



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FRANCIELLE CAROLINE MOSELE

**PAPEL DAS METALOPROTEÍNASES E DAS CÉLULAS SATÉLITES NO
MÚSCULO PLANTAR DURANTE O ENVELHECIMENTO.**

Botucatu

2016

FRANCIELLE CAROLINE MOSELE

**PAPEL DAS METALOPROTEÍNASES E DAS CÉLULAS SATÉLITES NO
MÚSCULO PLANTAR DURANTE O ENVELHECIMENTO.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista, UNESP, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai

Botucatu
2016

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

Mosele, Francielle Caroline. Papel das metaloproteínases e das células satélites no músculo plantar durante o envelhecimento / Francielle Caroline Mosele. - 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. Metaloproteases. 2. Sarcopenia. 3. Matriz extracelular. 4. Células satélites de músculo esquelético. 5. Músculos - Regeneração. 6. Músculo esquelético. 7. Envelhecimento.

Palavras-chave: Células satélites; Matriz extracelular; Sarcopenia.

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditaram (e ainda acreditam) em mim, na minha capacidade de ir cada vez mais longe, na minha vontade de ser cientista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por toda proteção e pela coragem dada para persistir nessa conquista.

Agradeço, aos meus pais Otacir Mosele e Carmen Bonfim, por todo carinho, amor e incentivo. Um agradecimento especial a você, papito, por ter sacrificado alguns de seus sonhos e desejos para que eu conseguisse o meu. Amo vocês.

Agradeço, aos meus irmãos Fernando Mosele e Felipe Mosele, que indiretamente, me conduziram a essa conquista para que pudesse ser um exemplo, como irmã mais velha, para vocês.

A você Nicolas Colloca, meu amor, agradeço por acreditar em mim quando eu não acreditei, por me apoiar em minhas decisões e por me amar sempre. Te amo muito.

Aos meus sogros, Francisco Colloca e Rosane Messias, e a você Cida Florence, minha sogra de coração, obrigada por sempre me acolherem e cuidarem de mim quando precisei.

Agradeço aos meus tios, primos e avós, que de alguma forma me ajudaram a concluir esse curso.

Aos meus amigos Amanda Hellen, Marcelo Lima e Thais Aguilar, obrigada pela amizade e confiança depositada em mim.

A você, minha amiga Jéssica, muito obrigada pelos ensinamentos, pelas experiências vividas no laboratório e por sempre acreditar em mim da mesma forma em que acredito que você!

Agradeço, ao meu amigo Juan de Nicolai, pela experiência de dividir segredos, medos, dúvidas, raivas e alegrias ao mesmo tempo em que dividimos um apartamento.

Agradeço, a minha amiga Bruna Zanella, pela paciência e calma em tirar minhas dúvidas.

Ao meu coorientador e amigo, Ivan Vechetti-Junior, meu eterno obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, risadas e principalmente, por todo o apoio e confiança.

Aos meus colegas de laboratório: Bruno Duran, Bruno Fantinatti, Paula Paccielli, Rafaela Nunes, Carlos Alves, Juarez Ferreira, Tassiana Gutierrez e Sarah Cury, agradeço por me auxiliarem quando precisei, por me encorajarem, por me ajudarem na interpretação dos resultados e pelas risadas nos momentos de descontração.

Agradeço, a minha orientadora Prof^a Dr^a Maeli Dal Pai, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e por todo conhecimento ensinado.

Agradeço a FAPESP pelas bolsas de iniciação concedidas ao longo desses anos.

RESUMO

O envelhecimento é caracterizado por um declínio progressivo da força muscular, processo fisiológico que gera fraqueza aumentando o risco de queda em idosos. O aumento da fraqueza muscular ocorre pela perda gradual da massa muscular (sarcopenia) e por deficiência na regeneração muscular, devido a uma redução no número e/ou atividade das células satélites (CS).. As CS, em resposta a miotraumas, podem fornecer novos mionúcleos para as fibras, desempenhando papel importante na manutenção da massa muscular. Durante o processo de regeneração muscular, as metaloproteinases (MMPs) participam da ativação e proliferação das CS, através da degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC), possibilitando a migração das CS do nicho para a MEC para regenerar as miofibras. Apesar de bem relatada a importância das CS no controle da massa muscular, ainda há dúvidas sobre o seu real papel no envelhecimento e além disso, a relação MMPs com as CS em músculos envelhecidos ainda é pouco investigada. Sendo assim, nosso objetivo foi avaliar o papel das MMPs e das CS no mecanismo de regeneração durante a sarcopenia. Foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos avaliados aos 3, 12 e 22 meses. Ao final de cada período, os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados, sendo o músculo plantar (PL) coletado para as análises moleculares de expressão gênica. Após 12 e 22 meses, houve redução do peso do músculo PL (g) e aumento na expressão gênica do marcador de atrofia MAFBx, indicando a degradação das proteínas musculares. Enquanto a expressão proteica não indicou diferença significativa, o avanço da idade demonstrou aumento no mRNA do Pax7, o que sugere um possível mecanismo de ativação das poucas e quiescentes CS. A redução na expressão gênica de MyoD nos animais idosos pode explicar a diminuição da proliferação celular para a manutenção da massa muscular, contribuindo com a atrofia. Embora houve redução do mRNA para ambas isoformas do colágeno analisadas (I- α I e III), a análise proteica indica que a deposição de colágeno se manteve semelhante entre os grupos avaliados, que em conjunto com a redução do mRNA das MMPs 2 e 14, nos grupos de 12 e 22 meses, propõem deposição de colágeno por redução das vias de degradação pelas MMPs e não por aumento na síntese. Nossos dados indicam que o possível aumento da ativação das células satélites no envelhecimento não foi capaz de recuperar ou atenuar a perda da massa muscular.

