



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – IB
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**Papel das metaloproteínases e das células satélites no
músculo Sóleo durante o envelhecimento**

Jéssica Silvino Valente

Botucatu
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – IB
CÂMPUS DE BOTUCATU

Papel das metaloproteínas e das células satélites no músculo Sóleo durante o envelhecimento

Jéssica Silvino Valente

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biociências
Campus de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista, UNESP, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai

Botucatu

2016

"E nós descobrimos que,
mesmo sem asas, poderíamos voar.
Mas a grande complicação foi
quando nós percebemos que
poderíamos ir sem data para voltar."

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Valente, Jéssica Silvino.

Papel das metaloproteínases e das células satélites no
músculo Sóleo durante o envelhecimento / Jéssica Silvino
Valente. - Botucatu, 2016

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Capes: 20601000

1. Envelhecimento. 2. Metaloproteínases de matriz
extracelular. 3. Matriz extracelular. 4. Músculo
esquelético. 5. Músculo estriado. 6. Células satélites de
músculo esquelético.

Palavras-chave: Célula satélite; Envelhecimento; Matriz
extracelular; Músculo estriado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de cursar e finalizar uma faculdade, foi um caminho difícil e concluir um dos ciclos mais importantes da minha vida é a maior gratificação que eu poderia ter.

Agradecer aos meus amados pais, Edson e Teresa, e a minha irmã Rafaela, por me ensinarem a nunca desistir, que a distância e a saudade se tornam insignificantes quando se tem amor e confiança, esta vitória não poderia se realizar sem vocês.

Aos meus avôs maternos, Valentim e Natividade que sempre tiveram esperança e confiança em mim, até mesmo nos momentos em que a eu havia perdido, obrigada pelo amor incondicional, vocês deviam ser eternos.

Agradeço ao meu co-orientador e amigo Ivan, e amigas Francielle e Bruna, que me ajudaram em cada passo deste trabalho, obrigada pelas risadas, pelas alegrias e pelas tristezas, por confiarem e acreditarem que sou capaz, a melhor parte destes anos de laboratório foi ter vocês comigo.

Aos meus colegas laboratório, Bruno Duran, Bruno Fantinatti, Paula, Rafaela, Tassiana, Carlos, Juarez, Sara e Grasi pelos auxílios nas técnicas e discussões. Gostaria de agradecer também, minha orientadora Prof^a Dr^a Maeli Dal Pai pela oportunidade, conhecimento e paciência nesses três anos.

Obrigada todos os professores, funcionários e colegas de sala desta universidade, que de algum modo participaram desta formação, proporcionando aprendizado e exemplos de formação, e também a cidade de Botucatu, que trouxe ensinamentos para toda a vida.

Agradeço também à FAPESP pelas bolsas concedidas.

SUMÁRIO

RESUMO	6
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVOS	11
<i>Objetivo geral</i>	<i>11</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>11</i>
MATERIAIS E MÉTODOS	12
<i>Animais e grupos experimentais</i>	<i>12</i>
<i>Dados Anatômicos.....</i>	<i>12</i>
<i>Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)</i>	<i>12</i>
<i>Análise Estatística</i>	<i>14</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

RESUMO

No envelhecimento há um declínio progressivo da força muscular, sendo este um processo fisiológico que gera fraqueza muscular e aumento do risco de queda, podendo levar à morte. A regeneração muscular também é alterada no envelhecimento, o que leva a uma deficiência neste processo e um comprometimento da manutenção da massa muscular, devido à diminuição do número ou da atividade de células satélites (CS). As CS são células miogênicas indiferenciadas que podem ser ativadas em resposta a miotraumas severos ou adaptativos, sendo esse processo importante para a regeneração, manutenção e *turnover* da massa muscular. As CS expressam marcadores miogênicos, como o Pax7, MyoD e Miogenina. Durante a regeneração muscular, as CS migram em direção a matriz extracelular que exerce um papel importante na ativação e proliferação dessas células. As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), endoproteases capazes de clivar componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina e fibrilina, exercem um papel fundamental no processo de regeneração muscular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das MMPs e das CS no músculo sóleo de ratos durante o envelhecimento. Foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos envelhecidos nos períodos de 3, 12 e 22 meses. Ao final de cada período, os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados para a coleta de amostras do músculo sóleo (SL) e para as análises de expressão gênica através da técnica RT-qPCR. No envelhecimento, ocorreu a atrofia muscular, comprovada pela diminuição da massa muscular relativa nos animais senis, bem como pelo aumento da expressão gênica dos atrogenes MAFBx e MuRF1. Houve diminuição na expressão gênica da MyoD, indicando redução da proliferação celular. Observamos um aumento dos níveis de expressão do Pax7, marcador de CS quiescentes e diminuição na expressão dos colágenos IaI e III e da MMP-2. Concluímos que, no envelhecimento, ocorreu aumento na expressão gênica de componentes relacionados com o catabolismo muscular (atrofia) e dos componentes da matriz extracelular. Essas alterações podem ter promovido a ativação das CS como um possível mecanismo, para manter ou recuperar a massa muscular.

Palavras-chave: músculo estriado, células satélites, matriz extracelular, envelhecimento.

INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo dos mamíferos e constitui aproximadamente 50% do peso corporal total, sendo responsável pela geração de força, locomoção e metabolismo. Esse tecido é constituído por miofibrilas alongadas e cilíndricas que se unem formando as fibras musculares multinucleadas, cujos núcleos localizam-se na região periférica, abaixo da membrana plasmática ou sarcolema (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Além disso, no músculo esquelético adulto, reside um conjunto de pequenas células mononucleares, as células satélites (CS), sendo denominadas também de células miogênicas indiferenciadas. Estas células ocupam uma posição entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular, participando do crescimento, manutenção e regeneração do tecido muscular (PETTE e STARON, 2000; MOTOHASHI e ASAKURA, 2014).

