

TÁBATA LEAL NASCIMENTO

Influência das proteínas de choque térmico na resposta regenerativa de músculos esqueléticos de camundongos idosos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2018

TÁBATA LEAL NASCIMENTO

**Influência das proteínas de choque térmico na resposta
regenerativa de músculos esqueléticos de camundongos
idosos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Professora Dra. Elen Haruka Miyabara

Versão corrigida

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nascimento, Tábata Leal
Influência das proteínas de choque térmico na
resposta regenerativa de músculos esqueléticos de
camundongos idosos. / Tábata Leal Nascimento;
orientadora Elen Haruka Miyabara . -- São Paulo,
2018.
120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Músculo esquelético. 2. Regeneração. 3.
Proteínas do choque térmico. 4. Envelhecimento. 5.
Diferenciação muscular. I. Miyabara , Elen Haruka ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Tábata Leal Nascimento

Titulo da Tese: Influência das proteínas de choque térmico na resposta regenerativa de músculos esqueléticos de camundongos idosos.

Orientador: Elen Haruka Miyabara

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a _____/_____/_____, considerou o candidato:

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **043** nas fls. **05** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Elen Haruka Miyabara**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*A influência das proteínas do choque térmico(HSPs) na regeneração muscular esquelética*" do qual participam o(s) aluno(s), **Marcelo Gomes Pereiras, Tabata Leal Nascimento**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **23.04.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 25 de abril de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA FIGUEIRA
Secretária- CEUA - ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Influência da proteína de choque térmico 70 e do adrenoceptor beta 2 na regeneração muscular esquelética*", registrado sob o protocolo nº **106/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **02/10/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Elen Haruka Miyabara**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Tatiana Emy Koike (Pós-graduando), Tabata Leal Nascimento (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Influence of the heat shock protein 70 and the beta 2 adrenoceptor in skeletal muscle regeneration*", protocol nº **106/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/2/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Elen Haruka Miyabara**

- Team members: *Tatiana Emy Koike (Graduate Student), Tabata Leal Nascimento (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Friend virus B</i>	<i>Macho/male</i>	<i>2 meses/months</i>	<i>90</i>
	<i>b2 knockout</i>	<i>Macho/male</i>	<i>2 meses/months</i>	<i>90</i>
	<i>CB6F1</i>	<i>Macho/male</i>	<i>2 meses/months</i>	<i>50</i>
	<i>Hiperexpressante de HSP70</i>	<i>Macho/male</i>	<i>2 meses/months</i>	<i>50</i>
	<i>CB6F1</i>	<i>Macho/male</i>	<i>24 meses/months</i>	<i>40</i>
	<i>Hiperexpressante de HSP70</i>	<i>Macho/male</i>	<i>24 meses/months</i>	<i>40</i>

São Paulo, 18 de outubro de 2017.

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

À minha amada vó, *in memoriam*, e à minha linda mãe,
pelo incentivo, amor e cuidado de sempre,
minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo infinito cuidado, saúde e força para correr atrás dos meus sonhos.

À minha orientadora, Elen Haruka Miyabara, por me receber em seu laboratório e por oferecer a oportunidade de crescimento profissional e pessoal ao longo destes oito anos trabalhando juntas.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho que estiveram comigo durante todo ou parte do meu doutorado, Marcelo P. Gomes, Gislaine S. Santos, Aline dos S. Negromonte, Janis M. Ferreira, Mateus Aurichio, Tatiana Koike, Bianca Baggio e em especial para minha companheira de todas as horas Meiricris T. da Silva. Obrigada não só pela oportunidade de aprender e ensinar, mas também pela amizade, vocês fizeram meus dias de trabalho muito mais alegres.

Ao professor Imed E. Gallouzi por ter me recebido em seu laboratório na McGill University em Montreal e permitido fazer parte de seu grupo, que me ensinou tanto, não só sobre ciência, mas sobre a vida. Obrigada, Sergio Di Marco, Xian J. Lian, Souad Mubaid, Anne-Marie Tremblay, Jason Sadek, Amr Omer, Jennifer Ma, Derek Hall, Brenda J. Sanchez, Kholoud Ashour e Christopher V. Roretz. Serei eternamente grata por esse grupo que foi minha família canadense.

À Talita C. Conte e Adalberto Resende pela amizade, carinho, apoio e cuidado durante toda minha estadia em Montreal, Canadá, para estágio na McGill University. Nunca poderei retribuir tudo que fizeram por mim.