Palavras-chave: sarcopenia, matriz extracelular, células satélites

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Animais e grupos experimentais	14
3.2 Dados anatômicos.....	14
3.3 Avaliação quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR.....	15
3.5 Avaliação quantitativa da expressão proteica por Western Blot	16
3.6 Análise estatística	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 REFERÊNCIAS	24

1 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 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, e participam 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 aos vários estímulos, como hipóxia e estresse térmico, exercício de resistência e resistido, estimulação elétrica, desnervação, envelhecimento, microgravidade e 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 esses 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 miofibrila (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 (HAWKE e GARRY, 2001), 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 RUDNICKI, 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; MOKKENTIN 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 (MEGENEY 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 proliferação 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 primeiramente migram de seu nicho (entre a lâmina basal e o sarcolema) em direção a matriz intersticial, para reposicionar

as novas miofibras no local da lesão, e em seguida, aumentam sua atividade mitótica (DUMONT, BENTZINGER, *et al.*, 2015; SNYMAN e NIESLER, 2015). Moléculas de adesão, como laminina e receptor c-Met para HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), moléculas solúveis, tal como HGF, e as rotas de orientação são importantes para direcionar a migração dessas células. Embora a MEC forneça suporte para a migração, ela também pode atuar como uma barreira física, principalmente em presença de fibrose, e a secreção de metaloproteínases de matriz são importantes para facilitar essa migração através da clivagem de seus componentes (Fig.1) (DUMONT, BENTZINGER, *et al.*, 2015).

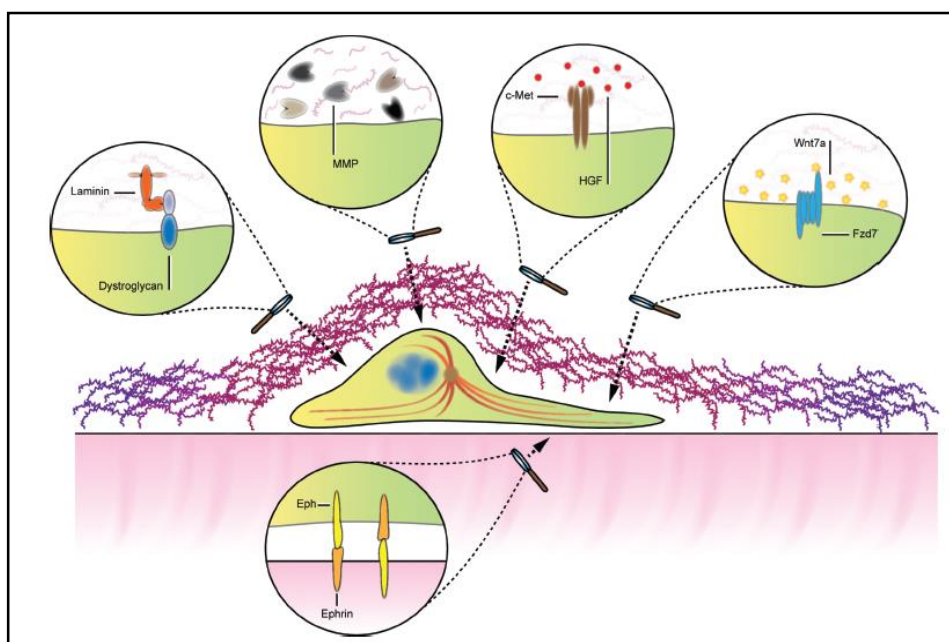


Figura 1. Esquema representando uma célula satélite antes do processo de migração. As CS recebem orientação do seu microambiente, que podem repelir como as efrinas, ou promover quimiotaxia para o local da lesão, como HGF e em especial as MMPs, que atuam na degradação dos componentes da MEC que circundam as CS. Fonte: adaptado de Dumont, 2015. FONTE: DUMONT *et al.*, 2015.

As metaloproteínases de matriz (MMPs) são pertencentes a uma família de endoproteases dependentes de zinco e cálcio, denominada *Metzincin* (MANNELLO e MEDDA, 2012). As MMPs partilham um número de características estruturais e funcionais, possuindo quatro domínios funcionais em sua estrutura: um peptídeo sinal, um domínio pró-peptídeo, domínio catalítico e o domínio hemopexina C, um peptídeo de ligação de comprimento variável. Em termos gerais, o pró-domínio está envolvido na ativação da enzima e variações no domínio catalítico referem-se a diferenças nos substratos das enzimas (Fig.2) (ALAMEDDINE, 2012).

Vinte e cinco membros da família de MMPs foram identificadas; sendo a maioria secretada, exceto seis que são do tipo transmembrana, como, por exemplo, as MMPs 2, 9 e 14 (CHEN e LI, 2009), que estão inseridas na membrana por um segmento transmembranar ou por glicosilfosfatidilinositol (GPI).

As MMPs são agrupadas de acordo com a sua composição, domínio e substrato especificam da MEC, podendo ser: collagenases, que são compostas de um domínio catalítico e um domínio hemopexina C; gelatinases, que têm um domínio catalítico e um domínio de ligação ao colágeno, chamado fibronectina; estromelinas, que possuem os mesmos domínios das gelatinases, diferenciando apenas no substrato; e matrilisinas, quando não possuem o domínio hemopexina C (ALAMEDDINE, 2012; FANJUL-FERNÁNDEZ, FOLGUERAS, *et al.*, 2010).