As fibras musculares são constituídas por unidades contráteis que se repetem ao longo da fibra muscular, conhecidas como sarcômeros. Os sarcômeros apresentam proteínas miofibrilares contráteis, regulatórias e estruturais, das quais se destacam a actina e a miosina, que interagem após hidrólise do ATP, levando a contração muscular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Além disso, o músculo esquelético apresenta uma alta plasticidade, o que habilita este tecido alterar suas características estruturais, metabólicas e funcionais em consequência de estímulos que modificam o ambiente muscular (hipóxia e estresse térmico), da atividade contrátil (exercício de resistência, estimulação elétrica, desnervação e envelhecimento), da carga no músculo (exercício resistido e microgravidade) e do fornecimento de substrato (intervenção nutricional) (PETTE e STARON, 2000; FLUCK e HOPPELER, 2003; MAGAUDDA, MAURO, *et al.*, 2004). Uma das principais características da plasticidade muscular é a regulação intrínseca da transcrição de genes músculo-específicos que promovem o aumento ou redução da síntese proteica (GLASS, 2005). Considerando que o conteúdo de proteínas miofibrilares representa aproximadamente 85% do volume da fibra muscular (HOPPELER, 1986), qualquer situação que altere o balanço entre a síntese e degradação de proteínas pode contribuir para o aumento (hipertrofia) ou redução (atrofia) da massa muscular (FAVIER, BENOIT e FREYSSINET, 2008).

O número de mionúcleos na fibra muscular é o fator determinante da taxa de síntese proteica, uma vez que fornecem a quantidade necessária de DNA para suportar o

aumento da transcrição. A quantidade de citoplasma (área da fibra) controlada por um único mionúcleo caracteriza o conceito de domínio mionuclear (CHEEK, 1985). Em humanos, Petrella *et al.* (2006; 2008) sugerem que até um limite moderado de hipertrofia, que alcance um tamanho máximo de $\sim 2.000\text{-}2.250\ \mu\text{m}^2$ na área do domínio mionuclear, o aumento na área de secção transversal (AST) das fibras pode ocorrer, sem a necessidade de acrescentar novos mionúcleos. Tal fato ocorre devido à capacidade dos mionúcleos existentes na fibra de intensificar o processo de tradução e, assim, promover um aumento da síntese proteica. Porém, em situações que ocorre um aumento da AST das fibras que excede um volume citoplasmático suportável pelo mionúcleos (ex. exercício resistido), há a necessidade da adição de novos mionúcleos para suprir a hipertrofia das fibras musculares (ALLEN, MONKE, *et al.*, 1995; KADI e THORNELL, 2000).

Com base no conhecimento de que os mionúcleos das fibras musculares maduras são considerados pós-mitóticos (não apresentam capacidade de divisão), sugere-se que a adição de novos mionúcleos ocorre somente pela atividade das células satélites (CS), que são precursores miogênicos com intensa atividade mitogênica. Essas células, quando ativadas, proliferam e se diferenciam fornecendo núcleos para a regeneração da microlesão muscular (miotrauma adaptativo), contribuindo assim para a hipertrofia da miofibra (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGÉ e RUDNICK, 2004).

As CS podem ser ativadas em resposta a miotraumas severos ou adaptativos, que requerem a regeneração muscular. Este mecanismo envolve a proliferação e/ou diferenciação das CS que poderão participar da formação de novas fibras (apenas em situações de necrose seguida de regeneração), originarem novas CS ou diferenciar-se em novos mionúcleos (HAWKE e GARRY, 2001; CHARGÉ e RUDNICK, 2004).

O controle e ativação das CS podem ser influenciados por vários fatores de crescimento, que atuam como reguladores positivos, como os hormônios (GH - *growth hormone*, insulina e testosterona), os fatores de crescimento (IGF-I, *insulin-like growth factor*; HGF, *hepatocyte growth factor*; FGF, *fibroblast growth factor*) e as citocinas (IL-6, *interleukin-6*; IL-15, *Interleukin-15*); e/ou reguladores negativos como o TGF- β , *transforming growth factor-beta* (CHARGÉ e RUDNICK, 2004). Além disso, as CS tanto no estado quiescente como no estado ativado, expressam marcadores miogênicos, que controlam as fases de ativação, proliferação e diferenciação durante o processo de crescimento ou reparo muscular (HAWKE e GARRY, 2001). Vários marcadores para CS foram identificados, entre eles o *Pax7*, o *Sox8*, o *c-Met*, a proteína *CD34* (*cluster of*

differentiation 34) (CORNELISON, OLWIN, *et al.*, 2000; HAWKE e GARRY, 2001; MICHAEL, XIANG, *et al.*, 2002; CHARGÉ e RUDNICK, 2004; SCHMIDT, GLASER, *et al.*, 2005) e os fatores de regulação miogênica (*MRFs*, *myogenic regulatory factors*) (SEALE e RUDNICK, 2000).

Os MRFs são fatores transcricionais expressos no músculo esquelético durante a miogênese e crescimento muscular, nos processos de reparação, sendo importantes também para a manutenção do fenótipo do músculo. Fazem parte dos MRFs a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4. Essas proteínas nucleares contêm um domínio altamente conservado, conhecido como “basic helix-loop-helix” (bHLH). Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico (“basic”), uma sequência consenso no DNA conhecida como E-box (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos. A região “helix-loop-helix” do MRF constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47. A ligação do heterodímero MRF-proteína E à sequência E-box ativa a transcrição dos genes músculo-específicos, levando à sua expressão (RUDNICK e JAENISH, 1995; MOLKENTIN e OLSON, 1996; SABOURIN e RUDNICK, 2000). Além disso, essa interação pode iniciar a transcrição dos genes dos próprios MRFs durante o crescimento muscular (MURRE, MCCAWE, *et al.*, 1989; SASSON, 1993).

A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a de diferenciação, enquanto que a miogenina e o MRF4 são expressos em células na fase de fusão e diferenciação em fibras musculares imaturas (MEGNEY e RUDNICK, 1995). A miogenina e a MyoD também podem estar envolvidas na manutenção do fenótipo da fibra muscular adulta, como rápido ou lento. A miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (HUGHES, TAYLOR, *et al.*, 1993).

