos 5 dias (*n*=3). Significância estatística para A, B e C comparando com o controle (25 µg/mL) por One-way ANOVA (** *p* < 0,01). Significância estatística para D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N e O comparando com o controle (25 µg/mL) por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test (**** *p* < 0,0001 *** *p* < 0,001 ** *p* < 0,01 e * *p* < 0,05).

Após identificarmos as concentrações de 5 e 15 µg/mL de LM-521+PDL como as condições que demonstraram uma tendência para favorecer a diferenciação celular, procedemos à otimização da densidade inicial de sedimentação. As células foram plaqueadas às densidades de 5000, 10000, 25000 e 50000 células/cm² às concentrações de 5 e 15 µg/mL de LM-521+PDL.

Os resultados referentes ao ensaio de otimização da concentração de proteína e densidade inicial celular encontram-se ilustrados nas Figuras 20 e 21 e Figura suplementar 3.

Os resultados demonstraram uma tendência para a obtenção de maior número de células aderentes/cm² em substratos onde as células foram plaqueadas à densidade mais alta (50000 células/cm²) em ambas as concentrações (Figura 20 B e C). Da mesma forma, em ambas as concentrações, esta foi a densidade permitiu a obtenção de maior número de células MBP+/cm² e percentagem de células MBP+ (Figuras 20 H e I e Figura suplementar 3). Para esta densidade, observou-se uma tendência para a obtenção de maior número de células/cm² utilizando a concentração de 15 µg/mL (Figura 20 G), no entanto, em termos de diferenciação, observou-se uma ligeira tendência para que a concentração de 5 µg/mL favoreça a obtenção de células que expressam o marcador MBP (Figura 20 L e Figura suplementar 3).

Em substratos em que as células foram plaqueadas à densidade mais baixa (5000 células/cm²), não foram observadas células MBP+ ao final dos 5 dias de diferenciação em ambas as concentrações de LM-521+PDL. À densidade de 10000 células/cm² também não se observaram células MBP+ para substratos funcionalizados com 5 µg/mL de proteína.

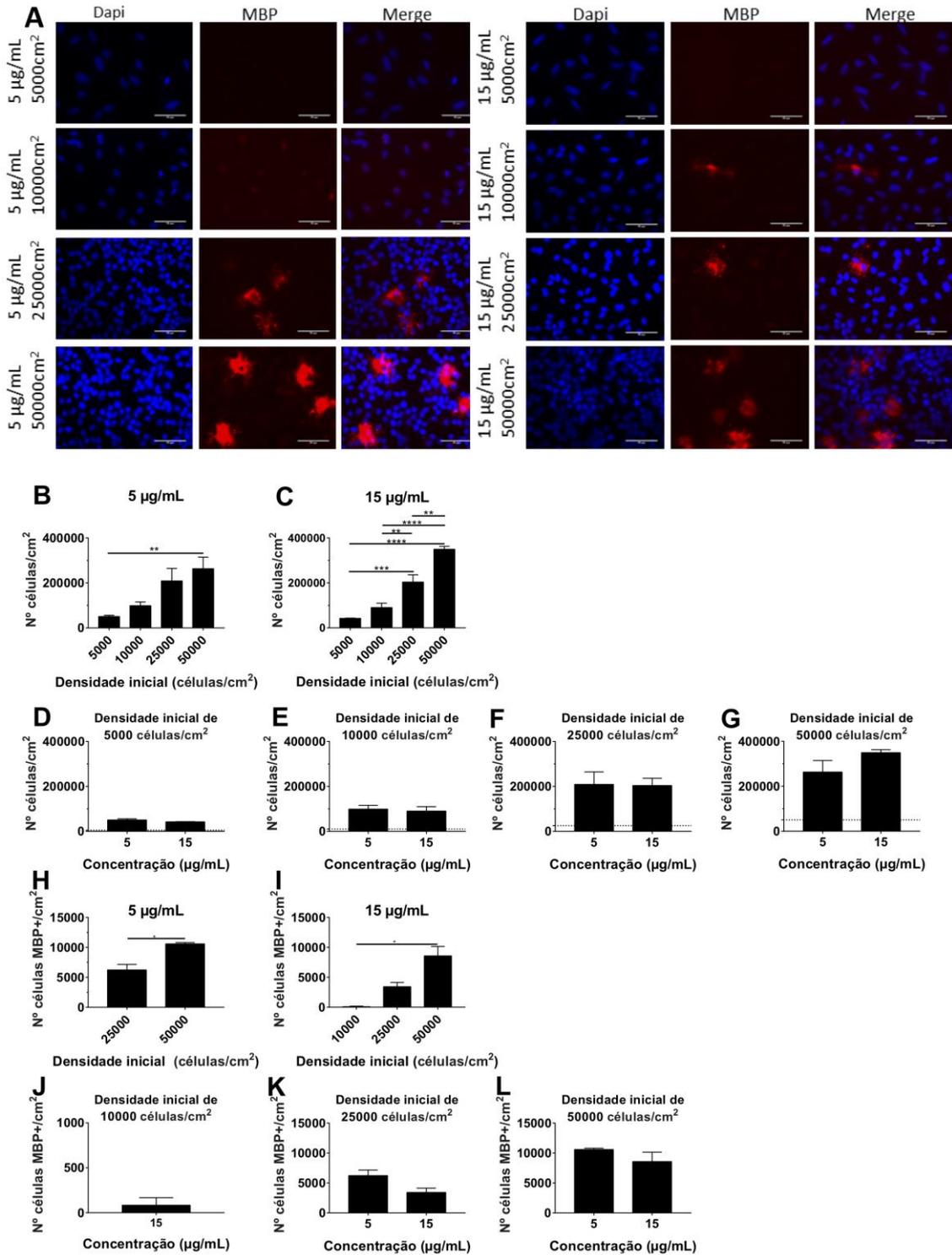


Figura 20| Representação ilustrativa e gráfica do efeito de diferentes densidades iniciais de sedimentação celular, em diferentes concentrações de LM-521+PDL no número de células/cm² e número de células MBP+/cm². (A) Imagens representativas da diferenciação celular obtida para as diferentes concentrações de proteína e para cada densidade inicial de sedimentação testada. A barra corresponde a 50µm. (B e C) Quantificação do número de células/cm² obtido em cada condição, em função concentração de proteína utilizada de LM-521+PDL: (B) 5/5 µg/mL e (C) 15/15 µg/mL. (D, E, F e G) Quantificação do número de células/cm² obtido em cada condição, em função da densidade inicial de sedimentação celular: (D) 5000/cm²; (E) 10000/cm²; (F) 25000/cm²; (G) 50000/cm². A linha a tracejado representa o número de células plaqueado. (H e I) Quantificação do número de células MBP+/cm² obtido em cada condição, em função concentração de

proteína utilizada de Lm-521+PDL: (H) 5/5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (I) 15/15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (J, K e L) Quantificação do número de células MBP+/ cm^2 obtido em cada condição, em função da densidade inicial de sedimentação celular: (J) 10000/ cm^2 ; (K) 25000/ cm^2 ; (L) 50000/ cm^2 . As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poli(acrilamida) (6,5 kPa) funcionalizados com substratos mistos LM-521+PDL às concentrações de (5/5 e 15/15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados para B, C, D, E, F e G são representados por média \pm erro padrão do número de células/ cm^2 ao fim de 5 dias ($n=3$). Os resultados para H, I, J, K e L são representados por média \pm erro padrão do número de células MBP+/ cm^2 ao fim de 5 dias ($n=3$). Significância estatística para B e I por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test (* $p < 0,05$). Significância estatística para C por One-way ANOVA (**** $p < 0,0001$ *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$). Significância estatística para D por Mann Whitney test. Significância estatística para E, F, G, H, K e L por Unpaired t test.

A análise de MFI e CTCF relativo à expressão de MBP por células diferenciadas em substratos funcionalizados com LM-521+PDL, em ambas as concentrações, encontra-se ilustrada na Figura 21.

Para substratos plaqueados com a densidade celular mais elevada (50000 células/ cm^2), observaram-se diferenças estatísticas significativas na MFI, com a obtenção de valores de fluorescência mais elevados para concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em comparação com a concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 21 C). Não se observaram diferenças estatísticas significativas quer na MFI, área ou CTCF entre ambas as concentrações para as restantes densidades de sedimentação, onde se observou uma tendência para a obtenção de médias de valores de MFI, área e CTCF semelhantes entre si. Desta forma, elegemos a concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LM-521+PDL e a densidade inicial de 50000 células/ cm^2 como as condições ótimas, com vista à obtenção de maior diferenciação celular.