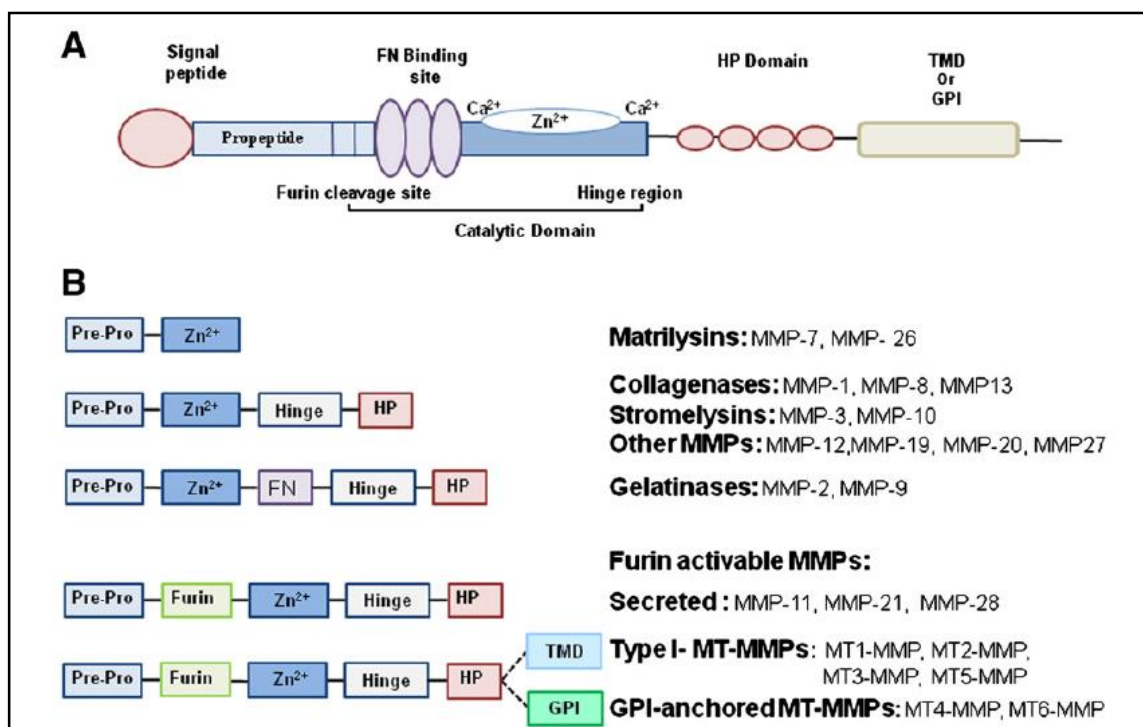


Figura 2. Domínios estruturais das metaloproteinases de matriz. **A)** Representação esquemática dos domínios das MMPs, que proporcionam as atividades funcionais. **B)** Representação esquemática da composição estrutural dos subgrupos das MMPs. FONTE: Alameddine, 2012.

Todas MMPs são sintetizadas como pré-pró-enzimas inativas e secretadas como pró-MMPs. O domínio pró-peptídeo, com cerca de 80 aminoácidos, tem uma única sequência altamente conservada, na qual a cisteína (Cys) coordena o domínio catalítico dependente de zinco para manter a latência (MANNELLO e MEDDA, 2012). São processadas por outras

enzimas proteolíticas, como proteases de serina, furina, plasmina e outras, para gerar as formas ativas, um processo que pode ocorrer na superfície da célula, mas normalmente ocorre extracelularmente por outras MMPs ativadas ou por proteínases de serina, que clivam o domínio pró-peptídeo (MANNELLO e MEDDA, 2012; ALAMEDDINE, 2012). Algumas MMPs têm sequências de reconhecimento de pró-proteína convertase tipo furina na sua estrutura no final do pró-domínio e podem ser ativadas intracelularmente, para serem segregadas na superfície celular na forma ativa ou exercer ação no interior da célula (ALAMEDDINE, 2012). Muitas MMPs são especificamente reguladas anível de expressão gênica, mas a sua produção como pró-enzimas inativas é um outro importante nível de regulação, além do controle da atividade pelas TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*) (ALAMEDDINE, 2012; MANNELLO e MEDDA, 2012). O equilíbrio entre essas formas de regulação da atividade das MMPs mantêm a homeostase da matriz (SNYMAN e NIESLER, 2015).

Em geral, as MMPs desempenham papel importante na proteólise construtiva da MEC, sendo responsáveis pela clivagem de componentes da matriz durante o desenvolvimento embrionário, a migração celular, a morfogênese e na remodelação do tecido. Porém, sabemos hoje que suas atividades não estão limitadas a degradação da matriz durante esses processos biológicos, podendo, a clivagem pelas MMPs, estar associada ao estímulo da proliferação celular, através da ativação de fatores de crescimento, como TGF- β , ou podem também regular negativamente vias de sinalização mitogênicas (MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001). Algumas atividades biológicas das MMPs podem agravar patologias, porém outras podem ser benéficas, possibilitando assim novos alvos terapêuticos para várias doenças.

Estudos têm demonstrado que as MMPs são mediadores da remodelação da MEC no músculo estriado. As MMPs 2, 9 e 14 têm implicação na homeostase muscular, auxiliando na atividade das CS após a injúria (MURRE, MCCAW, *et al.*, 1989). A MMP-14 (MT1-MMP) 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, WATARU 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 (OHTAKE, TOJO e SEIKI, 2006; SNYMAN e NIESLER, 2015), através da ativação da MMP-2, classificada como gelatinase, desempenhando papel importante na atrofia muscular (LIU, 2011).

A pró-MMP2 é ativada na superfície da célula através de formação do complexo trimolecular MMP14-TIMP2-pró-MMP2. Esse processo se dá, inicialmente, através da ligação de MT1-MMP ao domínio N-terminal da TIMP-2; em seguida, o domínio C-terminal da TIMP-2 atua como receptor para o domínio hemopexina C da pró-MMP2. Então, uma MT1-MMP adjacente, cliva e ativa a pró-MMP2 presa à TIMP-2. Após a clivagem inicial por MT1-MMP, o domínio pró-peptídeo da pró-MMP2 é removido por outra molécula de MMP-2, obtendo-se assim a forma ativa e madura da MMP-2 (ALAMEDDINE, 2012; SNYMAN e NIESLER, 2015).

Foi demonstrado que durante o envelhecimento há uma diminuição do número 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 indicaram ainda que, durante a cicatrização do músculo envelhecido, 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 relatado 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.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel das MMPs e das células satélites no músculo plantar, durante a sarcopenia.

2.2 Objetivos específicos

Analisar os seguintes parâmetros no músculo plantar de ratos envelhecidos:

- Atrofia muscular através da análise da expressão gênica dos atrogenes MAFbx e MURF-1.
- Potencial de proliferação das células satélites através da análise da MyoD e Pax7, por meio de expressão gênica (RT-qPCR) .
- Expressão gênica (RT-qPCR) das MMPs 2 e 14 e das isoformas I- α 1 e III do colágeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 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.