Além do seu papel na diferenciação das CS, a MyoD também regula a síntese de laminina, colágeno IV e fibronectina, além de controlar a expressão de integrinas que facilitam a associação de mioblastos com a matriz extracelular (VOYTIK, PRZYBORSKI, *et al.*, 1993).

A matriz extracelular (MEC) no músculo esquelético é constituída pela matriz intersticial, composta por diferentes isoformas de colágeno, fibronectina, ácido hialurônico e os proteoglicanos; e pela membrana basal associada à fibra muscular, composta por camadas de colágeno IV e VI e de laminina (JUNQUEIRA e

CARNEIRO, 2008; SAKUMA, AOI e YAMAGUCHI, 2015). Durante a regeneração muscular, as CS migram do seu nicho (entre a lâmina basal e o sarcolema) em direção a matriz intersticial, para reposicionar as novas miofibras no local da lesão (SAKUMA, AOI e YAMAGUCHI, 2015).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endoproteases dependentes de zinco, que desempenham papel importante na proteólise construtiva da MEC, sendo responsáveis pela clivagem de seus componentes (SNYMAN e NIESLER, 2015). Vinte e cinco membros da família de MMPs foram identificadas, sendo a maioria secretada, exceto seis que são do tipo transmembranas, como, por exemplo, as MMPs 2, 9 e 14. As MMPs são agrupadas como collagenases, gelatinases, estromelisinases e matrilisinas com base em seu substrato específico da MEC (CHEN e LI, 2009). A atividade das MMPs é controlada pelas TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*) e o equilíbrio entre essas duas atividades mantém a homeostase da matriz (SNYMAN e NIESLER, 2015).

Estudos têm demonstrado que as MMPs são mediadores da remodelação da MEC no músculo sendo cruciais na reparação efetiva do músculo esquelético. As MMPs 2, 9 e 14 têm implicação na homeostase muscular (LUND, MOULY e CORNELISON, 2014), auxiliando na atividade das CS após a injúria (SADEH, 1988; MURRE, MCCAWE, *et al.*, 1989). A MMP-14 é necessária para a ativação das MMPs 2 e 9, para a secreção da MMP-13 e também para a ativação de quimiocinas, citocinas, e de fatores de crescimento, importantes na regeneração do músculo (SAKUMA, AOI e YAMAGUCHI, 2015). Foi ainda demonstrado que a MMP-14 degrada o colágeno I, principal componente fibroso de tecido cicatricial, processo fundamental para a invasão dos mioblastos humanos (VOYTIK, PRZYBORSKI, *et al.*, 1993), enquanto que a MMP-2, classificada como gelatinase, desempenha um importante papel na atrofia muscular (FAN, TAKAWALE, *et al.*, 2012). Em geral a atividade das MMPs aumenta quando há a necessidade de acréscimo de novos mionúcleos, seja por auto-renovação celular ou em processos de hipertrofia e regeneração muscular, o que leva a uma diminuição das proteínas da MEC (OHTAKE, TOJO e SEIKI, 2006).

Durante o envelhecimento, há uma diminuição do número e/ou da capacidade proliferativa das CS o que, em situações de regeneração, leva a uma cicatrização demorada com extensa formação de tecido cicatricial fibroso (SADEH, 1988; SCHULTZ e MCCORMICK, 1994; BORNEMANN, MAIER e KUSCHEL, 1999).

Estudos recentes indicam que, durante a cicatrização do músculo no envelhecimento, o microambiente celular é menos eficaz na manutenção da ativação, recrutamento e destino miogênico das CS, mas facilita a conversão para um estado fibrogênico (CARLSON, CONBOY, *et al.*, 2009; CAROSIO, BERARDINELLI, *et al.*, 2009). Interessantemente, evidências têm demonstrado que o microambiente hostil de regeneração muscular é restaurável, tanto pela neutralização da atividade do fator de crescimento de transformação (TGF) (CARLSON, CONBOY, *et al.*, 2009) quanto pela introdução da MMP-9 ativa por terapia celular (GARGIOLI, COLLETA, *et al.*, 2009).

Apesar de bem relatada a importância das CS no controle da massa muscular, ainda há na literatura dúvidas sobre o seu real papel no envelhecimento. Além disso, a relação das MMPs com as CS em músculos envelhecidos ainda é pouco investigada. Assim, elucidar o papel dos mecanismos que regulam o processo de regeneração e manutenção da massa muscular traz a esperança de que alvos de novas drogas terapêuticas possam ser encontrados para atenuar ou até mesmo bloquear a atrofia muscular decorrente do envelhecimento normal e em condições de miopatias.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) e das Células Satélites (SC) no músculo Sóleo de ratos durante o envelhecimento.

Objetivos específicos

Analisar os seguintes parâmetros no músculo sóleo de ratos envelhecidos:

- A atrofia muscular através da análise dos atrogenes Murf 1 (*Muscle RING-Finger 1*) e MAFBx (*Muscle Atrophy F-box*) pela da técnica de RT-qPCR ;
- O potencial de proliferação e diferenciação das células satélites através da análise dos MRFs (MyoD e Miogenina) e Pax7, por meio de expressão gênica (RT-qPCR);
- A expressão gênica (RT-qPCR) dos componentes da matriz extracelular, as MMPs 2 e 14 e as isoformas de colágeno I- α 1 e III.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos envelhecidos por 3, 12 e 22 meses. Estes foram provenientes do Biotério Central – UNESP, Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas (2 animais por gaiola), no Biotério de pequenos mamíferos do Departamento de Morfologia, em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12h), onde receberam ração e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Protocolo N° 343-CEEA). Para a realização do experimento foram utilizados três grupos experimentais:

- Grupo 3M (n=8): Animais com três meses de idade;
- Grupo 12M (n=8): Animais com doze meses de idade;
- Grupo 22M (n=8): Animais com vinte dois meses de idade;

Dados Anatômicos

Durante todo o período do experimento foram monitorados, diariamente, o peso corporal e o consumo de ração dos animais. Ao final do experimento, os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação. A seguir, o músculo sóleo (SL), que apresenta características oxidativa e de contração lenta, foi coletado, pesado e submetido à análise molecular. Além disso, foi utilizado o peso do músculo para avaliar o índice de atrofia e/ou hipertrofia muscular.

Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (BUSTIN, VLADIMIR, *et al.*, 2009).

a) Extração de RNA com TRIzol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA)

Para a extração de RNA total, fragmentos do músculo sóleo (SL) previamente congelados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 ml de TRIzol/50-100 mg de tecido, conforme as especificações do fabricante. O RNA purificado foi ressuspensionado em Água Ultrapura e armazenado a -80 °C. Foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE HealthCare, EUA) para verificar a qualidade da extração e quantificar o RNA. A qualidade do RNA foi obtida pelo número da integridade do RNA (*RNA Integrity Number, RIN*), a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA) (FLEIGE e PFAFFL, 2006). Após esta etapa, foi realizado o tratamento do RNA com Dnase, conforme as instruções do protocolo *Dnase I – Amplification Grade* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

b) Reação de Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA archive kit* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificação do fabricante. Foram utilizados 2 µg de RNA total obtido do músculo SL com a adição de 2,5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNaseOUT* (40 unidades/µL) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O volume final da reação foi ajustado para 100 µL H₂O livre de Rnases.

c) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A PCR em Tempo Real foi realizada com o *Power SYBR®Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 2 µL do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 µL de *Power SYBR®Green Mix* (2,5X), primers “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas) e água-Ultrapura suficiente para um volume final de 25 µL de solução. Os primers para os genes analisados (Tabela 1) foram desenhados através do software *Primer Express®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com), e sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Os genes PPIA (*Peptidylprolyl Isomerase A*), PPIB (*Peptidylprolyl Isomerase B*) e GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*) foram utilizados como endógenos para normalizar a expressão gênica. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Quant Studio* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de qPCR

foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) utilizando o Data Assist 2.0 (Life Technologies).

Tabela I: Genes que foram analisados pela reação de RT-qPCR.

Genes	Nº Acesso
MyoD	NM_176079.1
Miogenina	NM_017115.2
Pax 7	NM_001191984.1
MMP-2	NM_031054.2
MMP-14	NM_031056.1
Colágeno I- α I	NM_053304.1
Colágeno III	NM_032085.1
MAFBx	NM_133521.1
Murf	NM_080903.1
PPIA	NM_017101.1
PPIB	NM_022536.2
GAPDH	NM_017008.4

Nº Acesso: número de acesso às sequências publicadas no GenBank

Análise Estatística

Para a análise dos resultados que obtiveram a distribuição normal, foi utilizada a análise de variância para o modelo com um fator (ANOVA - one way), sendo os valores expressos em média e desvio padrão (média $\pm$ DP), complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%

($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O equilíbrio entre as vias de anabolismo e catabolismo é responsável por manter o fenótipo e a homeostase muscular e, situações que promovem o desbalanço nesse equilíbrio podem ser observadas na atrofia muscular que ocorre no envelhecimento (MCKINNELL e RUDNICKI, 2004), o catabolismo leva à degradação das miofibrilas e outras proteínas musculares, com perda e/ou redução da força muscular (COHEN, NATHAN e GOLDBERG, 2015). Nosso estudo demonstrou uma diminuição na massa muscular relativa no músculo sóleo (SL) dos grupos 12 e 22M ($0,0473 \pm 0,005$; $0,0390 \pm 0,003$), respectivamente, quando comparados ao grupo jovem ($0,101 \pm 0,023$).

Entre os sistemas de degradação proteica muscular, destaca-se o sistema ubiquitina proteossoma (UPS), que é responsável pela degradação da maioria das proteínas musculares (BONALDO e SANDRI, 2013). Foram analisados neste trabalho dois constituintes para degradação proteica pelo sistema UPS, os atrogenes músculo específico: MAFBx (*Muscle Atrophy F-box*), responsável por catalisar a degradação de proteínas que promovem a síntese proteica, e MuRF1 (*Muscle RING Finger 1*), catalisador da ubiquitinação e degradação do aparelho miofibrilar do citoesqueleto (COHEN, NATHAN e GOLDBERG, 2015). Houve um aumento na expressão gênica do atrogene MAFBx no músculo SL dos grupos de 12M e 22M comparados ao grupo 3M, enquanto a expressão do MuRF1 aumentou nos grupo 12M em relação ao grupos 3M e 22M (Fig.1). Estudos evidenciam um aumento na expressão gênica desses atrogenes, tanto *in vivo*, em modelo de imobilização dos membros posteriores de ratos nos músculos plantar, onde detectaram um aumento de ambos os atrogenes após sete dias (VECHETTI-JUNIOR, BERTAGLIA, *et al.*, 2015), quanto *in vitro*, com células C2C12 tratadas com TNF- α (*Tumor Necrosis Fator alpha*), que, devido à produção de espécies reativas de oxigênio, apresentaram aumento na expressão gênica do atrogene MAFBx, após duas horas de tratamento (LI, CHEN, *et al.*, 2004).

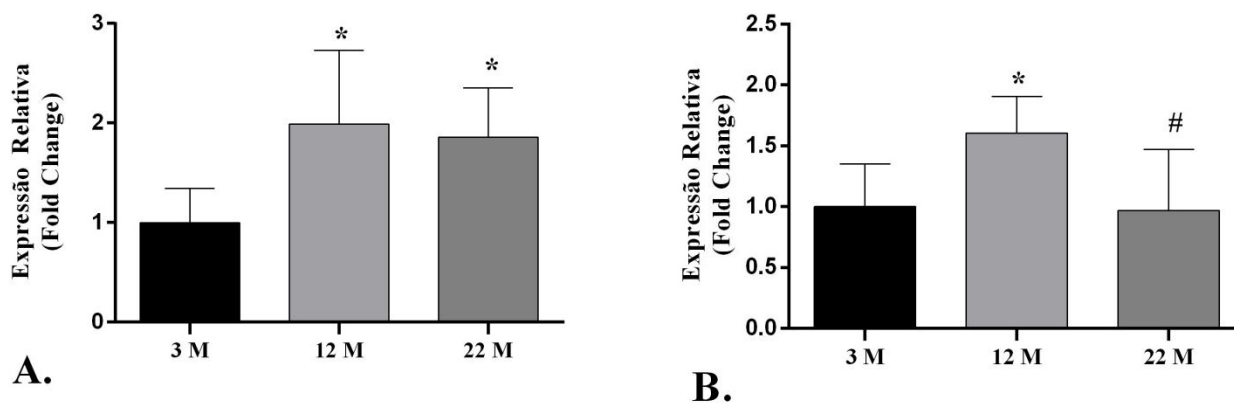


Figura 1. Expressão gênica dos atrogenes no músculo sóleo. A: MAFBx e B: MuRF 1, dos grupos 3M, 12M e 22M. * $p < 0,05$ vs. 3M; # $p < 0,05$ vs. 12M. Valores em média $\pm$ desvio padrão. One-way ANOVA com teste post hoc Tukey.