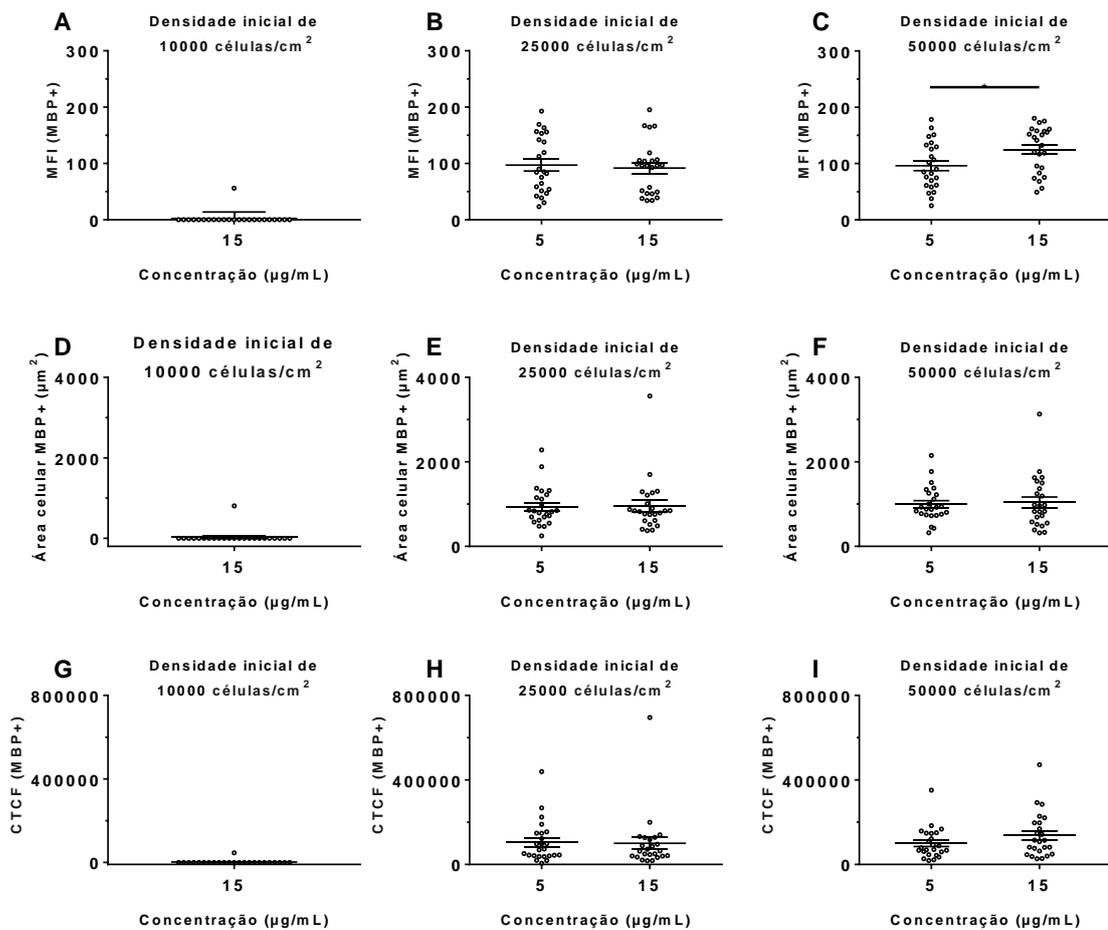


Figura 21 | Representação gráfica do efeito das diferentes densidades iniciais de sedimentação celular, em diferentes concentrações de LM-521+PDL, na intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP. (A) Quantificação da MFI por célula para a densidade inicial de 10000/cm²; (B) Quantificação da MFI por célula para a densidade inicial de 25000/cm²; (C) Quantificação da MFI por célula para a densidade inicial de 50000/cm²; (D) Quantificação da área celular MBP+ por célula para a densidade inicial de 10000/cm²; (E) Quantificação da área celular MBP+ por célula para a densidade inicial de 25000/cm²; (F) Quantificação da área celular MBP+ por célula para a densidade inicial de 50000/cm²; (G) Quantificação da CTCF por célula para a densidade inicial de 10000/cm²; (H) Quantificação da CTCF por célula para a densidade inicial de 25000/cm²; (I) Quantificação da CTCF por célula para a densidade inicial de 50000/cm². As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com substratos mistos LM-521+PDL às concentrações de (5/5 e 15/15 µg/mL). Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Para cada *n* foram selecionadas 8 células e os resultados são representados por: (A, B e C) MFI ± erro padrão da intensidade média de fluorescência de MBP por célula ao fim dos 5 dias (*n*=3); (D, E e F) Área celular MBP+ ± erro padrão por célula ao fim de 5 dias (*n*=3); (G, H e I) CTCF ± erro padrão da intensidade média de fluorescência de MBP por célula ao fim dos 5 dias (*n*=3). Significância estatística para A, B, D, E, F, G, H e I por Mann Whitney test. Significância estatística para C por Unpaired t test (* *p* < 0,05).

3.3 Efeito do bloqueio de integrinas na diferenciação de células CG4

De forma a avaliar o papel das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha6\beta1$ na diferenciação de culturas oligodendrocíticas na presença de LM-521 (amplamente descritas na literatura como importantes para a proliferação e diferenciação de OPCs, respetivamente, nomeadamente na presença de LM-211 (8)), procedemos a um ensaio de bloqueio através do tratamento com anticorpos monoclonais bloqueadores da função das subunidades $\beta1$ e $\beta3$ de integrina, CD29 e CD61 respetivamente. O anticorpo isotípico foi utilizado como tratamento contolo. Para tal, a população de OPCs foi previamente expandida em TCPs, previamente revestidas com PDL. Atingida a sub-confluência, as células foram plaqueadas à densidade de 50000 células/cm² sobre hidrogéis de poliacrilamida revestidos com LM-521+PDL (15/15 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os anticorpos de bloqueio foram adicionados à concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (6,182,245) no momento da adição do meio de diferenciação. O meio contendo os anticorpos de bloqueio foi substituído na totalidade ao fim de 2 dias. A diferenciação celular foi avaliada após 5 dias em meio de diferenciação com recurso à imunocitoquímica com o marcador MBP, marcação dos núcleos com DAPI e contagem e quantificação com recurso ao *software* Image J.

Os resultados referentes ao bloqueio das subunidades de interesse encontram-se ilustrados nas Figuras 22 e 23 e Figura suplementar 4. Os resultados demonstraram que os anticorpos bloqueadores da função das subunidades $\beta1$ e $\beta3$ integrina não afetaram significativamente o número de células/cm² (Figura 22 B), assim como, a população de células maduras (número de células MBP+/cm² e percentagem de células MBP) (Figura 22 C e Figura suplementar 4, respetivamente). No entanto, verificou-se uma tendência para a obtenção de menor número de células aderentes/cm², bem como, menor número de células MBP+/cm² e percentagem de células MBP+ em células tratadas com o anticorpo CD61 (anti- $\beta3$).

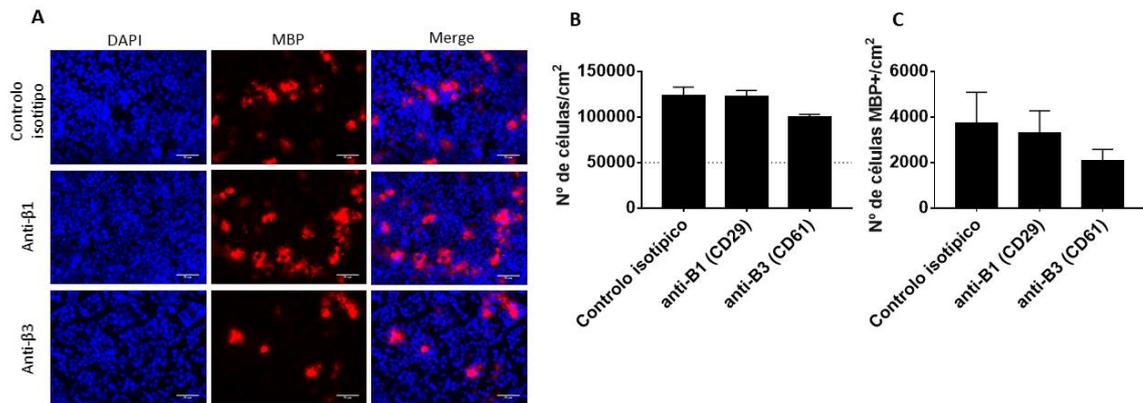


Figura 22| Representação ilustrativa e gráfica do efeito do bloqueio de subunidades de integrina no número de células/cm² e número de células MBP+/cm². (A) Imagens de microscopia de fluorescência representativas de células tratadas com os anticorpos de bloqueio monoclonais CD29 e CD61 e controlo isotípico, após 5 dias de diferenciação. A barra corresponde a 50µm; (B) Quantificação do número total de células/cm² ao fim de 5 dias de diferenciação. (C) Quantificação do número de células MBP+/cm² ao fim de 5 dias de diferenciação. As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com LM-521+PDL (15/15 µg/mL). Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados referentes à quantificação são representados por: (B) Média ± erro padrão do número total de células/cm² ao fim de 5 dias ($n=5$). A linha preta a tracejado representa o número de células inicial (50000/cm²); (C) Média ± erro padrão do número de células MBP+/cm² ao fim de 5 dias ($n=5$). Significância estatística comparando com o controlo isotípico por One-way ANOVA.

Células tratadas com o anticorpo CD61 (anti-β3) demonstraram uma tendência para a obtenção de níveis de intensidade de fluorescência de MBP mais elevados. A análise da MFI revelou a obtenção de diferenças estatísticas significativas em relação ao controlo isotípico ($p<0,05$) (Figura 23 A), enquanto que a análise da área celular e CTCF demonstrou apenas uma tendência de aumento (Figura 23 B e C). O aumento da área das células tratadas com este anticorpo pode ser explicado, em parte, pela tendência para a obtenção de menor densidade celular (Figura 22 B) que, por sua vez, permite um aumento na área celular que expressa o marcador MBP (Figura 23 B). Verificou-se ainda uma ligeira tendência para a obtenção de menor área das células tratadas com o anticorpo CD29 (anti-β1) em relação ao controlo isotípico.

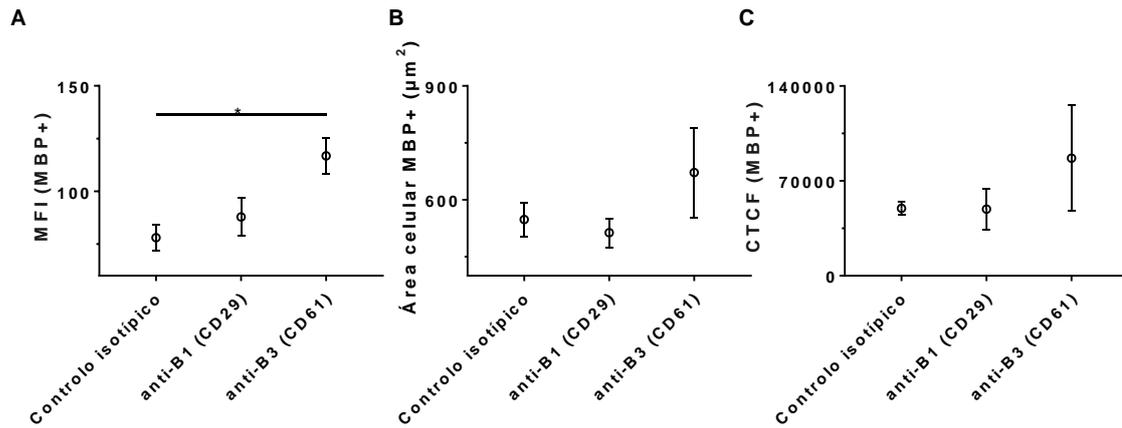


Figura 23| Representação gráfica do efeito do bloqueio de subunidades de integrina na intensidade média de fluorescência (MFI), área celular e fluorescência celular total corrigida (CTCF) para o marcador MBP. (A) Quantificação da MFI; (B) Quantificação da área celular MBP+; (C) Quantificação da CTCF. As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados/revestidos com LM-521+PDL (15/15 µg/mL). Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados são representados por: (A) Média ± erro padrão da MFI celular ($n=5$). (B) Média ± erro padrão da área celular MBP+ ($n=5$); (C) Média ± erro padrão da CTCF celular ($n=5$). Significância estatística comparando com o controlo isotópico por One-way ANOVA (* $p < 0,05$).

CAPÍTULO IV

Discussão

4 Discussão

Tal como referido anteriormente, uma vasta quantidade de estudos tem vindo a ser publicada sugerindo que as proteínas da MEC regulam vários aspetos da biologia de OLs (4). Evidências crescentes têm vindo a ser publicadas, sugerindo que as proteínas da MEC, como a fibronectina (FN) ou a vitronectina (VN) estão envolvidas na proliferação e manutenção de progenitores de OLs, enquanto que a laminina-2/merosina (LM-211/MN) promove a sua diferenciação em OLs maduros (5–10). No entanto, estas proteínas da membrana basal são frequentemente difíceis de obter na forma nativa em quantidades suficientes a partir de tecidos ou culturas de células, e podem apresentar contaminação com outras proteínas da MEC (242) e, desta forma, a produção recombinante tornou-se uma abordagem alternativa valiosa. Neste trabalho procurámos estudar três trómeros recombinantes de laminina (LM-211, LM-411 e LM-521), descritos na literatura como sendo expressos no SNC (como a LM-211 e LM-521) e/ou com funções essenciais no SNC (LM-211, LM-411 e LM-521), envolvidos na regulação de OLs (como a LM-211) ou por interagirem com integrinas essenciais na biologia de OLs, incluindo $\alpha 6\beta 1$ (como a LM-521) e $\alpha v\beta 3$ (como a LM-411).