3.2 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 plantar (PL), que apresenta características glicolíticas e de rápida contração, sendo o mais acometido no envelhecimento, com atrofia principalmente das fibras tipo II, foi coletado, pesado e submetido à análise molecular. Além disso, foi utilizado o peso do músculo como parâmetro para avaliar o índice de atrofia e/ou hipertrofia muscular.

3.3 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, BENES, *et al.*, 2009).

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

Para a extração de RNA total, fragmentos do músculo PL 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 a partir da análise dos RNAs ribossômicos baseadas em microfluidos, utilizando-se o sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA) (Fleige & 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 esquelético com a adição de 2,5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNase OUT* (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). 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). Os valores de expressão gênica normalizados pelo genes endógenos PPIA, PPIB e GAPDH.

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_00119198.
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
MuRF1	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

3.5 Avaliação quantitativa da expressão proteica por Western Blot

Apesar da expressão proteica não estar nos objetivos do estudo, realizamos a análise por Western Blot das proteínas Pax7 e dos colágenos I- α e III, que apresentaram resultados de expressão gênica discrepantes comparados com a literatura. As amostras musculares congeladas foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) com 0,5 mL de tampão de lise (1% Triton X-100, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, aprotinina 10 μ g/mL, PMSF 1 mM, ortovanadato de sódio - Na₃VO₄ 0.25 mM, NaCl 150 mM e Tris-HCl 50 mM pH 7.5). As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 20 min e o sobrenadante coletado. Uma alíquota de 50 μ L do homogenato foi tratada com 25 μ L do tampão de amostra de Laemmli (SDS 2%, glycerol 20%, azul de bromofenol 0.04

mg/mL, Tris-HCl 0.12M pH 6.8 e β -mercaptoetanol 0.28M). As amostras foram incubadas a 97°C por 5 minutos e armazenadas em freezer -20°C até sua utilização.

Uma alíquota do extrato puro de cada amostra (não tratado com Laemmli) foi usada para quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford.

Quantidades exatas de proteínas totais de cada amostra (40 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para Pax7 e 10% para os colágenos (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences) em sistema úmido. Para garantir que a mesma quantidade de proteína foi aplicada, a membrana foi corada com *Ponceau S Protein Stain*.

As membranas foram então bloqueadas com solução de leite 5% diluída em tampão fosfato salino (TBS-T: Tris-HCl pH 8,0 1M, NaCl 2,15M, Tween-20 0,1% pH 7,4), por 1 hora, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários (Tabela II) diluídos em solução BSA 5%, overnight a 4°C, segundo as recomendações dos fabricantes. Após 3 etapas de lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários, conjugados com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP), por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas e foi utilizado o sistema de detecção quimioluminescente *ECL SelectTM Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante, para gerar um sinal na posição referente a cada proteína detectada.

O sinal gerado pelas bandas foi captado através do *Syngene G:BOX F3 Fluorescence Imaging System* e a quantificação feita por densitometria, utilizando-se o software *ImageJ software for Windows* (versão 1.71, 2006, Áustria). Os valores de expressão proteica foram normalizados pelo *Ponceau S Protein Stain*. Os valores de expressão relativa gerados foram apresentados como unidades arbitrárias.

Tabela II. Anticorpos utilizados e suas diluições.

Pax7	Santa cruz (81648) 1:200
Col I- α	Abcam (292) 1:1000
Col III	Abcam (6310) 1:1000

3.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados que obtiveram 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% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo fisiológico de perda da massa e da força muscular, relacionada com a idade, é denominado sarcopenia (MCKINNELL e RUDNICKI, 2004). Essa atrofia foi observada, em nossos animais, pela razão entre o peso muscular e o peso corporal, que demonstrou redução no peso do músculo PL (g) dos animais do grupo de 22 meses ($11,05 \pm 0,084$) comparado com os grupos de 3 e 12 meses ($0,0868 \pm 0,00733$; $0,0674 \pm 0,00476$, respectivamente), uma vez que o aumento da taxa de proteólise muscular é o principal evento desse processo (ARGILÉS, BUSQUETS, *et al.*, 2015).

A manutenção da massa muscular ocorre através do equilíbrio entre vias de anabolismo e catabolismo (MCKINNELL e RUDNICKI, 2004). Durante a atrofia, as vias do catabolismo são aceleradas, promovendo degradação das miofibrilas e de outras proteínas constituintes do sarcômero, sendo a perda de maquinaria contrátil responsável pela redução da força muscular (COHEN, NATHAN e GOLDBERG, 2015). A degradação das proteínas ocorre através do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) e do sistema autofagia, sendo a maioria das proteínas musculares degradadas pelo sistema UPS (BONALDO e SANDRI, 2013).

No nosso experimento, as ubiquitinas-ligases músculo específicas, atrogina-1/MAFbx e MuRF1, responsáveis por catalisar a degradação de proteínas envolvidas na síntese proteica (atrogina-1/MAFbx) e pela ubiquitinação e degradação dos componentes do sarcômero e citoesqueleto (MuRF1) (COHEN, NATHAN e GOLDBERG, 2015), foram analisadas. Trabalhos demonstram aumento nos níveis de expressão de mRNA dos atrogenes em diversos modelos de atrofia, tanto *in vitro*, como no tratamento de células C2C12 com TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), que mostram um aumento na expressão dos atrogenes após duas horas, semelhante ao tratamento com H₂O₂ (LI, CHEN, *et al.*, 2004); e *in vivo*, através da imobilização dos membros posteriores, onde ocorre aumento nos níveis de MAFbx e MuRF1 após 3 dias de recuperação (VECHETTI-JUNIOR, BERTAGLIA, *et al.*, 2015). No presente

estudo, embora a expressão gênica do MuRF1 não tenha apresentado diferença significativa nos grupos estudados (Fig.3B), houve aumento na expressão de mRNA de MAFbx nos grupos 12 e 22 meses comparado com o grupo de 3 meses (Fig. 3A), o que corrobora com os dados da massa muscular relativa, indicando a perda de massa muscular nos animais idosos. Rom *et al.* (2016), em sua revisão, indicam dados conflitantes sobre o envolvimento dos atrogenes na sarcopenia. Enquanto Clavel *et al.* (2006) demonstraram um declínio da massa muscular acompanhado pelo aumento de mRNA dos atrogenes MuRF1 e MAFbx, Altun *et al.* (2010) observaram aumento de proteínas poli-ubiquitinadas e da transcrição de MuRF1 em membros posteriores atrofiados de animais idosos. Essa divergência na literatura pode indicar que a degradação das miofibrilas pode ocorrer tanto pela ativação e ação de ambos os atrogenes como também por apenas uma das ubiquitinas-ligases músculo específicas, podendo ser MuRF1, segundo o estudo citado por Rom *et al.* (2016), ou atrogina-1, conforme encontrado em nosso trabalho.