Entre as vias de sinalização envolvidas com a ativação dos atrogenes, destaca-se a via do NF- κ B (*Nuclear Fator kappa b*) (MCKINNELL e RUDNICKI, 2004). Em seu estado inativo, esse fator de transcrição nuclear é sequestrado no citoplasma por proteínas inibidoras, chamadas I κ B, que após serem fosforiladas por um complexo conhecido como IKK (*I κ Bkinase*) resulta na sua ubiquitinação e degradação (MCKINNELL e RUDNICKI, 2004). Isso possibilita a translocação do NF- κ B para o núcleo e posterior transcrição dos atrogenes, resultando em um aumento específico do catabolismo e na atrofia muscular (MCKINNELL e RUDNICKI, 2004). Portanto, a fosforilação das I κ Bs é crucial para a ativação da via NF- κ B (KELLEHER, FAIRCHILD e KESLACY, 2010).

Outro fator intimamente associado com a atrofia muscular relacionado à idade é a diminuição da capacidade regenerativa muscular, dependente das CS, que são responsáveis pelo crescimento, reparação e *turnover* do tecido muscular adulto (SCHULTZ e LIPTON, 1982; SHEFER, VAN DE MARK, *et al.*, 2009). Durante o processo de reparo ou crescimento muscular, a ativação, proliferação e diferenciação destas células, são controladas por marcadores miogênicos (HAWKE e GARRY, 2001). Embora estudos demonstrem uma redução na atividade/número das CS, assim como na redução do fator miogênico Pax7, durante o envelhecimento, (DOMINGUES-FARIA, VASSON, *et al.*, 2016; PALLAFACCHINA, BLAAUW e SCHIAFFINO, 2013; SHEFER, VAN DE MARK, *et al.*, 2006) nossos resultados demonstraram um aumento na expressão gênica do Pax7, marcador de CS quiescentes, conforme o avanço da idade, no músculo SL dos grupos estudados (Fig.2). Esse achado sugere um possível

mecanismo de ativação das CS quiescentes no músculo senil. O mesmo foi observado por *Brzeszczyńska et al* (2016), que demonstraram um aumento tanto do Pax7 como do Pax3 em pacientes de meia idade (idosos saudáveis) quando comparados ao controle, sugerindo assim um estímulo da atividade regenerativa muscular nesses pacientes. *He et al* (2013) também observaram aumento na expressão gênica do Pax7 em pacientes com câncer, e, segundo os autores, as células satélite são ativadas por fatores tumorais presentes no sangue, que ativam a via clássica do NF- κ B; esse fato pode desregular a expressão do Pax7 comprometendo assim a regeneração muscular devido à incapacidade dos mioblastos de se fundirem e reparar a fibra danificada. Assim, os nossos resultados sugerem uma possível tentativa das CS em recuperar ou manter a massa muscular do músculo SL.

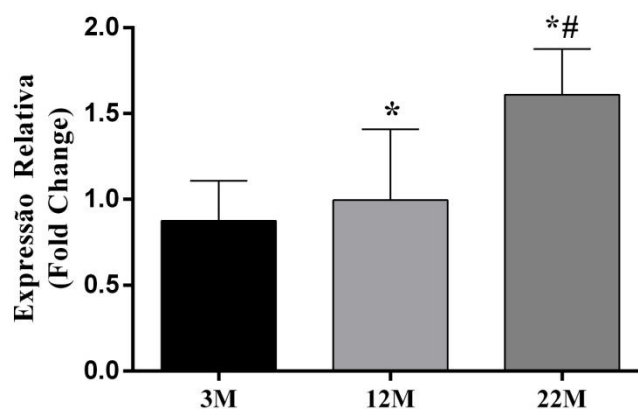


Figura 2. Expressão gênica do marcador miogênico Pax7 no músculo sóleo, nos grupos 3M, 12M e 22M. * $p < 0,05$ vs. 3M. # $p < 0,05$ vs. 12M. Valores em média $\pm$ desvio padrão. One-way ANOVA com teste post hoc Tukey.

Os fatores de regulação miogênica (MRFs, *myogenic regulatory factors*) também são importantes na manutenção do fenótipo do músculo, sendo expressos durante a miogênese, crescimento muscular, bem como nos processos de reparação (SINGH e DILWORTH, 2013). Em nosso estudo a MyoD, envolvida com os processos de proliferação celular, mostrou uma diminuição na expressão gênica no músculo SL do grupo de 22M quando comparado ao grupo de 12M, enquanto a Miogenina, relacionada com a diferenciação terminal, não apresentou diferença estatística (Fig.3) (SINGH e DILWORTH, 2013). Esse fato demonstra que no envelhecimento, a diminuição da taxa de proliferação das CS pode diminuir a capacidade de regeneração do músculo, acentuando a degradação, fato demonstrado pela expressão dos atrogenes

no músculo SL do nosso estudo, afetando assim a homeostase para a manutenção da massa muscular.