Às minhas colaboradoras Gabriela P. Diniz e Elaine C. Guedes pelo apoio e paciência com os experimentos de miRNAs.

Ao Andrei Rozanski pela ajuda na análise de sequenciamento de miRNA.

Ao professor Anselmo S. Moriscot e todo o seu grupo, William J. da Silva, André Cruz, João G. Silvestre, Mirela Bento, Flávia Graça, Marcos Esteca e Igor Baptista. Obrigada não só por deixar o laboratório de vocês sempre à disposição, mas também pelo apoio científico, toda amizade e bate papo com café.

Obrigada a professora Maria Luiza B. De Chaves e ao professor Jackson Bitercourt por deixarem os seus laboratórios sempre à disposição.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Anatomia que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento do meu trabalho ao longo desses anos, em especial a Patrícia R. C., Renivaldo Souza e Rosana Prisco.

Ao Fernando Pretel pela ajuda com os experimentos de *cell sorting* no CEFAP/ICB.

A todos meus amigos do departamento, que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, ou simplesmente por aquele almoço animado no bandeijão, ou pelas boas risadas no corredor do departamento, vou levar esses momentos para sempre comigo. Agradeço em especial para Marília Teixeira, Gisele Miyamura, Manuela Miranda e Bianca Papi, obrigada por tudo meninas!

Ao meu querido amigo Diego P. Cury, pela amizade que levarei para sempre comigo. Obrigada por sempre me ouvir pacientemente em qualquer situação.

A toda a minha família, em especial minha mãe, pelo amor e apoio incondicional sem o qual a realização desse doutorado não seria possível. Vocês foram essenciais nessa conquista.

Ao meu amado Salathiel Dias, cujo amor, suporte e companherismo tornaram os dias difíceis mais fáceis.

Aos meus amigos que estiveram sempre ao meu lado comemorando cada conquista e consolando nas dificuldades, em especial as minhas amadas amigas, Sarah Boscov, Samantha Tortora, Mariana Aguilera, Aline Satelos, Maria Leite, Lucila Hernandez e minha irmã e amiga Andressa Leal. Não tenho palavras para agradecer o apoio de sempre.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (FAPESP; Doutorado Processo 2013/04783-0; Bolsa BEPE Processo 2016/22802-0).

**“Toda nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa
mais preciosa que temos”. (Albert Eistein)**

RESUMO

NASCIMENTO, T.L. **Influência das proteínas de choque térmico na resposta regenerativa de músculos esqueléticos de camundongos idosos.** 2018. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Considerando-se que o papel das proteínas de choque térmico (HSPs) na melhoria da resposta regenerativa da musculatura esquelética de camundongos idosos ainda não é bem conhecido, e que o tratamento com O-(3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl) nicotinic amidoxime (BGP-15), um indutor de HSPs, atenua a fibrose muscular em animais com Distrofia de Duchenne, a hiperexpressão de HSPs no músculo esquelético através do tratamento com BGP-15 e do uso de camundongos transgênicos que hiperexpressam a proteína de choque térmico 70 kDa induzível (HSP70) poderia melhorar o processo regenerativo muscular por meio da atenuação da fibrose do tecido muscular em regeneração de animais idosos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência das HSPs na resposta regenerativa muscular em camundongos idosos através da análise dos efeitos do tratamento com o fármaco BGP-15 e da hiperexpressão da HSP70 induzida por transgenia em aspectos estruturais, celulares, moleculares e funcionais. Em 10 dias após a criolesão de músculos *tibialis anterior* (TA), o tratamento com BGP-15 (15 mg/kg) atenuou a sarcopenia e a redução do tamanho das fibras musculares em regeneração de camundongos idosos, e induziu a recuperação da densidade de área do tecido conjuntivo em músculos não lesados de camundongos idosos, e da expressão de FGF em músculos lesados de camundongos idosos. Além disso, o BGP-15 proporcionou atenuação da queda da força do músculo *extensor digitorum longus* em regeneração (EDL) após lesão em camundongos jovens. Além do efeito benéfico do BGP-15 em atenuar a sarcopenia, este fármaco (1 μ M) também atenuou a perda de miotubos C2C12 expostos às citocinas inflamatórias interferon- γ e TNF- α . Houve prevenção do déficit na diferenciação inicial e tardia de mioblastos oriundos de animais idosos que hiperexpressam HSP70. Em paralelo, verificamos que o silenciamento de HSP70 em mioblastos C2C12 acarreta na redução da expressão do gene MyoD e do miR-326 no início do processo de diferenciação muscular. Portanto, nossos resultados demonstram que a hiperexpressão de HSPs, induzida por BGP-15, melhora a regeneração muscular em camundongos idosos, pois acelera a recuperação do tamanho da fibra muscular em regeneração. Experimentos *in vitro* sugerem que esse efeito é mediado pela atenuação do déficit na diferenciação de células precursoras miogênicas. Paralelamente, este trabalho demonstra que a HSP70 participa do início da diferenciação muscular por meio de mecanismo envolvendo MyoD e o miR-326. Além do efeito benéfico do