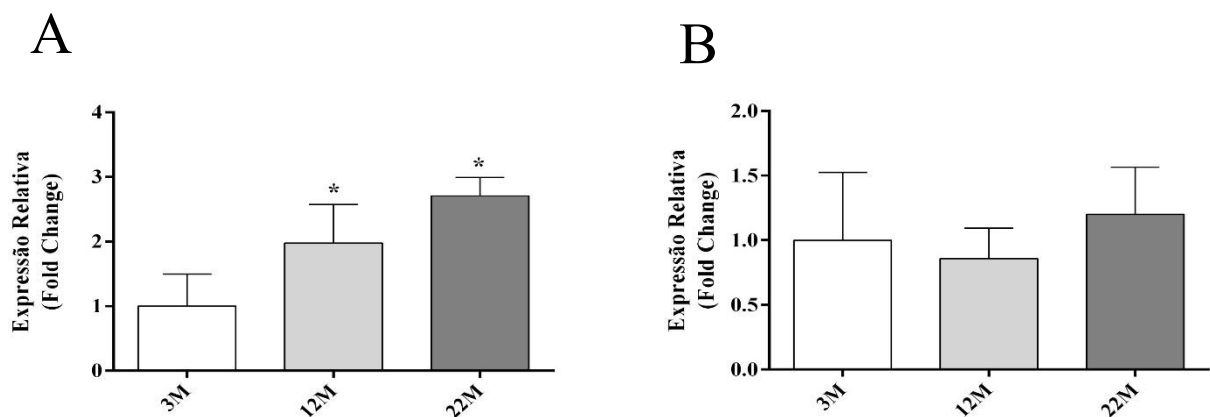


Figura 3. Quantificação do mRNA dos atrogenes envolvidos na degradação proteica no músculo plantar. **A)** MAFbx; **B)** MuRF1. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. 3M. ANOVA 1-way, com teste post-hoc Tukey.

Várias vias de sinalização podem estimular a transcrição de MAFbx e MuRF1, como a via do NF- κ B (*Nuclear Fator kappa b*) (MCKINNELL e RUDNICKI, 2004). Forman *et al.* (2016) mostraram a ativação de NF- κ B no envelhecimento, através do aumento da translocação dos membros p50, p52 e RelA (p65) da família do NF- κ B do citosol para o núcleo, em tecido cardíaco em camundongos SAMP8 (considerados idosos com aproximadamente 14 meses), fato que foi relacionado com o prejuízo da homeostase celular no envelhecimento. Além disso, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 (*Interleukin-1*), são responsáveis por estimular a via do NF- κ B (MICHAUD, BALARDY, *et*

al., 2013; SAKUMA, AOI e YAMAGUCHI, 2015) e como durante o envelhecimento ocorre aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes (MICHAUD, BALARDY, *et al.*, 2013) esses fatores podem contribuir para a ativação da transcrição dos atrogenes, e consequentemente o desenvolvimento da atrofia muscular no envelhecimento.

A regeneração muscular, no envelhecimento, é um processo ineficiente e multifatorial, que pode envolver a redução do número e do potencial proliferativo das CS, o encurtamento dos telômeros nas CS ou até uma redução da inervação do músculo (SHEFER, MARK, *et al.*, 2006; PALLAFACCHINA, BLAAUW e SCHIAFFINO, 2013; LACRAZ, ROULEAU, *et al.*, 2015; DOMINGUES-FARIA, VASON, *et al.*, 2016). Entretanto, diferente do que a literatura sugere para o envelhecimento, a análise do marcador miogênico Pax7, no nosso estudo, essencial para sustentar a renovação e regeneração celular (MALTZAHN, JONES, *et al.*, 2013), teve um aumento significativo na expressão de mRNA nos animais idosos (22M) quando comparados com as outras idades (3M e 12M) (Fig. 4A). Para compreender esse surpreendente resultado, realizamos a análise proteica, que não apresentou diferença entre os grupos, mas indicou uma semelhança de expressão dos animais idosos com os jovens (Fig. 4B). Em conjunto, os resultados para o marcador Pax7 demonstram que os níveis altos de mRNA não foram traduzidos em proteína, explicado pela regulação do processo de transcrição/tradução (YOSHIZAWA, ENDO, *et al.*, 1995). Esse aumento na expressão gênica do Pax7 com o avanço da idade sugere um possível mecanismo de ativação das poucas e quiescentes CS do músculo plantar envelhecido, assim como observado em outros estudos (HE, BERARDI, *et al.*, 2013; BRZESZCZYŃSKA, JOHNS, *et al.*, 2016). É possível que as CS, nessa condição (senilidade) em que ocorrem mudanças no seu microambiente, se tornam ativadas para tentar recuperar e/ou manter a massa muscular. Em sua revisão, Seale *et al.* (2000) mostram dados de expressão específica de Pax7 em células satélites quiescentes e ativadas (SEALE, SABOURIN, *et al.*, 2000).

Resultado semelhante foi observado por Brzeszczyńska *et al.* (2016), que sugerem um estímulo significativo da atividade regenerativa das CS através do aumento tanto de Pax7 como de Pax3 em idosos saudáveis. He *et al.* (2013), ao estudar a atrofia muscular associada ao câncer, também encontraram aumento desse fator de transcrição nas células satélites, sugerindo que a ativação das CS pelo Pax7 sofre desregulação pela via clássica do NF-κB, impedindo a regeneração muscular.