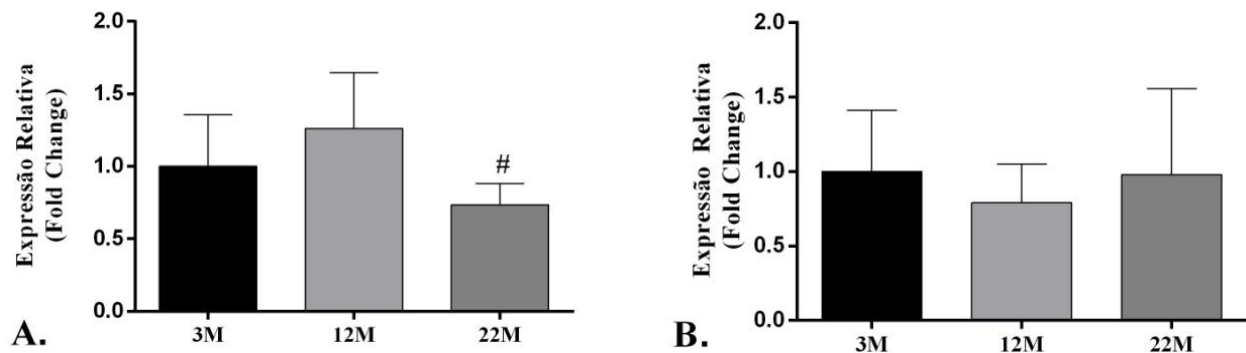


Figura 3. Expressão gênica dos MRFs no músculo sóleo. A: MyoD e B: Miogenina, dos grupos 3M, 12M e 22M. # $p < 0,05$ vs. 12M. Valores em média $\pm$ desvio padrão. One-way ANOVA com teste post hoc Tukey.

Além do desequilíbrio nas vias de síntese e degradação proteica, alterações na matriz extracelular (MEC) do músculo estriado também são responsáveis pela perda da massa muscular durante a atrofia (Kragstrup, Kjaer e MacKey, 2011), bem como modificações no comportamento nas células mononucleadas, como as CS, podendo alterar o desenvolvimento, reparação e remodelação do tecido muscular (Garg e Boppart, 2016). No nosso estudo, observamos redução na expressão gênica das isoformas de colágeno I α I e III (componentes da MEC), no músculo SL dos animais envelhecidos (Fig.4), corroborando com estudos em modelos animais que sugerem uma redução na síntese de colágeno com o avanço da idade (Mays, McAnulty, *et al.*, 1991); entretanto, Brabaj *et al.* (2005) mostraram um aumento na síntese do colágeno em humanos idosos, demonstrando que os dados presentes na literatura são conflitantes (Kragstrup, Kjaer e MacKey, 2011). Estudos são necessários, como por exemplo, a análise da expressão proteica para melhor compreender o comportamento do colágeno da MEC do músculo durante o envelhecimento.

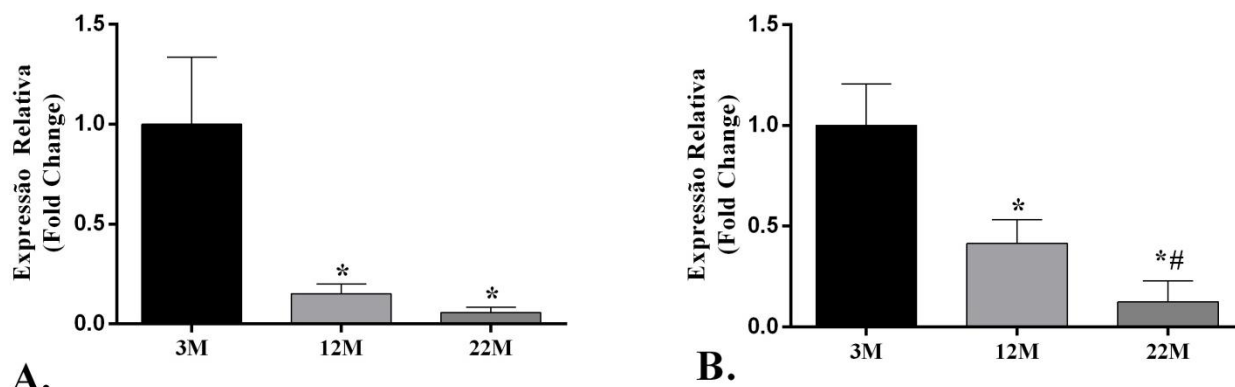


Figura 4. Expressão gênica do componente da matriz extracelular no músculo sóleo. A: Colágeno IaI e B: Colágeno III. * $p < 0,05$ vs. 3M; # $p < 0,05$ vs. 12M. Valores em média $\pm$ desvio padrão. One-way ANOVA com teste post hoc Tukey

A MEC apresenta uma proteólise construtiva, responsável pela clivagem e *turnover* dos seus componentes, na qual, as metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham importante papel (SNYMAN e NIESLER, 2015), e mudanças nessas proteases acompanham a atrofia muscular (CARMELI, MOAS, *et al.*, 2004). Nesse estudo, observamos que a gelatinase MMP-2 diminuiu no músculo SL do grupo de 22M em relação aos grupos de 3M e 12M, enquanto a MMP-14, uma collagenase, não apresentou diferença significativa (Fig.5). Os dados mostram uma baixa atividade das MMPs no músculo SL fato que pode corroborar a baixa expressão dos colágenos, indicando que a alteração da MEC acompanha a alteração das fibras no músculo sóleo, culminando com a atrofia muscular.

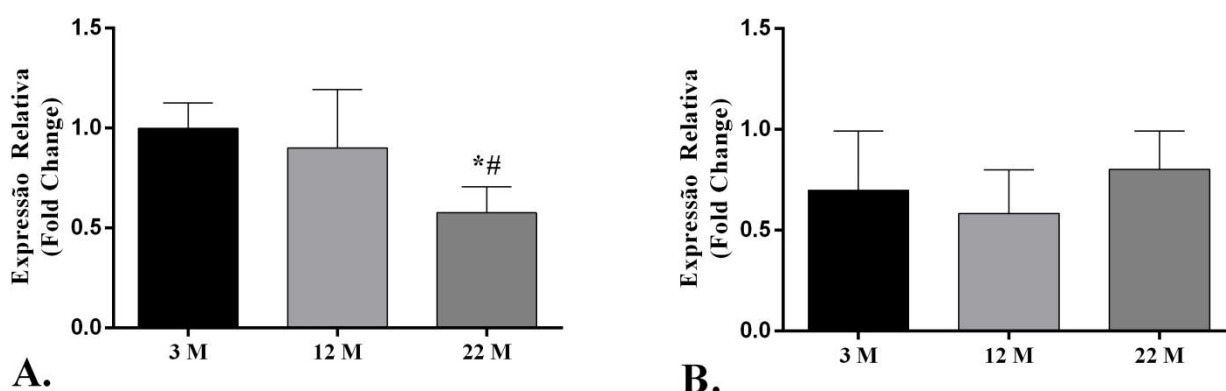


Figura 5. Expressão gênica das endoproteases da matriz extracelular no músculo sóleo. A: MMP-2 e B: MMP-14. * $p < 0,05$ vs. 3M; # $p < 0,05$ vs. 12M. Valores em média $\pm$ desvio padrão. One-way ANOVA com teste post hoc Tukey.