Abordagens biológicas celulares tradicionais comumente utilizadas para estudar a função celular, incluindo de culturas oligodendrocíticas, envolvem o cultivo de células em substratos rígidos (incluindo lamelas de vidro) que não têm em conta o efeito da elasticidade da MEC ou a variação da rigidez da MEC nos diferentes tecidos. Com o objetivo de estudar a influência de isoformas de laminina biologicamente relevantes e o seu potencial na adesão e proliferação celulares sem ter em conta o efeito da elasticidade ou a variação da rigidez da MEC nos diferentes tecidos, procedemos a um ensaio de proliferação celular em condições *standard*. Das proteínas da MEC utilizadas neste ensaio, as proteínas PDL, LM-211+PDL, LM-521+PDL, LM-521, MN+PDL, FN+PDL e FN demonstraram fornecer às células a capacidade de aderir e proliferar. Era de esperar este desempenho da FN no suporte de células CG4 não diferenciadas, conforme sugerido por Lourenço et al., 2016. No entanto, surpreendemo-nos com o efeito da LM-521, uma vez que

demonstrou fornecer muito boa capacidade de aderência às células, mesmo na ausência de PDL, a qual suscitou de imediato o nosso interesse.

Em 2009 surgiu a hipótese de que as propriedades biofísicas do ambiente extracelular também desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento de OLs (237,238) e desde então, vários avanços foram feitos. Há um número crescente de relatos na literatura descrevendo o envolvimento de forças mecânicas e influência da mecanotransdução durante a diferenciação de distintos tipos celulares, com destaque para o desenvolvimento contínuo e o avanço nas abordagens materiais que têm permitido o desenvolvimento de substratos biomiméticos de rigidez ajustável (mimetizando os tecidos nativos), fornecendo novos dados e revelando detalhes cada vez mais inspiradores sobre o microambiente mecânico, especialmente a rigidez, que afeta profundamente o comprometimento celular. Várias plataformas diferentes têm vindo a ser desenvolvidas, de forma a permitir cultivar células *in vitro* em condições que mimetizam as condições padrão de cultura de células, usando não apenas fatores solúveis, mas também elementos da MEC e sinais mecânicos que mimetizam o microambiente bioquímico e biofísico das células. Uma das plataformas mais amplamente utilizadas baseia-se na utilização de hidrogéis deformáveis. Usando hidrogéis, é possível mimetizar a rigidez de distintos tecidos, incluindo do cérebro. Neste sentido, os hidrogéis de poliacrilamida apresentam uma série de vantagens, uma vez que a sua produção não requer a utilização de equipamentos especializados e possuem uma superfície química constante (246–248,248–250). Apresentam ainda a capacidade de modelar diferentes graus de rigidez, nomeadamente dentro da gama de rigidez descrita para o cérebro, o que pode ser obtido alterando a reticulação do hidrogel através da variação da percentagem de monómeros de acrilamida e/ou bisacrilamida.

Estudos anteriormente publicados demonstrando o efeito das propriedades biofísicas do meio extracelular sobre a diferenciação de OLs utilizaram PDL para promover a adesão celular (172) (que não é proteína constituinte da MEC mas sim um polipéptido sintético de lisina) e, portanto o papel das proteínas da MEC e o envolvimento das integrinas não foram abordados diretamente. Recentemente,

Lourenço et al., 2016 sugeriram que a diferenciação de OPCs é aumentada quando cultivada em substratos com rigidez semelhante aos tecidos cerebrais de ratos (~6,5 kPa) funcionalizada com LM-211/MN e, desde então, estudos baseados na modulação da diferenciação de OLs utilizando substratos que mimetizam a rigidez do tecido cerebral em combinação com proteínas da MEC, têm sido realizados com LM-211/MN e/ou PDL.

Desta forma, procurámos de seguida explorar se a utilização de lamininas recombinantes suporta a diferenciação *in vitro* da linha celular CG-4. Pela primeira vez, examinámos o papel dos três trímeros recombinantes de laminina constituintes da MEC e comparação com as proteínas comumente utilizadas na proliferação e diferenciação de CG4 (FN e LM-211/MN, respetivamente). Em conjunto, os resultados demonstraram que as proteínas LM-211, LM-411, MN e FN, quando utilizadas isoladamente, não são adequadas à diferenciação de OLs. Por outro lado, substratos revestidos pelas proteínas LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, LM-521, MN+PDL e FN+PDL promoveram a diferenciação de células CG4. De todo o conjunto de proteínas da MEC estudadas, a LM-521 foi a única que demonstrou ter a capacidade de providenciar adesão e estímulo para diferenciação assinaláveis na ausência de PDL.

Prosseguimos o estudo com vista à otimização das condições de cultura, de forma a determinar quais as condições que permitem obter maior eficiência no processo de diferenciação celular. Também neste ensaio a LM-521+PDL se destacou das restantes proteínas e, como resultado da otimização da concentração de revestimento e densidade inicial de sedimentação, elegemos a concentração de 15 µg/mL de LM-521+PDL e a densidade inicial de sedimentação de 50000 células/cm² como as condições ótimas à obtenção de maior diferenciação celular.

Globalmente, os nossos resultados sugerem que a utilização de substratos de poliacrilamida 6,5 kPa funcionalizados com LM-521+PDL (15/15 µg/mL) estabelecem uma plataforma de diferenciação mais eficiente do que a plataforma funcionalizada com MN+PDL (25/25 µg/mL). A utilização desta plataforma apresenta diversas vantagens em relação à plataforma estabelecida anteriormente,

pois além da utilização de uma proteína recombinante que não apresenta possibilidade de contaminação com outras proteínas, é também uma alternativa mais económica relativamente às atuais proteínas comumente utilizadas (isoladas de tecidos humanos e posteriormente purificadas), frequentemente difíceis de obter na forma nativa em quantidades suficientes a partir de tecidos ou cultura de células. Além disso, apresenta composição definida e demonstrou funcionar bem, mesmo quando utilizada isoladamente (sem a presença de PDL), não sendo por isso necessário recorrer à utilização de outros péptidos que promovam a adesão das células.

Adicionalmente, os resultados sugerem que a funcionalidade da LM-211 recombinante não coincide na totalidade com a da MN (comumente denominada por LM-211), sugerindo que a LM-211 não aparenta ser a proteína proeminente do efeito da MN, mas sim, qualquer outro componente com a qual é enriquecida. Estes resultados acentuam a ideia de que a MN é uma proteína cuja composição está mal definida e, portanto, reforçam a possibilidade de utilização da proteína recombinante LM-521 como alternativa de maior relevância.

Outro dos objetivos deste trabalho incidia no estudo do envolvimento de integrinas na diferenciação de culturas oligodendrocíticas. Como referido anteriormente, as integrinas funcionam como os principais recetores de adesão que conectam as células aos componentes da MEC e modulam diversas interações celulares, incluindo adesão e migração (251–254). Adicionalmente, a adesão mediada por integrina parece modular diversas cascatas de transdução de sinal e suportar a sobrevivência e proliferação celular e influenciar a expressão de genes relacionados com a diferenciação (255). Embora o mecanismo geral pelo qual a adesão mediada por integrinas participa nas respostas mecânicas celulares seja conhecido, os mecanismos moleculares por detrás dos distintos papéis de cada subtipo de integrina na regulação da rigidez, geração de força de tração, organização do citoesqueleto e adesão, sinalização celular e mecanotransdução permanecem ainda pouco compreendidos. Daí o nosso interesse no estudo do envolvimento de subunidades de integrina na diferenciação de OLs.

Tendo em conta o reportório de integrinas expresso por OLs e a disponibilidade de anticorpos de bloqueio para a cultura em questão, procurámos avaliar o papel das integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha6\beta1$ na diferenciação de culturas oligodendrocíticas na presença de LM-521 (amplamente descritas na literatura como importantes para a proliferação e diferenciação de OPCs, respetivamente, nomeadamente na presença de LM-211) (8). No entanto, apenas está descrita na literatura a capacidade de ligação da integrina $\alpha6\beta1$ à LM-521 (160). Não há evidências de que a integrina $\alpha\beta3$ tenha capacidade de ligação a esta proteína. Com vista ao estudo da função das subunidades $\beta1$ e $\beta3$ na cultura CG4, procedemos a um ensaio de diferenciação com a utilização de anticorpos monoclonais bloqueadores da função das subunidades de integrina $\beta1$ e $\beta3$ (CD29 e CD61 respetivamente).

A nossa hipótese de trabalho apontava para que o bloqueio da função da subunidade de integrina $\beta1$ pudesse resultar numa diminuição significativa da expressão do marcador MBP, tal como relatado anteriormente por Milner e Ffrench-Constant., 1994 (182). No entanto, os nossos ensaios, assim como reportado recentemente por Ly et al., 2018 (245), o anticorpo bloqueador de função da subunidade $\beta1$ integrina não afetou significativamente a população de células diferenciadas. Contudo, contrariamente ao observado por Ly et al., 2018, não verificámos uma diminuição significativa na área das células que expressam o marcador MBP em células tratadas com o anticorpo anti-CD29 (anti- $\beta1$). Estes resultados revelam uma discrepância comparativamente ao reportado anteriormente (245) que indicava que o bloqueio da subunidade $\beta1$ conduz à interrupção da formação de processos de OLs e a extensão da bainha de mielina. Desta forma, seria de esperar uma diferença mais acentuada caso a diferenciação de OPCs mediada por LM-521 ocorresse através da ligação à subunidade $\beta1$, conforme descrito em outros tipos celulares (256).

Apesar de estudos anteriores apontarem para um papel importante da subunidade $\beta1$ de integrina na regulação da sobrevivência e diferenciação de OLs (257,140,258) ou na mielinização dos tratos axonais do SNC (259), os nossos resultados não nos permitem tirar conclusões definitivas a cerca do papel desta subunidade na

regulação da diferenciação OLs, induzida por substratos revestidos por LM-521+PLD, na cultura em questão. Uma possível explicação para as diferenças verificadas poderá estar no facto de existirem outros recetores com papéis na diferenciação de OLs. Apesar de a integrina $\alpha 6\beta 1$ ser o único recetor da família expresso por OLs até agora conhecido como tendo capacidade de ligação à LM-521 (256), outro tipo de recetores de lamininas têm vindo a ser descritos com papéis importantes no desenvolvimento de OLs. O distroglicano é um recetor de laminina secundário, que poderá atuar de forma compensatória na ausência da subunidade $\beta 1$.

Uma outra explicação para a falta de efeito produzido pelo bloqueio da subunidade de integrina $\beta 1$ poderá estar no facto de o estudo ter sido realizado utilizando uma linha celular, uma vez que estas nem sempre replicam com precisão os processos biológicos tal como ocorrem em células primárias (260). A manipulação técnica da linha celular poderá conduzir a alterações do fenótipo e, conseqüentemente, a alterações nas suas funções nativas e respostas a determinados estímulos e a passagem sucessiva das linhas celulares poderá contribuir para essa alteração genética fenotípica e conduzir à heterogeneidade da cultura (260). Neste sentido, será relevante a realização de ensaios funcionais com recurso a culturas primárias de OLs para avaliar o envolvimento de subunidades de integrina.