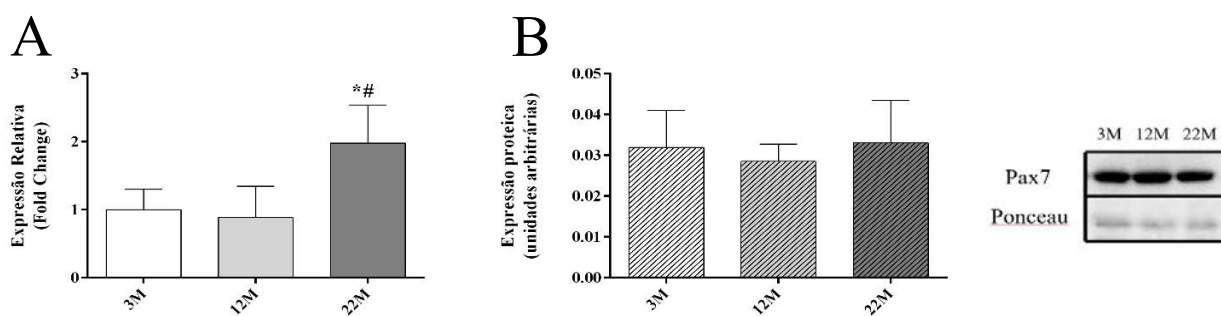


Figura 4. Quantificação do mRNA (A) e da proteína (B) do marcador miogênico Pax7 nos grupos 3M, 12M e 22M no músculo plantar. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. 3M; # $p < 0,05$ vs. 12M. Anova 1-way, com post-hoc Tukey.

O estudo de Brzezczynska *et al.* (2016) objetivou determinar, através do transcriptoma, a integridade do sistema de resposta ao estresse celular avaliando a diferenciação das CS e apoptose em idosos saudáveis e em pacientes caquéticos e não-caquéticos. Os autores evidenciaram que, nos pacientes caquéticos houve um bloqueio da maturação das CS, redução da defesa oxidativa e aumento da apoptose, enquanto que os idosos saudáveis mantiveram o potencial de diferenciação das CS e a defesa oxidativa, apontado pelo aumento dos marcadores de CS (Pax3 e Pax7), dos marcadores iniciais (MyoD e Myf5) e finais (MyoG) da miogênese, além do aumento da expressão de genes associados com a defesa oxidativa (SOD2, GCLM, and Nrf2). No nosso estudo, a análise da expressão do gene MyoD demonstrou uma diminuição na expressão nos animais com 22M (Fig.5), fato que pode estar relacionado com a diminuição da proliferação celular para a manutenção da massa muscular, contribuindo com a atrofia, embora observamos um aumento na expressão gênica do Pax7, sem alteração na expressão da proteína.

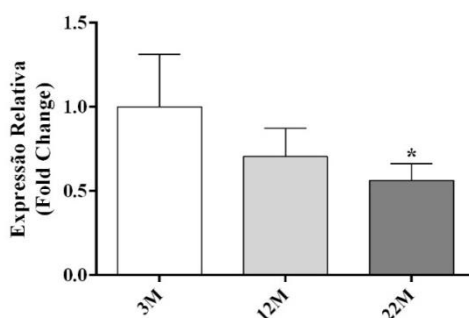


Figura 5. Quantificação do mRNA de MyoD no músculo plantar. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. 3M; # $p < 0,05$ vs. 12M. ANOVA 1-way, com teste post-hoc Tukey.

Alterações na matriz extracelular (MEC) do músculo esquelético também contribuem para a perda da massa muscular, além do desequilíbrio entre as vias de síntese e degradação proteica (Kragstrup, Kjaer e Mackey, 2011), o que acarreta em mudanças nas

propriedades mecânicas relacionadas com a força, culminando assim numa redução da força muscular na sarcopenia. Apesar de ainda existir divergência na literatura, grande parte dos estudos indicam aumento da deposição de colágeno no envelhecimento, aumentando consequentemente o tecido fibroso (LACRAZ, ROULEAU, *et al.*, 2015), tanto em humanos (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011) e em modelos animais (MAYS, MCANULTY, *et al.*, 1991; LACRAZ, ROULEAU, *et al.*, 2015). No nosso estudo, embora o principal componente estrutural do músculo esquelético mostrou uma redução na expressão gênica nos animais adultos (12M) e idosos (22M) para as duas isoformas analisadas, IaI e III (Fig. 6A e 7A, respectivamente), a expressão proteica de ambas isoformas não apresentou diferença significativa e, conforme Garg e Boppart (2016), com o avanço da idade a deposição de colágeno não ocorre por aumento das vias de síntese.

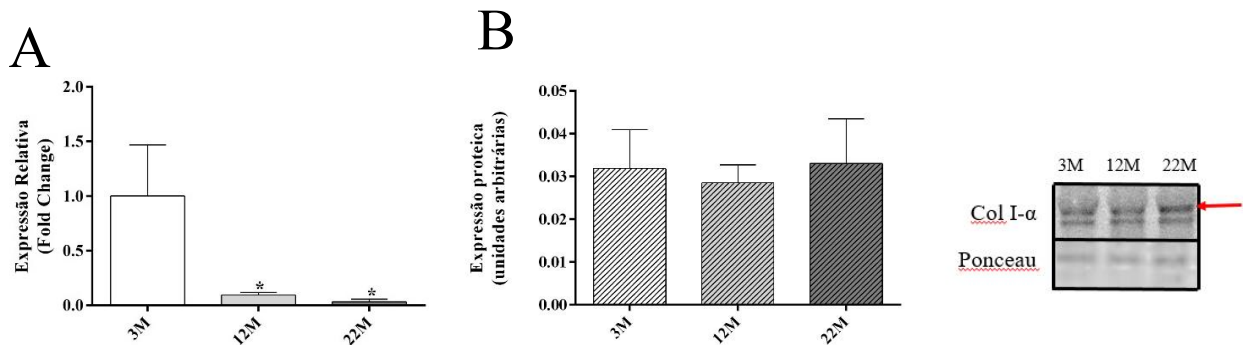


Figura 6. Quantificação do mRNA (A) e da proteína (B) do colágeno I-α no músculo plantar. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. 3M; ANOVA 1-way, com teste post-hoc Tukey.