CONCLUSÃO

Durante o envelhecimento, houve aumento no catabolismo no músculo sóleo, diminuição da proliferação celular, juntamente com alterações na matriz extracelular: diminuição do Colágeno IaI e III e da MMP 2 resultando na atrofia muscular. O aumento na expressão do Pax 7 sugere um provável mecanismo de ativação das células satélites como tentativa para manter ou recuperar a massa muscular.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, D. L.; MONKE, S. R.; TALMADGE, R. J.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol**, v. 78, p. 1969-1967, 1995.
- BABRAJ, J. A.; CUTHBERTSON, D. J. R.; SMITH, K.; LANGBERG, H.; MILLER, B.; KROGSGAARD, M. R.; KJAER, M.; RENNIE, M. J. Collagen synthesis in human musculoskeletal tissues and skin. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, p. 864-869, 2005.
- BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, p. 25-39, 2013.
- BORNEMANN, A.; MAIER, F.; KUSCHEL, R. Satellite cells as players and targets in normal and diseased muscle. **Neuropediatrics**, v. 30, p. 167-175, 1999.
- BRZESZCZYŃSKA, J.; JOHNS, N.; SCHILB, A.; DEGEN, S.; DEGEN, M.; LANGEN, R.; SCHOLS, A.; GLASS, D. J.; ROUBENOFF, R.; GREIG, C. A.; JACOBI, C.; FEARON, K. C. H.; ROSS, J. A. Loss of oxidative defense and potential blockade of satellite cell maturation in the skeletal muscle of patients with cancer but not in the healthy elderly. **Aging**, v. 8, p. 1-12, 2016.
- BUSTIN, S. A.; VLADIMIR, B.; GARSO, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clin Chem**, 2009.
- CARLSON, M. E.; CONBOY, M. J.; HSU, M.; BARCHAS, L.; JEONG, J.; AGRAWAL, A.; MIKELS, A. J.; AGRAWAL, S.; SCHAFFER, D. V.; CONBOY, I. M. Relative roles of TGF-beta1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. **Aging Cell**, v. 8, p. 676-689, 2009.
- CARMELI, E.; MOAS, M.; REZINICK, A. Z.; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v. 29, p. 191-197, 2004.
- CAROSIO, S.; BERARDINELLI, M. G.; AUCELLO, M.; MUSARO, A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. **Ageing Res Rev**, v. 10, p. 35-42, 2009.
- CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICK, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, p. 209-238, 2004.
- CHEEK, D. B. The control of cell mass and replication. The DNA unit a personal 20-year study. **Early Hum**, 1985.
- CHEN, X.; LI, Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. **Cell Adh Migr**, v. 3, p. 337-341, 2009.
- COHEN, S.; NATHAN, J. A.; GOLDBERG, A. L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. **Nature**, v. 14, p. 58-74, 2015.

CORNELISON, D. D.; OLWIN, B. B.; RUDNICK, M. A.; WOLD, B. J. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. **Dev Biol**, v. 224, p. 122-137, 2000.

DOMINGUES-FARIA, C.; VASSON, M.; GONCALVEZ-MENDES, N.; BOIRIE, Y.; WALRAND, S. Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. **Ageing Research Reviews**, v. 26, p. 22-36, 2016.

FAN, D.; TAKAWALE, A.; LEE, J.; KASSIRI, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, 2012.

FAVIER, F. B.; BENOIT, H.; FREYSSINET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflugers Arch**, v. 456, p. 587-600, 2008.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance**, v. 27, p. 126-139, 2006.

FLUCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 146, p. 160-161, 2003.

GARG, K.; BOPPART, M. D. Influence of Exercise and Aging on Extracellular Matrix Composition in the Skeletal Muscle Stem Cell Niche, 2016.

GARGIOLI, C.; COLLETA, M.; DE GRANDIS, F.; CANNATA, S. M.; COSSU, G. PIGFMMP-9-expressing cells restore microcirculation and efficacy of cell therapy in aged dystrophic muscle. **Nat Med**, v. 14, p. 973-978, 2009.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 1974-1984, 2005.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 9, p. 534-551, 2001.

HE, W. A.; BERARDI, E.; CARDILLO, V. M.; ACHARYYA, S.; AULINO, P.; THOMAS-AHNER, J.; WANG, J. X.; BLOOMSTON, M.; MUSCARELLA, P.; NAU, P.; SHAH, N.; BUTCHBACH, M. E. R.; LADNER, K.; ADAMO, S.; RUDNICKI, M. A.; KELLER, C.; COLETTI, D.; MONTANARO, F.; GUTTRIDGE, D. C. NF- κ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 4821-4835, 2013.

HOPPELER, H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. **J Sports Med**, 1986.

HUGHES, S. M.; TAYLOR, J. M.; TAPSOCOTT, S. J.; GURGLEY, C. M.; CARTER, W. J.; PETERSON, C. A. Selective accumulation of MyoD and Miogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. **Development**, v. 118, p. 1137-1147, 1993.

JUNQUEIRA, J. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 10, p. 182-203.