Relativamente ao bloqueio da subunidade de integrina $\beta 3$ verificou-se uma tendência para a obtenção de menor número de células aderentes/cm², bem como, menor número de células MBP+/cm² e percentagem de células MBP+ em células tratadas com o anticorpo anti-CD61 (anti- $\beta 3$). Estes resultados sugerem que o bloqueio da subunidade $\beta 3$ pode ter afetado ligeiramente a proliferação, o que poderá ocorrer durante os primeiros dias de diferenciação. Curiosamente, verificámos um aumento significativo na intensidade de fluorescência de MBP e uma tendência para a obtenção de maior área celular (que poderá ser explicada pela obtenção de menor densidade celular nestas condições) que, conseqüentemente, resultou em níveis mais elevados de CTCF. Assim como estudos anteriores de superexpressão da integrina $\alpha v\beta 3$ que demonstraram um papel na

estimulação da proliferação e inibição da diferenciação de culturas oligodendrocíticas, o nosso estudo de bloqueio de função da subunidade $\beta 3$ apontaria para um papel desta subunidade na regulação da proliferação de células oligodendriais (182,261). No entanto, não há evidências de que a integrina $\alpha\beta 3$ tenha capacidade de ligação à LM-521, portanto, não é possível tirar conclusões definitivas a cerca do papel da subunidade $\beta 3$ na regulação da diferenciação OLs, induzida por substratos revestidos por LM-521+PLD.

CAPÍTULO V

Conclusão

5 Conclusão

Neste trabalho, identificámos uma matriz de cultura celular que, juntamente com substratos de poli(acrilamida) de rigidez 6,5 kPa permitiram aumentar a eficiência da diferenciação *in vitro* das células CG4. Os nossos resultados demonstram que a LM-521 ($\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 1$) suporta um desempenho superior ao das restantes proteínas, facilitando o processo de diferenciação *in vitro* de OLs. A utilização desta plataforma apresenta diversas vantagens em relação à plataforma estabelecida anteriormente, pois além das proteínas recombinantes serem uma alternativa mais económica relativamente às atuais proteínas comumente utilizadas (isoladas de tecidos humanos e posteriormente purificadas), apresentam ainda uma composição bem definida. Esta plataforma afirma-se assim como um método alternativo ao utilizado até à data no laboratório, facilitando a geração de OLs maduros.

Adicionalmente, neste trabalho, identificámos que a funcionalidade da LM-211 recombinante não coincide na totalidade com a da MN (comumente denominada por LM-211), sugerindo que a LM-211 poderá não ser a proteína proeminente do efeito da MN na diferenciação de OLs, mas sim outro componente que esteja presente (242). Estes resultados acentuam a ideia de que a MN é uma proteína cuja composição está mal definida e, portanto, reforçam a possibilidade de utilização da proteína recombinante LM-521 como uma alternativa com maior relevância em ensaios futuros de diferenciação de OLs.

Os resultados referentes ao bloqueio das subunidades de integrina não nos permitiram concluir a cerca do papel das subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$ na regulação da diferenciação de OLs induzida por substratos revestidos por LM-521+PLD utilizando linha celular CG4. Neste sentido, propomos o estudo do bloqueio de função das subunidades de integrina com recurso à utilização de culturas primárias.

CAPÍTULO VI

Perspetivas Futuras

6 Perspetivas Futuras

Neste trabalho a LM-521 demonstrou desempenhar um papel relevante na biologia de OLs, até agora desconhecido. Esta surge como a novidade deste trabalho, dado que até à data nenhum estudo abordou a sua utilização em OLs. No futuro, será importante elucidar a real importância da LM-521 na diferenciação de OLs.

Apesar do desempenho da LM-521 ser impressionante, poderá eventualmente ser melhorado em combinação com outras proteínas da MEC. Futuramente, será importante analisar a combinação de LM-521, LM-211 e/ou LM-411, ou com outras isoformas, e determinar se existem sinergias.

Dado a falta de efeito observado relativamente ao bloqueio das subunidades de integrina na diferenciação da linha celular CG4 na presença de LM-521, sugerimos a futura aplicação do estudo utilizando culturas primárias. Além da garantia de que estas células terão as suas funções celulares completamente funcionais, a sua utilização permitirá analisar a interação da LM-521 com outras subunidades de integrina além das utilizadas neste estudo, incluindo $\alpha 6$ e αv (que se ligam às subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$ para formar as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, respetivamente). Com a utilização da linha celular CG4 estávamos limitados à análise das subunidades $\beta 1$ e $\beta 3$, uma vez que no mercado apenas existiam os anticorpos de bloqueio contra estas subunidades compatíveis com a espécie anti-ratinho/rato da linha celular estudo. No futuro, a utilização de células primárias permitirá aumentar o leque de integrinas em estudo, uma vez que os anticorpos de bloqueio para estas subunidades estão disponíveis para a espécie ratinho.

Referências

1. Bignami A, Hosley M, Dahl D. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol (Berl)*. Novembro de 1993;188(5):419–33.
2. Cragg B. Brain extracellular space fixed for electron microscopy. *Neurosci Lett*. Dezembro de 1979;15(2–3):301–6.
3. Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Yong VW. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(10):722.
4. O'Meara RW, Michalski J-P, Kothary R. Integrin Signaling in Oligodendrocytes and Its Importance in CNS Myelination. *J Signal Transduct*. 2011;2011:354091.
5. Baron W, Decker L, Colognato H, ffrench-Constant C. Regulation of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains. *Curr Biol CB*. 21 de Janeiro de 2003;13(2):151–5.
6. BATTERY PC, ffrench-Constant C. Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci*. Setembro de 1999;14(3):199–212.
7. Chun SJ, Rasband MN, Sidman RL, Habib AA, Vartanian T. Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination. *J Cell Biol*. 27 de Outubro de 2003;163(2):397–408.
8. Colognato H, Ramachandrapa S, Olsen IM, ffrench-Constant C. Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J Cell Biol*. 25 de Outubro de 2004;167(2):365–75.
9. Wang J, Milner R. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins via MAP kinase signalling. *J Neurochem*. Janeiro de 2006;96(1):148–59.
10. ffrench-Constant C, Colognato H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol*. Dezembro de 2004;14(12):678–86.
11. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev*. Outubro de 2000;80(4):1267–90.
12. Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. Junho de 2003;4(6):456–68.
13. Kwok JCF, Dick G, Wang D, Fawcett JW. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol*. Novembro de 2011;71(11):1073–89.
14. Rauch U. Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans*. Agosto de 2007;35(Pt 4):656–60.

15. Barros CS, Franco SJ, Muller U. Extracellular Matrix: Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de Janeiro de 2011;3(1):a005108–a005108.
16. Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res.* Janeiro de 2010;339(1):259–68.
17. Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix: Structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* Julho de 2003;200(4):423–8.
18. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:523–53.
19. Powell SK, Williams CC, Nomizu M, Yamada Y, Kleinman HK. Laminin-like proteins are differentially regulated during cerebellar development and stimulate granule cell neurite outgrowth in vitro. *J Neurosci Res.* 15 de Outubro de 1998;54(2):233–47.
20. Sigmundsson K, Ojala JRM, Ohman MK, Osterholm A-M, Moreno-Moral A, Domogatskaya A, et al. Culturing functional pancreatic islets on alpha5-laminins and curative transplantation to diabetic mice. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 27 de Março de 2018;
21. Mercurio AM. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol.* Novembro de 1995;5(11):419–23.
22. Cognato H, French-Constant C, Feltri ML. Human diseases reveal novel roles for neural laminins. *Trends Neurosci.* Setembro de 2005;28(9):480–6.
23. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* Agosto de 2005;24(5):326–32.
24. Yurchenco PD. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de Fevereiro de 2011;3(2).
25. Rodin S, Antonsson L, Hovatta O, Tryggvason K. Monolayer culturing and cloning of human pluripotent stem cells on laminin-521-based matrices under xeno-free and chemically defined conditions. *Nat Protoc.* Outubro de 2014;9(10):2354–68.
26. Bridgen DT, Gilchrist CL, Richardson WJ, Isaacs RE, Brown CR, Yang KL, et al. Integrin-mediated interactions with extracellular matrix proteins for nucleus pulposus cells of the human intervertebral disc. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* Outubro de 2013;31(10):1661–7.
27. Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat.* 1998;193(1):1–21.

28. Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* Outubro de 1996;8(5):625–31.
29. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 14 de Abril de 1995;268(5208):233–9.
30. Yamada KM, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* Outubro de 1995;7(5):681–9.
31. Hallmann R. Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature. *Physiol Rev.* 1 de Julho de 2005;85(3):979–1000.
32. Ekblom P, Lonai P, Talts JF. Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* Março de 2003;22(1):35–47.
33. Vachon PH, Loechel F, Xu H, Wewer UM, Engvall E. Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol.* 1996;134(6):1483–1497.
34. Carter WG, Ryan MC, Gahr PJ. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell.* 17 de Maio de 1991;65(4):599–610.
35. Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol.* Agosto de 1991;114(3):567–76.
36. Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, et al. The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol.* 5 de Maio de 1997;137(3):685–701.
37. Thyboll J, Kortessmaa J, Cao R, Soininen R, Wang L, Iivanainen A, et al. Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol.* Fevereiro de 2002;22(4):1194–202.
38. Wondimu Z, Geberhiwot T, Ingerpuu S, Juronen E, Xie X, Lindbom L, et al. An endothelial laminin isoform, laminin 8 (alpha4beta1gamma1), is secreted by blood neutrophils, promotes neutrophil migration and extravasation, and protects neutrophils from apoptosis. *Blood.* 15 de Setembro de 2004;104(6):1859–66.
39. Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins NA, et al. The laminin α chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of α 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8–11, and cloning of a novel α 3 isoform. *J Cell Biol.* 1997;137(3):685–701.
40. Miner JH, Patton BL. Laminin-11. *Int J Biochem Cell Biol.* Agosto de 1999;31(8):811–6.

41. Yamada M, Sekiguchi K. Molecular Basis of Laminin–Integrin Interactions. Em: *Current Topics in Membranes* [Internet]. Elsevier; 2015 [citado 18 de Agosto de 2017]. p. 197–229. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063582315000605>
42. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adhes Migr*. Janeiro de 2013;7(1):48–55.
43. Holmberg J, Durbeej M. Laminin-211 in skeletal muscle function. *Cell Adhes Migr*. Janeiro de 2013;7(1):111–21.
44. Bernier SM, Utani A, Sugiyama S, Doi T, Polistina C, Yamada Y. Cloning and expression of laminin alpha 2 chain (M-chain) in the mouse. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. Fevereiro de 1995;14(6):447–55.
45. Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR. Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul*. Setembro de 1990;1(10):731–40.
46. Jucker M, Tian M, Norton DD, Sherman C, Kusiak JW. Laminin alpha 2 is a component of brain capillary basement membrane: reduced expression in dystrophic dy mice. *Neuroscience*. Abril de 1996;71(4):1153–61.
47. Leivo I, Engvall E. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Março de 1988;85(5):1544–8.
48. Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol*. 1990;111(4):1685–1699.
49. Vuolteenaho R, Nissinen M, Sairdo K, Byers M, Eddy R, Hirvonen H, et al. Human laminin M chain (merosin): complete primary structure, chromosomal assignment, and expression of the M and A chain in human fetal tissues. *J Cell Biol*. 1 de Fevereiro de 1994;124(3):381–94.
50. Tian M, Hagg T, Denisova N, Knusel B, Engvall E, Jucker M. Laminin-alpha2 chain-like antigens in CNS dendritic spines. *Brain Res*. 1 de Agosto de 1997;764(1–2):28–38.
51. Guldager Kring Rasmussen D, Karsdal MA. Chapter 29 - Laminins. Em: *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* [Internet]. Academic Press; 2016. p. 163–96. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098479000295>
52. Roediger M, Miosge N, Gersdorff N. Tissue distribution of the laminin β 1 and β 2 chain during embryonic and fetal human development. *J Mol Histol*. 1 de Abril de 2010;41(2):177–84.