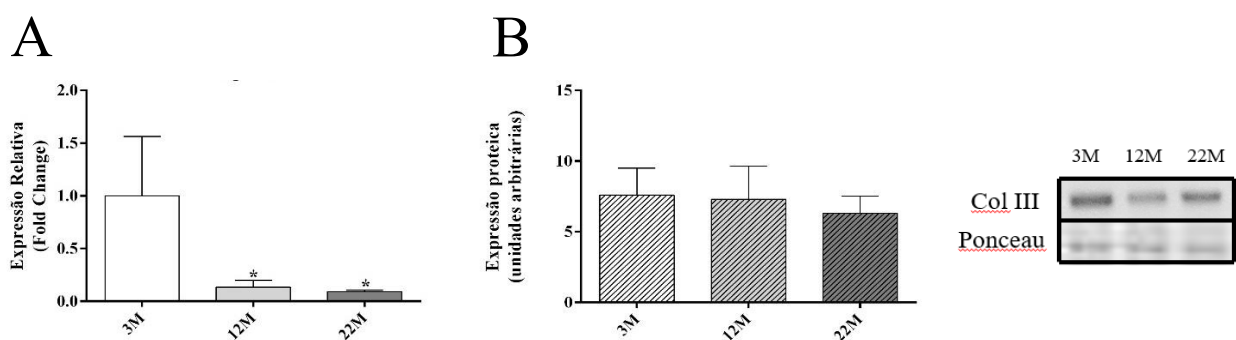


Figura 7. Quantificação do mRNA (A) e da proteína (B) do colágeno III no músculo plantar. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. 3M; ANOVA 1-way, com teste post-hoc Tukey.

O estudo de Koyal Garg (2016) indica que no envelhecimento pode ocorrer uma redução drástica na expressão de genes relacionados com a MEC, como do protocólágeno; sugerem que o acúmulo de colágeno ocorre mais por uma redução das vias de degradação do

que por um aumento das vias de síntese. (KRAGSTRUP, KJAER e MACKEY, 2011), sendo a deposição de tecido fibroso um determinante na eficiência da regeneração muscular (GARG e BOPPART, 2016). Esses achados corroboram os nossos resultados observados no músculo plantar de ratos senis, onde não houve diferença na expressão da proteína para os Colágeno I- α e III entre os grupos estudados.

De acordo com essa hipótese, as MMPs exibiriam uma expressão reduzida nos animais idosos (22M), uma vez que as metaloproteinases de matriz por desempenharem papel importante no *turnover* da MEC (SNYMAN e NIESLER, 2015) têm sua atividade controlada principalmente no nível de transcrição.

No nosso estudo, a MMP-14, uma collagenase, assim como a MMP-2, uma gelatinase, demonstraram redução nos níveis de mRNA no grupo de 22M, o que fornece suporte para a hipótese de que na senilidade o acúmulo de colágeno ocorre por redução das vias de degradação, sendo assim, pode ocorrer a diminuição da atividade das MMPs.

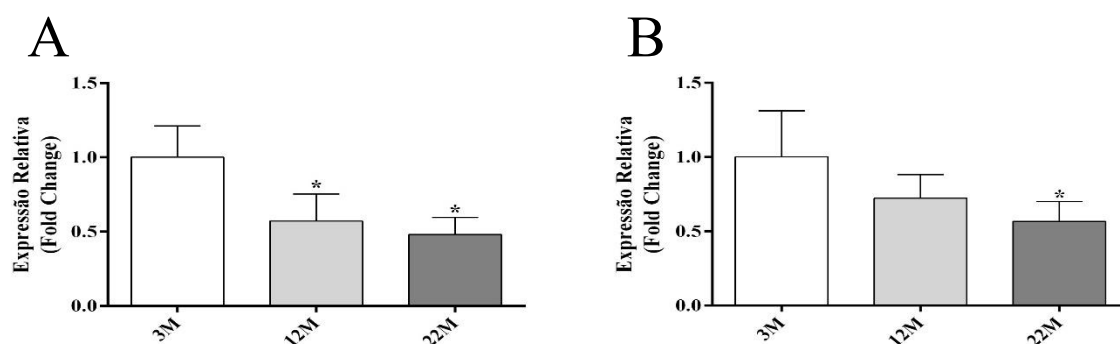


Figura 8. Quantificação de mRNA das metaloproteinases de matriz, 14 e 2 (A e B, respectivamente) no músculo plantar. Valores em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. 3M; ANOVA 1-way, com teste post-hoc Tukey.

Desta forma, podemos concluir que, durante o envelhecimento, ocorreu redução da síntese de colágeno, acompanhada pela redução das vias de síntese das MMPs e que a ativação das células satélites pelo aumento da expressão gênica de pax7 não foi capaz de atenuar nem recuperar a massa muscular. Sugerimos que a deposição de colágeno, decorrente da redução da degradação pelas MMPs, pode ter alterando o nicho favorável para a migração e proliferação das células satélites no músculo PL nos ratos envelhecidos. Entretanto, estudo adicionais são necessários para confirmar essa hipótese. Por exemplo, avaliação da atividade das MMPs, expressão proteica de todos os genes avaliados, análise e quantificação do colágeno.

5 REFERÊNCIAS

- ALAMEDDINE, H. S. Matrix metalloproteinases in skeletal muscles: Friends or foes? **Neurobiology of Disease**, p. 508-518, 2012.
- ALLEN, D. L. et al. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. **J Appl Physiol**, v. 78, p. 1969-1976, 1995.
- ALTUN, M. et al. Muscle Wasting in Aged, Sarcopenic Rats Is Associated With Enhanced Activity of the Ubiquitin Proteasome Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 39597-39608, 2010.
- ARGILÉS, J. M. et al. Cachexia and sarcopenia: mechanisms and potential. **Current Opinion of Pharmacology**, v. 22, p. 100-106, 2015.
- 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. et al. 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. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, p. 611-622, 2009.
- CARLSON, M. E. et al. 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.
- CAROSIO, S. et al. Impact of ageing on muscle cell regeneration. **Ageing Res Rev**, v. 10, p. 35-42, 2009. ISSN 1.
- CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICK, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, p. 209-238, 2004.
- CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, 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 Dev.**, v. 12, p. 211-239, 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.
- CLAVEL, S. et al. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. **Mechanisms of ageing and development**, v. 127, p. 794-801, 2006.
- COHEN, S.; NATHAN, J. A.; GOLDBERG, A. L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. **Nature**, v. 524, p. 58-74, 2015.