- KADI, F.; THORNELL, L. E. Concomitant increase in mionuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. **Histochem Cell Biol**, v. 113, p. 99-103, 2000.
- KELLEHER, A. R.; FAIRCHILD, T. J.; KESLACY, S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF- κ B canonical cascade activation. **Acta Diabetol**, v. 47, p. 315-323, 2010.
- KRAGSTRUP, T. W.; KJAER, M.; MACHEY, A. L. Structural, biochemical, cellular, and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with aging. **Scand J Med Sci Sports**, v. 21, p. 749-757, 2011.
- LI, Y.-P.; Chen, Y.; JONH, J.; MOYLAN, J.; JIN, B.; MANN, D. L.; REID, M. B. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 362-370, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LUND, D. K.; MOULY, V.; CORNELISON, D. MMP-14 is necessary but not sufficient for invasion of three-dimensional collagen by human muscle satellite cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 307, p. 140-149, 2014.
- MAGAUDDA, L.; MAURO, D. D.; TRIMARCHI, F.; ANASTASE, G. Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. **Basic Appl Myol**, 2004.
- MAYS, P. K.; MCANULTY, R. J.; CAMPA, J. S.; LARENT, G. J. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. **Biochem.J.**, v. 276, p. 307-313, 1991.
- MCKINNELL, I. W.; RUDNICKI, M. A. Molecular Mechanisms of Muscle Atrophy. **Cell Press**, v. 119, p. 907-910, 2004.
- MEGNEY, L. A.; RUDNICK, M. A. CDetermination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochem. Cell Biol**, v. 73, p. 723-732, 1995.
- MICHAEL, J.; XIANG, Z.; DAVENPORT, G.; HAYEK, M.; DODSON, M. V. Isolation and characterization of canine satellite cells. **Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 38, p. 467-480, 2002.
- MICHAUD, M.; BALARDY, L.; MOULIS, G.; GAUDIN, C.; PEYROT, C.; VELLAS, B.; CESARI, M.; NOURHASHEMI, F. Proinflammatory Cytokines, Aging, and, Age-related Diseases. **JAMDA**, v. 14, p. 877-882, 2013
- MOLKENTIN, J. D.; OLSON, E. N. Defining the regulatory networks for muscle development. **Curr Opin Genet Dev**, v. 6, p. 445-453, 1996.
- MOTOHASHI, N.; ASAKURA, A. A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. **Front Cell Dev Biol**, v. 1, 2014.
- MURRE, C. MCCAWE, P. S.; VAESSIN, H.; CAUDY, M.; JAN, L. Y.; YAN, J. N.; CABRERA, C. V.; BUSKIN, J. N.; HAUSCHKA, S. D.; LASSAR, A. B.;

WEINTRAUB, H.; BALTIMORE, D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell**, v. 58, p. 537-544, 1989.

OHTAKE, Y.; TOJO, H.; SEIKI, M. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. **J Cell Sci**, 2006.

PALLAFACCHINA, G.; BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. 12-18, 2013.

PETRELLA, J. K.; KIM, J. S.; CROSS, J. M.; KOSEK, D. J.; BAMMAN, M. M. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance trained young and older men and women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2006.

PETRELLA, J. K.; KIM, J. S.; CROSS, J. M.; KOSEK, D. J.; BAMMAN, M. M. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in human is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. **J Appl Physio**, v. 104, p. 1736-1742, 2008.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**, 2000.

RUDNICK, M. A.; JAENISH, R. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. **Bioessays**, v. 17, p. 203-209, 1995.

SABOURIN, L. A.; RUDNICK, M. A. The molecular regulation of myogenesis. **Clin Genet**, v. 57, p. 16-25, 2000.

SADEH, M. Effects of aging on skeletal muscle regeneration. **J Neurol Sci**, v. 87, p. 67-74, 1988.

SAKUMA, K.; AOI, W.; YAMAGUCHI, A. Current understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. **Eur J Physiol**, v. 467, p. 213-229, 2015.

SASSON, D. A. Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. **Dev. Biol**, v. 156, p. 11-23, 1993.

SCHMIDT, K.; GLASER, G.; WERNIG, A.; WEGNER, M.; ROSORIUS, O. Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. **J Biol Chem**, v. 278, p. 29769-29775, 2005.

SCHULTZ, E.; LIPTON, B. H. SKELETAL MUSCLE SATELLITE CELLS: CHANGES IN PROLIFERATION POTENTIAL AS A FUNCTION OF AGE. **Mechanism of Ageing and Development**, v. 20, p. 377-383, 1982.

SCHULTZ, E.; MCCORMICK, K. M. Skeletal muscle satellite cells. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 123, p. 213-257, 1994.

SEALE, P.; RUDNICK, M. A. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. **Exp Biol**, v. 218, p. 115-124, 2000.

SHEFER, G.; VAN DE MARK, D. P.; RICHARDSON, J. B.; YABLONKA-REUVENI, Z. Satellite-cell pool size does matter: Defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Developmental Biology**, v. 294, p. 50-66, 2006.

SHEFER, G.; VAN DE MARK, D. P.; RICHARDSON, J. B.; YABLONKA-REUVENI, Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. **Dev Biol**, p. 1-26, 2009.

SINGH, K.; DILWORTH, F. J. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. **FEBS Journal**, v. 280, p. 3991-4003, 2013.

SNYMAN, C.; NIESLER, C. U. MMP-14 in skeletal muscle repair. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 36, p. 215-225, 2015.

SNYMAN, C.; NIESLER, C. U. MMP-14 in skeletal muscle repair. **J Muscle Res Cell Motil**, 2015.

VECHETTI-JUNIOR, I. J.; BERTAGLIA, R. S.; FERNANDEZ, G. J.; DE PAULA, T. G.; DE SOUZA, R. W. A.; MORAES, L. M.; MARECO, E. A.; DE FREITAS, C. E.A.; AGUIAR, A. F.; CARVALHO, R. F.; DAL-PAI-SILVA, M. Aerobic Exercise Recovers Disuse-induced Atrophy Through the Stimulus of the LRP130/PGC-1 α Complex in Age Rats. **Journals of Gerontology Biological Sciences**, p. 1-9, 2015.

VOYTIK, S. L.; PRZYBORSKI, M.; BADYLAK, S. F.; KONIECZNY, S. F. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. **Dev Dynam**, v. 198, p. 214-224, 1993.