53. Calof AL, Lander AD. Relationship between neuronal migration and cell-substratum adhesion: laminin and merosin promote olfactory neuronal migration but are anti-adhesive. *J Cell Biol.* Novembro de 1991;115(3):779-94.
54. Cohen J, Johnson AR. Differential effects of laminin and merosin on neurite outgrowth by developing retinal ganglion cells. *J Cell Sci Suppl.* 1991;15:1-7.
55. Engvall E, Earwicker D, Day A, Muir D, Manthorpe M, Paulsson M. Merosin promotes cell attachment and neurite outgrowth and is a component of the neurite-promoting factor of RN22 schwannoma cells. *Exp Cell Res.* Janeiro de 1992;198(1):115-23.
56. Hagg T, Portera-Cailliau C, Jucker M, Engvall E. Laminins of the adult mammalian CNS; laminin- α 2 (merosin M-) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res.* 1 de Agosto de 1997;764(1):17-27.
57. Philpot J, Sewry C, Pennock J, Dubowitz V. Clinical phenotype in congenital muscular dystrophy: correlation with expression of merosin in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord NMD.* Julho de 1995;5(4):301-5.
58. Vainzof M, Marie SK, Reed UC, Schwartzman JS, Pavanello RC, Passos-Bueno MR, et al. Deficiency of merosin (laminin M or alpha 2) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. *Neuropediatrics.* Dezembro de 1995;26(6):293-7.
59. Reed UC, Marie SK, Vainzof M, Salum PB, Levy JA, Zatz M, et al. Congenital muscular dystrophy with cerebral white matter hypodensity. Correlation of clinical features and merosin deficiency. *Brain Dev.* Fevereiro de 1996;18(1):53-8.
60. Trevisan CP, Martinello F, Ferruzza E, Fanin M, Chevally M, Tome FM. Brain alterations in the classical form of congenital muscular dystrophy. Clinical and neuroimaging follow-up of 12 cases and correlation with the expression of merosin in muscle. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg.* Outubro de 1996;12(10):604-10.
61. Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, et al. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet.* Outubro de 1995;11(2):216-8.
62. Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. *Nat Genet.* Novembro de 1994;8(3):297-302.
63. Sunada Y, Bernier SM, Utani A, Yamada Y, Campbell KP. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. *Hum Mol Genet.* Junho de 1995;4(6):1055-61.

64. Sunada Y, Edgar TS, Lotz BP, Rust RS, Campbell KP. Merosin-negative congenital muscular dystrophy associated with extensive brain abnormalities. *Neurology*. Novembro de 1995;45(11):2084–9.
65. Biolamina [Internet]. BIOLAMININ 521 LN (LN521). Disponível em: <http://www.biolamina.com/laminin-ln-521-stem-cell-matrix>
66. Geberhiwot T, Assefa D, Korttesmaa J, Ingerpuu S, Pedraza C, Wondimu Z, et al. Laminin-8 (alpha4beta1gamma1) is synthesized by lymphoid cells, promotes lymphocyte migration and costimulates T cell proliferation. *J Cell Sci*. Janeiro de 2001;114(Pt 2):423–33.
67. Gu Y-C, Korttesmaa J, Tryggvason K, Persson J, Ekblom P, Jacobsen S-E, et al. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood*. 1 de Fevereiro de 2003;101(3):877–85.
68. He Y, Yao Y, Tsirka SE, Cao Y. Cell-culture models of the blood-brain barrier. *Stroke*. Agosto de 2014;45(8):2514–26.
69. Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood–brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol*. 2001;153(5):933–946.
70. Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhes Migr*. Fevereiro de 2013;7(1):101–10.
71. Di Russo J, Luik A-L, Yousif L, Budny S, Oberleithner H, Hofschroer V, et al. Endothelial basement membrane laminin 511 is essential for shear stress response. *EMBO J*. 15 de Maio de 2017;36(10):1464.
72. Thyboll J, Korttesmaa J, Cao R, Soininen R, Wang L, Iivanainen A, et al. Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol*. Fevereiro de 2002;22(4):1194–202.
73. Gautam J, Zhang X, Yao Y. The role of pericytic laminin in blood brain barrier integrity maintenance. *Sci Rep* [Internet]. Dezembro de 2016 [citado 11 de Agosto de 2017];6(1). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep36450>
74. Ishikawa T, Wondimu Z, Oikawa Y, Gentilcore G, Kiessling R, Egyhazi Brage S, et al. Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via alpha6beta1 integrin and MCAM (CD146). *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. Setembro de 2014;38:69–83.
75. Geberhiwot T, Ingerpuu S, Pedraza C, Neira M, Lehto U, Virtanen I, et al. Blood platelets contain and secrete laminin-8 (alpha4beta1gamma1) and adhere to laminin-8 via alpha6beta1 integrin. *Exp Cell Res*. 15 de Dezembro de 1999;253(2):723–32.

76. Kortessmaa J, Yurchenco P, Tryggvason K. Recombinant laminin-8 ($\alpha(4)\beta(1)\gamma(1)$). Production, purification, and interactions with integrins. *J Biol Chem*. 19 de Maio de 2000;275(20):14853–9.
77. Pedraza C, Geberhiwot T, Ingerpuu S, Assefa D, Wondimu Z, Kortessmaa J, et al. Monocytic cells synthesize, adhere to, and migrate on laminin-8 ($\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$). *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de Novembro de 2000;165(10):5831–8.
78. Talts JF, Sasaki T, Miosge N, Gohring W, Mann K, Mayne R, et al. Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin $\alpha 4$ chain and its proteolytic processing in tissues. *J Biol Chem*. 10 de Novembro de 2000;275(45):35192–9.
79. Gonzales M, Weksler B, Tsuruta D, Goldman RD, Yoon KJ, Hopkinson SB, et al. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. Janeiro de 2001;12(1):85–100.
80. Gonzalez AM, Gonzales M, Herron GS, Nagavarapu U, Hopkinson SB, Tsuruta D, et al. Complex interactions between the laminin $\alpha 4$ subunit and integrins regulate endothelial cell behavior in vitro and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 de Dezembro de 2002;99(25):16075–80.
81. Fried K, Sime W, Lillesaar C, Virtanen I, Tryggvasson K, Patarroyo M. Laminins 2 ($\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$, Lm-211) and 8 ($\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$, Lm-411) are synthesized and secreted by tooth pulp fibroblasts and differentially promote neurite outgrowth from trigeminal ganglion sensory neurons. *Exp Cell Res*. 15 de Julho de 2005;307(2):329–41.
82. Li J, Zhou L, Tran HT, Chen Y, Nguyen NE, Karasek MA, et al. Overexpression of laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. *J Invest Dermatol*. Fevereiro de 2006;126(2):432–40.
83. Lian J, Dai X, Li X, He F. Identification of an active site on the laminin $\alpha 4$ chain globular domain that binds to $\alpha v \beta 3$ integrin and promotes angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 18 de Agosto de 2006;347(1):248–53.
84. Sorokin LM, Pausch F, Durbeej M, Ekblom P. Differential expression of five laminin α (1-5) chains in developing and adult mouse kidney. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. Dezembro de 1997;210(4):446–62.
85. Libby RT, Champlaud M-F, Claudepierre T, Xu Y, Gibbons EP, Koch M, et al. Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neurosci*. 2000;20(17):6517–6528.
86. Miner JH, Cunningham J, Sanes JR. Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin $\alpha 5$ chain. *J Cell Biol*. 1998;143(6):1713–1723.

87. Miner JH, Li C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol.* 15 de Janeiro de 2000;217(2):278–89.
88. Nguyen NM, Miner JH, Pierce RA, Senior RM. Laminin alpha 5 is required for lobar septation and visceral pleural basement membrane formation in the developing mouse lung. *Dev Biol.* 15 de Junho de 2002;246(2):231–44.
89. Bolcato-Bellemin AL, Lefebvre O, Arnold C, Sorokin L, Miner JH, Keding M, et al. Laminin alpha5 chain is required for intestinal smooth muscle development. *Dev Biol.* 15 de Agosto de 2003;260(2):376–90.
90. Fukumoto S, Miner JH, Ida H, Fukumoto E, Yuasa K, Miyazaki H, et al. Laminin alpha5 is required for dental epithelium growth and polarity and the development of tooth bud and shape. *J Biol Chem.* 24 de Fevereiro de 2006;281(8):5008–16.
91. Coles EG, Gammill LS, Miner JH, Bronner-Fraser M. Abnormalities in neural crest cell migration in laminin alpha5 mutant mice. *Dev Biol.* 1 de Janeiro de 2006;289(1):218–28.
92. Rebutini IT, Patel VN, Stewart JS, Layvey A, Georges-Labouesse E, Miner JH, et al. Laminin alpha5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through beta1 integrin signaling. *Dev Biol.* 1 de Agosto de 2007;308(1):15–29.
93. Li J, Tzu J, Chen Y, Zhang Y-P, Nguyen NT, Gao J, et al. Laminin-10 is crucial for hair morphogenesis. *EMBO J.* 15 de Maio de 2003;22(10):2400–10.
94. Gao J, DeRouen MC, Chen C-H, Nguyen M, Nguyen NT, Ido H, et al. Laminin-511 is an epithelial message promoting dermal papilla development and function during early hair morphogenesis. *Genes Dev.* 1 de Agosto de 2008;22(15):2111–24.
95. Nguyen NM, Kelley DG, Schlueter JA, Meyer MJ, Senior RM, Miner JH. Epithelial laminin alpha5 is necessary for distal epithelial cell maturation, VEGF production, and alveolization in the developing murine lung. *Dev Biol.* 1 de Junho de 2005;282(1):111–25.
96. Katagiri F, Sudo M, Hamakubo T, Hozumi K, Nomizu M, Kikkawa Y. Identification of Active Sequences in the L4a Domain of Laminin α 5 Promoting Neurite Elongation. *Biochemistry.* 19 de Junho de 2012;51(24):4950–8.
97. Patton BL. Laminins of the neuromuscular system. *Microsc Res Tech.* 1 de Novembro de 2000;51(3):247–61.
98. Rodin S, Antonsson L, Niaudet C, Simonson OE, Salmela E, Hansson EM, et al. Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. *Nat Commun.* 2014;5:3195.