- CORNELISON, D. D. et al. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. **Dev Biol**, v. 224, p. 122-137, 2000.
- DOMINGUES-FARIA, C. et al. Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. **Ageing Research Reviews**, v. 26, p. 22-36, 2016.
- DUMONT, N. A. et al. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. **Compr Physiol**, v. 5, p. 1027-1059, 2015.
- FAN, D. et al. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 5, 2012. ISSN 15.
- FANJUL-FERNÁNDEZ, M. et al. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 3-19, 2010.
- 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. ISSN 3.
- 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.
- FORMAN, K. et al. Influence of aging and growth hormone on different members of the NFkB family and Ikb expression in the heart from a murine model of senescence-accelerated aging. **Experimental Gerontology**, v. 73, p. 114-120, 2016.
- GARG, K.; BOPPART, M. D. Influence of exercise and aging on extracellular matrix composition in the skeletal muscle stem cell niche. **J Appl Physiol**, 2016.
- GARGIOLI, C. et al. PIGFMMP-9-expressing cells restore microcirculation and efficacy of cell therapy in aged dystrophic muscle. **Nat Med**, v. 14, p. 973-978, 2009.
- GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and Fuction of the Sketal Muscle Extracellular Matrix. **Muscle Nerve**, v. 44, p. 318-331, 2011.
- GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 37, p. 1974-1984, 2005. ISSN 10.
- HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v. 9, p. 534-551, 2001.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kB. **Genes & Development** , v. 18, p. 2195-2224, 2004.
- HE, W. A. et al. NF-kB-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. **Int J Sports Med**, v. 7, p. 187-204, 1986. ISSN 4.
- HUGHES, S. M. et al. 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. Tecido Muscular. In: _____ **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 183-203.

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.; MACKEY, A. L. Structural, biochemical, cellular and functional changes in skeletal muscle extracellular matrix with agig. **Scand J Med Sci Sports**, v. 21, p. 749-757, 2011.

LACRAZ, G. et al. Increased Stiffness in Aged Skeletal Muscle Impairs Muscle Progenitor Cell Proliferative Activity. **Plos One**, v. 10, p. 1-13, 2015.

LI, Y.-P. et al. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. **FASEB**, v. 19, p. 362-370, 2004.

LIU, X. Emerging Ideas: Matrix Metalloproteinase-2 in Muscle Atrophy. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, p. 1797-1799, 2011.

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.

MAGAUDDA, L. et al. Effects of physical exercises on skeletal muscle fiber: ultrastructural and molecular aspects. **Basic Apply Myol**, v. 14, p. 17-21, 2004. ISSN 1.

MALTZAHN, J. V. et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. **PNAS**, v. 10, p. 16474-16479, 2013.

MANNELLO, ; MEDDA, V. Nuclear localization of Matrix metalloproteinases. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, p. 27-58, 2012.

MAYS, P. K. et al. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. **Biochem. J.**, v. 276, p. 307-313, 1991.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Cell Biology**, p. 534-540, 2001.

MCKINNELL, I. W.; RUDNICKI, M. A. Molecular Mechanisms of Muscle Atrophy. **Cell Press**, v. 119, p. 907-910, 2004.

MEGENEY, 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. et al. Isolation and characterization of canine satellite cells. **Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 38, p. 467-480, 2002.

MICHAUD, M. et al. 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. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. **Front Cell Dev Biol**, v. 1, 2014. ISSN 2.
- MOURKIOTI, F.; ROSENTHAL, N. NF- κ B signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. **J Mol Med**, v. 86, p. 747-759, 2008.
- MURRE, C. et al. 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**, v. 119, p. 3822-2832, 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. et al. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance trained young and older men and women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, p. 937-946, 2006.
- PETRELLA, J. K. et al. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in human is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. **J Appl Physiol**, v. 104, p. 1736-1742, 2008.
- PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**, v. 50, p. 500-509, 2000.
- ROM, O.; REZNICK, A. Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 218-230, 2016.
- 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.
- SAINI, J. et al. Regenerative function of immune system: Modulation of muscle stem cells. **Ageing Research Reviews**, v. 27, p. 67-75, 2016.
- SAKUMA, K.; AOI, W.; YAMAGUCHI, A. Current understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. **Eur J Physiol**, v. 467, p. 213-229, 2015.
- SAKUMA, K.; WATARU, A.; YAMAGUCHI, A. Current understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. **Pflugers Arch**, 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. et al. 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 potencial as a function of age. **Mechanism of Aging 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. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, v. 102, p. 962-966, 2000.
- 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. et al. Satellite-cell pool size does matter: Defining the myogenic potency og aging skeletal muscle. **Developmental Biology**, v. 294, p. 50-66, 2006.
- SNYMAN, C.; NIESLER, C. U. MMP-14 in skeletal msucle repair. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 36, p. 215-225, 2015.
- VECHETTI-JUNIOR, I. et al. Aerobic Exercise Recovers Disuse-induced Atrophy Through the Stimulus of the LRP130/PGC-1 α Complex in Aged Rats. **Journals of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 00, p. 1-9, 2015.
- VECHETTI-JUNIOR, I. J. **Respostas morfológicas e moleculares do músculo esquelético de ratos idosos submetidos ao treinamento físico após estímulo atrófico**. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, p. 92f. 2015.
- VOYTIK, S. L. et al. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscle. **Dev Dynam**, v. 198, p. 214-224, 1993.
- YAFFE, D.; SAXEL, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. **Nature**, v. 210, p. 725-727, 1977.
- YOSHIZAWA, F. et al. Translational regulation of protein synthesis in the liver and skeletal muscle muscle of mice in response to refeeding. **Nutritional Biochemistry** , v. 6, p. 130-136, 1995.