99. Jiang Z, Xi Y, Lai K, Wang Y, Wang H, Yang G. Laminin-521 Promotes Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Sheet Formation on Light-Induced Cell Sheet Technology. *BioMed Res Int.* 2017;2017:9474573.
100. Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev.* Fevereiro de 1997;23(1-2):1-27.
101. Patton BL, Chiu AY, Sanes JR. Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature.* 18 de Junho de 1998;393(6686):698-701.
102. Powell SK, Kleinman HK. Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* Março de 1997;29(3):401-14.
103. Edgar D. Nerve growth factors and molecules of the extracellular matrix in neuronal development. *J Cell Sci Suppl.* 1985;3:107-13.
104. Ernsberger U, Edgar D, Rohrer H. The survival of early chick sympathetic neurons in vitro is dependent on a suitable substrate but independent of NGF. *Dev Biol.* Outubro de 1989;135(2):250-62.
105. Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell.* 26 de Dezembro de 1997;91(7):917-25.
106. Montell DJ, Goodman CS. *Drosophila* laminin: sequence of B2 subunit and expression of all three subunits during embryogenesis. *J Cell Biol.* Novembro de 1989;109(5):2441-53.
107. Anton ES, Sandrock AWJ, Matthew WD. Merosin promotes neurite growth and Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration in vivo: evidence using an antibody to merosin, ARM-1. *Dev Biol.* Julho de 1994;164(1):133-46.
108. Cornbrooks CJ, Carey DJ, McDonald JA, Timpl R, Bunge RP. In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80(12):3850-3854.
109. Palm SL, Furcht LT. Production of laminin and fibronectin by Schwannoma cells: cell-protein interactions in vitro and protein localization in peripheral nerve in vivo. *J Cell Biol.* Maio de 1983;96(5):1218-26.
110. Fernandez-Valle C, Gwynn L, Wood PM, Carbonetto S, Bunge MB. Anti-beta 1 integrin antibody inhibits Schwann cell myelination. *J Neurobiol.* Outubro de 1994;25(10):1207-26.
111. Obremski VJ, Bunge MB. Addition of purified basal lamina molecules enables Schwann cell ensheathment of sympathetic neurites in culture. *Dev Biol.* Março de 1995;168(1):124-37.

112. Hunter DD, Shah V, Merlie JP, Sanes JR. A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*. 16 de Março de 1989;338(6212):229–34.
113. Sanes JR, Hunter DD, Green TL, Merlie JP. S-laminin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1990;55:419–30.
114. Sorokin LM, Pausch F, Frieser M, Kroger S, Ohage E, Deutzmann R. Developmental regulation of the laminin alpha5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation. *Dev Biol*. 15 de Setembro de 1997;189(2):285–300.
115. Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR, Merlie JP. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature*. 16 de Março de 1995;374(6519):258–62.
116. Yu W-M, Yu H, Chen Z-L. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol Neurobiol*. Junho de 2007;35(3):288–97.
117. Fernandez-Valle C, Fregien N, Wood PM, Bunge MB. Expression of the protein zero myelin gene in axon-related Schwann cells is linked to basal lamina formation. *Dev Camb Engl*. Novembro de 1993;119(3):867–80.
118. Podratz JL, Rodriguez E, Windebank AJ. Role of the extracellular matrix in myelination of peripheral nerve. *Glia*. Julho de 2001;35(1):35–40.
119. Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong Y-P, Rangwala R, Proctor TM, et al. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol*. 14 de Fevereiro de 2005;168(4):655–66.
120. Yu W-M, Feltri ML, Wrabetz L, Strickland S, Chen Z-L. Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 4 de Maio de 2005;25(18):4463–72.
121. Yu W-M, Yu H, Chen Z-L, Strickland S. Disruption of laminin in the peripheral nervous system impedes non-myelinating Schwann cell development and impairs nociceptive sensory function. *Glia*. Junho de 2009;57(8):850–9.
122. Liesi P, Dahl D, Vaheri A. Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J Cell Biol*. Março de 1983;96(3):920–4.
123. Liesi P. Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *EMBO J*. Outubro de 1985;4(10):2505–11.
124. Liesi P, Hager G, Dodt HU, Seppala I, Zieglgansberger W. Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J Neurosci Res*. 1 de Fevereiro de 1995;40(2):199–206.

125. Liesi P, Risteli L. Glial cells of mammalian brain produce a variant form of laminin. *Exp Neurol*. Julho de 1989;105(1):86–92.
126. Chiu AY, Espinosa de los Monteros A, Cole RA, Loera S, de Vellis J. Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, Schwann cells, and schwannomas in culture. *Glia*. 1991;4(1):11–24.
127. Green TL, Hunter DD, Chan W, Merlie JP, Sanes JR. Synthesis and assembly of the synaptic cleft protein S-laminin by cultured cells. *J Biol Chem*. 25 de Janeiro de 1992;267(3):2014–22.
128. Hunter DD, Llinas R, Ard M, Merlie JP, Sanes JR. Expression of s-laminin and laminin in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 8 de Setembro de 1992;323(2):238–51.
129. Libby RT, Xu Y, Selfors LM, Brunken WJ, Hunter DD. Identification of the cellular source of laminin beta2 in adult and developing vertebrate retinae. *J Comp Neurol*. 29 de Dezembro de 1997;389(4):655–67.
130. Raabe EH, Yoshida K, Schwarting GA. Differential laminin isoform expression in the developing rat olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res*. 18 de Julho de 1997;101(1–2):187–96.
131. Sarthy PV, Fu M, Huang J. Subcellular localization of an intermediate filament protein and its mRNA in glial cells. *Mol Cell Biol*. Outubro de 1989;9(10):4556–9.
132. Suzuki H, Yamamoto T, Yamamoto H, Konno H, Iwasaki Y, Ohara Y, et al. Intraneuronal laminin-like immunoreactivity in the human central nervous system. *Brain Res*. 18 de Junho de 1990;520(1–2):324–9.
133. Morissette N, Carbonetto S. Laminin alpha 2 chain (M chain) is found within the pathway of avian and murine retinal projections. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. Dezembro de 1995;15(12):8067–82.
134. Sanes JR. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci*. 1989;12:491–516.
135. Liesi P. Extracellular matrix and neuronal movement. *Experientia*. 15 de Setembro de 1990;46(9):900–7.
136. Cohen J, Burne JF, McKinlay C, Winter J. The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. *Dev Biol*. Agosto de 1987;122(2):407–18.
137. Liesi P, Silver J. Is astrocyte laminin involved in axon guidance in the mammalian CNS? *Dev Biol*. Dezembro de 1988;130(2):774–85.

138. Zhou FC. Four patterns of laminin-immunoreactive structure in developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 1 de Setembro de 1990;55(2):191–201.
139. Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, Jucker M. Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci.* Dezembro de 1996;8(12):2739–47.
140. Colognato H, Baron W, Avellana-Adalid V, Relvas JB, Baron-Van Evercooren A, Georges-Labouesse E, et al. CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nat Cell Biol.* Novembro de 2002;4(11):833–41.
141. Caro PA, Scavina M, Hoffman E, Pegoraro E, Marks HG. MR imaging findings in children with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol.* Fevereiro de 1999;20(2):324–6.
142. Leite CC, Lucato LT, Martin MGM, Ferreira LG, Resende MBD, Carvalho MS, et al. Merosin-deficient congenital muscular dystrophy (CMD): a study of 25 Brazilian patients using MRI. *Pediatr Radiol.* Junho de 2005;35(6):572–9.
143. Relucio J, Tzvetanova ID, Ao W, Lindquist S, Colognato H. Laminin alters fyn regulatory mechanisms and promotes oligodendrocyte development. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 23 de Setembro de 2009;29(38):11794–806.
144. Fassler R, Pfaff M, Murphy J, Noegel AA, Johansson S, Timpl R, et al. Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol.* Março de 1995;128(5):979–88.
145. Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Meneses J, Pedersen RA, et al. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev.* 1 de Agosto de 1995;9(15):1883–95.
146. Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Dev Camb Engl.* Novembro de 1996;122(11):3537–47.
147. DiPersio CM, Hodivala-Dilke KM, Jaenisch R, Kreidberg JA, Hynes RO. $\alpha 3\beta 1$ integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol.* 1997;137(3):729–742.
148. Sunada Y, Bernier SM, Kozak CA, Yamada Y, Campbell KP. Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *J Biol Chem.* 13 de Maio de 1994;269(19):13729–32.
149. Miyagoe Y, Hanaoka K, Nonaka I, Hayasaka M, Nabeshima Y, Arahata K, et al. Laminin alpha2 chain-null mutant mice by targeted disruption of the Lama2

- gene: a new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett.* 22 de Setembro de 1997;415(1):33–9.
150. Mayer U, Saher G, Fassler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, et al. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet.* Novembro de 1997;17(3):318–23.
 151. Srichai MB, Zent R. Integrin Structure and Function. Em: Zent R, Pozzi A, editores. *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2010 [citado 16 de Agosto de 2017]. p. 19–41. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0814-8_2
 152. Lowell CA, Mayadas TN. Overview-studying integrins in vivo. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;757:369–97.
 153. Wu X, Reddy DS. Integrins as Receptor Targets for Neurological Disorders. *Pharmacol Ther.* Abril de 2012;134(1):68–81.
 154. Caswell PT, Vadrevu S, Norman JC. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dezembro de 2009;10(12):843–53.
 155. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 20 de Setembro de 2002;110(6):673–87.
 156. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 21 de Julho de 2000;275(29):21785–8.
 157. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 1 de Outubro de 2006;119(Pt 19):3901–3.
 158. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de Março de 2011;3(3).
 159. Belkin AM, Stepp MA. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech.* 1 de Novembro de 2000;51(3):280–301.
 160. Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, et al. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* Abril de 2006;25(3):189–97.
 161. Mecham RP. *The Extracellular Matrix: an Overview.* Springer Science & Business Media; 2011. 426 p.
 162. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:549–99.

163. Lourenço TMP. Regulation of ECM mimetics during oligodendrocytes differentiation in vitro [Internet]. 2012 [citado 9 de Outubro de 2017]. Disponível em: <https://eg.sib.uc.pt/handle/10316/25149>
164. Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de Maio de 2011;3(5).
165. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 15 de Janeiro de 2009;122(Pt 2):159–63.
166. Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, et al. Integrins in immunity. *J Cell Sci.* 15 de Janeiro de 2009;122(Pt 2):215–25.
167. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1 de Outubro de 2004;5:816.
168. Wickstrom SA, Radovanac K, Fassler R. Genetic analyses of integrin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de Fevereiro de 2011;3(2).
169. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:71.
170. Yeung MSY, Zdunek S, Bergmann O, Bernard S, Salehpour M, Alkass K, et al. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell.* 6 de Novembro de 2014;159(4):766–74.
171. Jagielska A, Lowe AL, Makhija E, Wroblewska L, Guck J, Franklin RJM, et al. Mechanical Strain Promotes Oligodendrocyte Differentiation by Global Changes of Gene Expression. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:93.
172. Lourenço T, Grãos M. Modulation of Oligodendrocyte Differentiation by Mechanotransduction. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 29 de Novembro de 2016 [citado 21 de Agosto de 2017];10. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2016.00277/full>
173. Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 de Setembro de 2014;1843(9):1917–29.
174. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology.* 2 de Junho de 2009;72(22):1914–21.
175. Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SPJ, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, et al. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell.* 4 de Junho de 2010;6(6):578–90.

176. Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci*. Novembro de 2008;9(11):839–55.
177. Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. Julho de 2008;131(Pt 7):1749–58.
178. Chen Y, Balasubramaniyan V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, et al. Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1044–51.
179. Milner R, Ffrench-Constant C. A developmental analysis of oligodendroglial integrins in primary cells: changes in alpha v-associated beta subunits during differentiation. *Dev Camb Engl*. Dezembro de 1994;120(12):3497–506.
180. Milner R, Frost E, Nishimura S, Delcommenne M, Streuli C, Pytela R, et al. Expression of alpha vbeta3 and alpha vbeta8 integrins during oligodendrocyte precursor differentiation in the presence and absence of axons. *Glia*. Dezembro de 1997;21(4):350–60.
181. Milner R, Edwards G, Streuli C, Ffrench-Constant C. A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 de Novembro de 1996;16(22):7240–52.
182. Milner R, Ffrench-Constant C. A developmental analysis of oligodendroglial integrins in primary cells: changes in alpha v-associated beta subunits during differentiation. *Dev Camb Engl*. Dezembro de 1994;120(12):3497–506.
183. White R, Gonsior C, Kramer-Albers E-M, Stohr N, Huttelmaier S, Trotter J. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J Cell Biol*. 19 de Maio de 2008;181(4):579–86.
184. Huveneers S, Danen EHJ. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*. 15 de Abril de 2009;122(Pt 8):1059–69.
185. Liang X, Draghi NA, Resh MD. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 11 de Agosto de 2004;24(32):7140–9.
186. Emery B. Regulation of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Science*. 5 de Novembro de 2010;330(6005):779–82.
187. Wegner M. A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes. *J Mol Neurosci MN*. Maio de 2008;35(1):3–12.
188. Fancy SPJ, Baranzini SE, Zhao C, Yuk D-I, Irvine K-A, Kaing S, et al. Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev*. 1 de Julho de 2009;23(13):1571–85.

189. Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao X, Bu H, et al. HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci*. Julho de 2009;12(7):829–38.
190. Chen Y, Wu H, Wang S, Koito H, Li J, Ye F, et al. The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat Neurosci*. Novembro de 2009;12(11):1398–406.
191. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2 de Janeiro de 2008;28(1):264–78.
192. Heiman M, Schaefer A, Gong S, Peterson JD, Day M, Ramsey KE, et al. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell*. 14 de Novembro de 2008;135(4):738–48.
193. Shen S, Li J, Casaccia-Bonnel P. Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain. *J Cell Biol*. 23 de Maio de 2005;169(4):577–89.
194. He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, et al. The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron*. 19 de Julho de 2007;55(2):217–30.
195. Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, et al. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron*. 11 de Março de 2010;65(5):597–611.
196. Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, et al. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron*. 11 de Março de 2010;65(5):612–26.
197. Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Integrin diversity brings specificity in mechanotransduction. *Biol Cell*. Março de 2018;110(3):49–64.
198. Kumar S. Cellular mechanotransduction: stiffness does matter. *Nat Mater*. 2014;13(10):918.
199. Cipitria A, Salmeron-Sanchez M. Mechanotransduction and Growth Factor Signalling to Engineer Cellular Microenvironments. *Adv Healthc Mater*. Agosto de 2017;6(15):1700052.
200. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 22 de Outubro de 2014;15(12):802–12.
201. Le HQ, Ghatak S, Yeung C-YC, Tellkamp F, Gunschmann C, Dieterich C, et al. Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene

- silencing during lineage commitment. *Nat Cell Biol.* Agosto de 2016;18(8):864–75.
202. Lecuit T, Lenne P-F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Agosto de 2007;8(8):633–44.
203. Barnes JM, Przybyla L, Weaver VM. Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *J Cell Sci.* 1 de Janeiro de 2017;130(1):71–82.
204. Matthews BD, Overby DR, Mannix R, Ingber DE. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci.* 1 de Fevereiro de 2006;119(Pt 3):508–18.
205. Orr AW, Helmke BP, Blackman BR, Schwartz MA. Mechanisms of Mechanotransduction. *Dev Cell.* Janeiro de 2006;10(1):11–20.
206. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 25 de Agosto de 2006;126(4):677–89.
207. Fu J, Wang Y-K, Yang MT, Desai RA, Yu X, Liu Z, et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods.* Setembro de 2010;7(9):733–6.
208. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* Abril de 2004;6(4):483–95.
209. Yim EKF, Darling EM, Kulangara K, Guilak F, Leong KW. Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* Fevereiro de 2010;31(6):1299–306.
210. Unadkat HV, Hulsman M, Cornelissen K, Papenburg BJ, Truckenmuller RK, Carpenter AE, et al. An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 de Outubro de 2011;108(40):16565–70.
211. Jansen KA, Atherton P, Ballestrem C. Mechanotransduction at the cell-matrix interface. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. Julho de 2017 [citado 21 de Agosto de 2017]; Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952116303895>
212. Yavropoulou M, Yovos J. The molecular basis of bone mechanotransduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* Setembro de 2016;16(3):221–36.

213. Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S, et al. Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem*. 25 de Junho de 1999;274(26):18393–400.
214. DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Maio de 2011;12(5):308–19.
215. Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Janeiro de 2009;10(1):63–73.
216. Vogel V, Sheetz MP. Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. Fevereiro de 2009;21(1):38–46.
217. Eyckmans J, Boudou T, Yu X, Chen CS. A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Dev Cell*. 19 de Julho de 2011;21(1):35–47.
218. Sheetz MP. Microtubule motor complexes moving membranous organelles. *Cell Struct Funct*. Outubro de 1996;21(5):369–73.
219. Chorev DS, Volberg T, Livne A, Eisenstein M, Martins B, Kam Z, et al. Conformational states during vinculin unlocking differentially regulate focal adhesion properties. *Sci Rep*. 9 de Fevereiro de 2018;8(1):2693.
220. Haase K, Al-Rekabi Z, Pelling AE. Mechanical cues direct focal adhesion dynamics. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;126:103–34.
221. Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*. Maio de 2001;3(5):466–72.
222. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, et al. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*. 11 de Junho de 2001;153(6):1175–86.
223. Livne A, Bouchbinder E, Geiger B. Cell reorientation under cyclic stretching. *Nat Commun*. 30 de Maio de 2014;5:3938.
224. Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol*. 25 de Novembro de 2002;159(4):695–705.
225. Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*. 30 de Janeiro de 2009;323(5914):642–4.
226. del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 30 de Janeiro de 2009;323(5914):638–41.

227. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, et al. Force Sensing by Extension of the Src Family Kinase Substrate, p130Cas. *Cell*. 1 de Dezembro de 2006;127(5):1015–26.
228. Lee SE, Kamm RD, Mofrad MRK. Force-induced activation of talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction. *J Biomech*. 2007;40(9):2096–106.
229. Eyckmans J, Lin GL, Chen CS. Adhesive and mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation in human bone marrow and periosteum-derived progenitor cells. *Biol Open*. 15 de Novembro de 2012;1(11):1058–68.
230. Tyler WJ. The mechanobiology of brain function. *Nat Rev Neurosci*. 20 de Novembro de 2012;13(12):867–78.
231. Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *HepatoL Baltim Md*. Abril de 2008;47(4):1394–400.
232. Lv H, Wang H, Zhang Z, Yang W, Liu W, Li Y, et al. Biomaterial stiffness determines stem cell fate. *Life Sci*. 1 de Junho de 2017;178:42–8.
233. Lv H, Li L, Sun M, Zhang Y, Chen L, Rong Y, et al. Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness. *Stem Cell Res Ther*. 27 de Maio de 2015;6:103.
234. Moore SW, Roca-Cusachs P, Sheetz MP. Stretchy Proteins on Stretchy Substrates: The Important Elements of Integrin-Mediated Rigidity Sensing. *Dev Cell*. Agosto de 2010;19(2):194–206.
235. Discher DE, Janmey P, Wang Y-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 18 de Novembro de 2005;310(5751):1139–43.
236. Mason BN, Califano JP, Reinhart-King CA. Matrix Stiffness: A Regulator of Cellular Behavior and Tissue Formation. Em: Bhatia SK, editor. *Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine: Novel Technologies for Clinical Applications* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2012. p. 19–37. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1080-5_2
237. Bauer NG, French-Constant C. Physical forces in myelination and repair: a question of balance? *J Biol*. 25 de Setembro de 2009;8(8):78.
238. Kippert A, Fitzner D, Helenius J, Simons M. Actomyosin contractility controls cell surface area of oligodendrocytes. *BMC Cell Biol*. 25 de Setembro de 2009;10:71.
239. Jagielska A, Norman AL, Whyte G, Vliet KJV, Guck J, Franklin RJM. Mechanical environment modulates biological properties of oligodendrocyte progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 1 de Novembro de 2012;21(16):2905–14.
240. Lourenço T, Paes de Faria J, Bippes CA, Maia J, Lopes-da-Silva JA, Relvas JB, et al. Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined

- biochemical and mechanical cues. *Sci Rep* [Internet]. Abril de 2016 [citado 25 de Agosto de 2017];6(1). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep21563>
241. Juge L, Pong AC, Bongers A, Sinkus R, Bilston LE, Cheng S. Changes in Rat Brain Tissue Microstructure and Stiffness during the Development of Experimental Obstructive Hydrocephalus. *PloS One*. 2016;11(2):e0148652.
 242. Wondimu Z, Gorfu G, Kawataki T, Smirnov S, Yurchenco P, Tryggvason K, et al. Characterization of commercial laminin preparations from human placenta in comparison to recombinant laminins 2 (α 2 β 1 γ 1), 8 (α 4 β 1 γ 1), 10 (α 5 β 1 γ 1). *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. Março de 2006;25(2):89–93.
 243. Lillien LE, Sendtner M, Raff MC. Extracellular matrix-associated molecules collaborate with ciliary neurotrophic factor to induce type-2 astrocyte development. *J Cell Biol*. Agosto de 1990;111(2):635–44.
 244. Hoffecker IT, Guo W, Wang Y. Assessing the spatial resolution of cellular rigidity sensing using a micropatterned hydrogel-photoresist composite. *Lab Chip*. 21 de Outubro de 2011;11(20):3538–44.
 245. Ly PTT, Stewart C, Pallen CJ. PTP α is required for laminin-2-induced Fyn–Akt signaling to drive oligodendrocyte differentiation. *J Cell Sci* [Internet]. 1 de Agosto de 2018;131(15). Disponível em: <http://jcs.biologists.org/content/131/15/jcs212076.abstract>
 246. Cretu A, Castagnino P, Assoian R. Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels. United States; 2010.
 247. Tse JR, Engler AJ. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol*. Junho de 2010;Chapter 10:Unit 10.16.
 248. Sehgel NL, Sun Z, Hong Z, Hunter WC, Hill MA, Vatner DE, et al. Augmented Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness and Adhesion when Hypertension is Superimposed on Aging. *Hypertension*. Fevereiro de 2015;65(2):370–7.
 249. Tracqui P, Broisat A, Toczek J, Mesnier N, Ohayon J, Riou L. Mapping elasticity moduli of atherosclerotic plaque in situ via atomic force microscopy. *J Struct Biol*. Abril de 2011;174(1):115–23.
 250. Hayenga HN, Trache A, Trzeciakowski J, Humphrey JD. Regional atherosclerotic plaque properties in ApoE $^{-/-}$ mice quantified by atomic force, immunofluorescence, and light microscopy. *J Vasc Res*. 2011;48(6):495–504.
 251. Loeser RF. Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology*. 2000;37(1–2):109–16.

252. Forsyth CB, Pulai J, Loeser RF. Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* Setembro de 2002;46(9):2368-76.
253. Mobasher A, Carter SD, Martin-Vasallo P, Shakibaei M. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int.* 2002;26(1):1-18.
254. Millward-Sadler SJ, Salter DM. Integrin-Dependent Signal Cascades in Chondrocyte Mechanotransduction. *Ann Biomed Eng.* 1 de Março de 2004;32(3):435-46.
255. Danen EHJ, Sonnenberg A. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol.* Dezembro de 2003;201(4):632-41.
256. Schaff M, Tang C, Maurer E, Bourdon C, Receveur N, Eckly A, et al. Integrin $\alpha 6 \beta 1$ is the Main Receptor for Vascular Laminins and Plays a Role in Platelet Adhesion, Activation and Arterial Thrombosis. *Circulation.* 2013;CIRCULATIONAHA-112.
257. Benninger Y, Colognato H, Thurnherr T, Franklin RJM, Leone DP, Atanasoski S, et al. Beta1-integrin signaling mediates premyelinating oligodendrocyte survival but is not required for CNS myelination and remyelination. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 19 de Julho de 2006;26(29):7665-73.
258. Lee KK, de Repentigny Y, Saulnier R, Rippstein P, Macklin WB, Kothary R. Dominant-negative beta1 integrin mice have region-specific myelin defects accompanied by alterations in MAPK activity. *Glia.* Junho de 2006;53(8):836-44.
259. Barros CS, Nguyen T, Spencer KSR, Nishiyama A, Colognato H, Müller U. $\beta 1$ integrins are required for normal CNS myelination and promote AKT-dependent myelin outgrowth. *Dev Camb Engl.* 15 de Agosto de 2009;136(16):2717-24.
260. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis.* 1 de Janeiro de 2012;2(1):1-5.
261. Blaschuk KL, Frost EE, French-Constant C. The regulation of proliferation and differentiation in oligodendrocyte progenitor cells by alphaV integrins. *Dev Camb Engl.* Maio de 2000;127(9):1961-9.

Material Suplementar

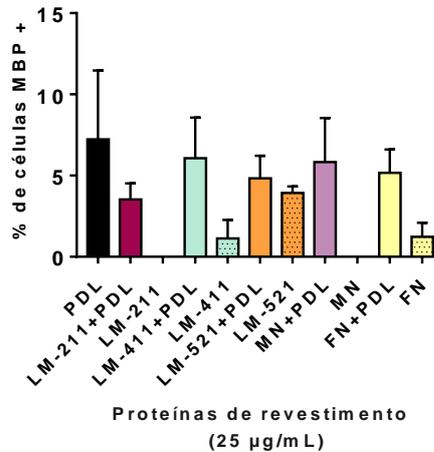


Figura suplementar 1 | Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC na diferenciação das células CG4 na percentagem de células MBP+. Quantificação da percentagem de células MBP+ ao fim de 5 dias de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com as diferentes proteínas: LM-211, LM-411, LM-521, MN ou FN (todas a 25 µg/mL), substratos mistos de LM-211+PDL, LM-411+PDL, LM-521+PDL, MN+PDL ou FN+PDL (todas a 25/25 µg/mL), ou PDL como controlo. Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados são representados por média ± erro padrão da percentagem de células MBP+ ao fim de 5 dias ($n=3$). Significância estatística comparando com o controlo PDL por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test.

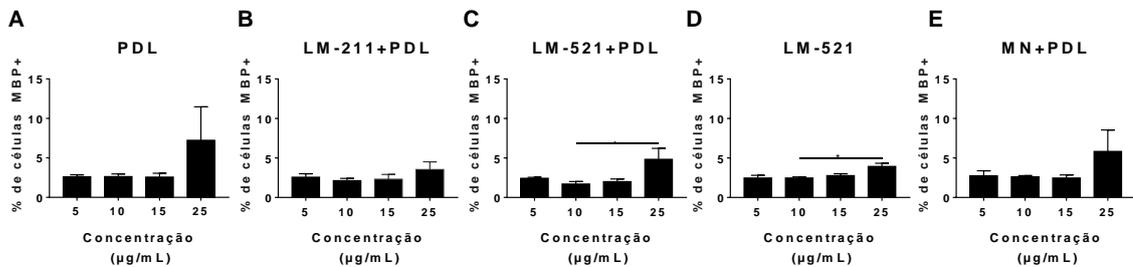


Figura suplementar 2 | Representação gráfica do efeito de diferentes proteínas de MEC, em diferentes concentrações, na percentagem de células MBP+. Quantificação da percentagem de células MBP+ em substratos de: (A) PDL; (B) LM-211+ PDL; (C) LM-521+PDL; (D) LM-521; (E) MN + PDL. As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com as diferentes proteínas. As proteínas utilizadas isoladamente (PDL e LM-521) foram adicionadas nas concentrações de 5, 10, 15 e 25 µg/mL e as proteínas utilizadas em substratos mistos contendo PDL (LM-211+PDL; LM-521+PDL; MN+PDL) foram adicionadas nas concentrações 5/5, 10/10, 15/15 e 25/25 µg/mL. Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados são representados por média ± erro padrão da percentagem de células MBP+ ao fim de 5 dias ($n=3$). Significância estatística para A e D comparando com o controlo (25 µg/mL) por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test (* $p < 0,05$). Significância estatística para B, C e E comparando com o controlo (25 µg/mL) por One-way ANOVA (* $p < 0,05$).

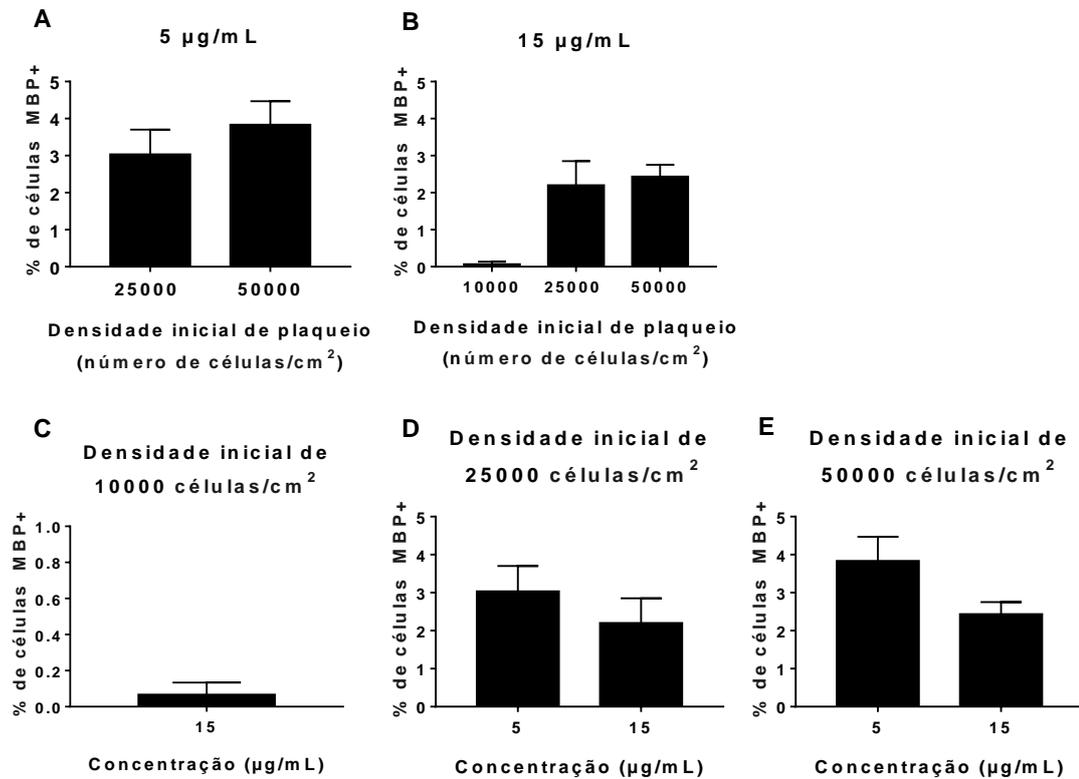


Figura suplementar 3 | Representação gráfica do efeito das diferentes densidades iniciais de sedimentação celular, em diferentes concentrações de LM-521+PDL, na percentagem de células MBP+. (A e B) Quantificação da percentagem de células MBP+ obtido em cada condição, em função concentração de proteína utilizada de LM-521+PDL: (A) 5/5 µg/mL e (B) 15/15 µg/mL. (C, D e E) Quantificação da percentagem de células MBP+ obtido em cada condição, em função da densidade inicial de sedimentação celular: (C) 10000/cm²; (D) 25000/cm²; (E) 50000/cm². As células foram cultivadas durante 5 dias em meio de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com substratos mistos Lm-521+PDL às concentrações de (5/5 e 15/15 µg/mL). Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados para A, B, C, D, e E são representados por média ± erro padrão do número de células/cm² ao fim de 5 dias ($n=3$). Os resultados são representados por média ± erro padrão da percentagem de células MBP+ ao fim de 5 dias ($n=3$). Significância estatística para A, D e E por Kruskal-Wallis test, seguida por Dunn's multiple comparison test. Significância estatística para B por Unpaired t test.

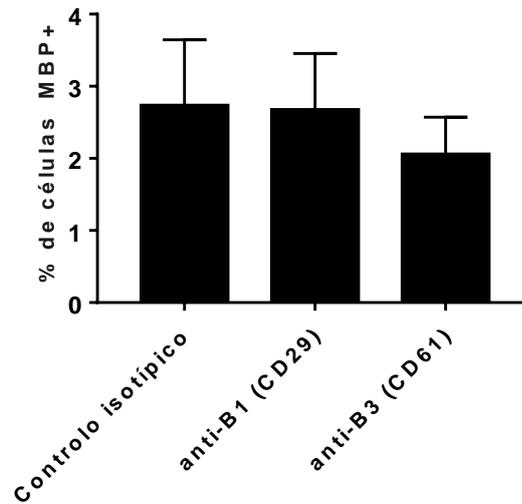


Figura suplementar 4| Representação gráfica do efeito do bloqueio de subunidades de integrina na porcentagem de células MBP+. Quantificação da porcentagem de células MBP+ ao fim de 5 dias de diferenciação em hidrogéis de poliacrilamida (6,5 kPa) funcionalizados com Lm-521+PDL (15/15 µg/mL). Após 5 dias de diferenciação, as células foram fixadas e procedeu-se à imunocitoquímica com o marcador MBP e marcação dos núcleos com DAPI, aquisição de imagens por software AxioVision 4.8 (Zeiss) e contagem dos núcleos utilizando o software Image J. Os resultados são representados por média ± erro padrão da porcentagem de células MBP+ ao fim de 5 dias ($n=5$). Significância estatística comparando com o controle isotópico por One-way ANOVA.