indutor de HSPs, BGP-15, sobre a regeneração muscular de animais idosos, este atenuou a sarcopenia e a perda de miotubos expostos ao modelo de atrofia muscular *in vitro* induzido por interferon- γ e TNF- α . Este último efeito é mediado pela redução na expressão de Atrogin-1.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Regeneração. Proteínas do choque térmico. Envelhecimento. Diferenciação muscular.

ABSTRACT

NASCIMENTO, T.L. **Influence of heat shock proteins on skeletal muscle regeneration of old mice.** 2018. 120 f. Thesis (Ph. D. In Morphological Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Considering that the role of heat shock proteins (HSPs) on the skeletal muscle regenerative response of aged mice is still not well known, and that the treatment with O- (3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl) nicotinic amidoxime (BGP-15), an HSP inducer, attenuates muscle fibrosis in animals with Duchenne Muscular Dystrophy; the overexpression of HSPs in skeletal muscle induced by BGP-15 treatment and the use of inducible 70 kDa heat shock protein (HSP70) overexpressing transgenic mice could improve the muscle regenerative process through attenuation of fibrosis of regenerating muscle tissue in old mice. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of HSPs on muscle regenerative response in aged mice by analyzing the effects of BGP-15 treatment and HSP70 overexpression induced by transgenesis in structural, cellular, molecular and functional aspects of regenerating muscles from aged mice. At 10 days after cryolesion of the *tibialis anterior* (TA), BGP-15 treatment (15 mg / kg) attenuated sarcopenia, reduced the cross sectional area of regenerating myofiber from aged mice and recovered the connective tissue density and the expression of FGF in injured muscles from aged mice. Moreover, BGP-15 attenuated the force decrease in *extensor digitorum longus* (EDL) after injury in young mice. In addition to the beneficial effect of BGP-15 on attenuation of sarcopenia, this drug (1 μ M) also attenuated the loss of C2C12 myotubes exposed to the inflammatory cytokines interferon- γ and TNF- α . There was a prevention of the deficit in the initial and late differentiation of myoblasts from aged animals that overexpress HSP70. In parallel, we observed that the silencing of HSP70 in C2C12 myoblasts reduced the gene expression of MyoD and miR-326 at the beginning of the muscle differentiation process. Therefore, our results suggest that the overexpression of HSPs improves muscle regeneration in aged mice, since it accelerates the size recovery of regenerating myofibers. This effect is mediated by the attenuation of the deficit in the differentiation of myogenic precursor cells. In parallel, we demonstrated that HSP70 participates in the beginning of muscle differentiation probably through a mechanism mediated by MyoD and miR-326. In addition to the beneficial effect of the HSP inducer BGP-15 on muscle regeneration of aged animals, it attenuated sarcopenia and loss of myotubes exposed to interferon- γ and TNF- α . This latter effect is mediated by the reduction of Atrogin-1 expression.

Keywords: Skeletal muscle. Regeneration. Heat shock proteins. Aging. Muscle differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Participação das Célula Satélite no processo de regeneração muscular; b) Processo de ativação, proliferação e diferenciação de Célula Satélite.	29
Figura 2. Mecanismo de ação do fármaco BGP-15.	34
Figura 3. Biogênese do miRNA e mecanismo de ação.	37
Figura 4. Western blot para as proteínas fosforiladas Akt, Smad 2 e Smad 3	43
Figura 5. a) Curva de concentração após 30 minutos de tratamento com BGP-15; b) Curva tempo-resposta de hiperexpressão da proteína HSP70	50
Figura 6. Desenho experimental de experimentos com IT.	50
Figura 7. Padrão de separação das células satélite por meio de FACS.	54
Figura 8. Desenho experimental.	59
Figura 9. Expressão da proteína HSP70 em músculos TA	64
Figura 10. Fotomicrografias de secções transversais dos músculos TA corados com HE	65
Figura 11. Área de secção transversal (AST) das fibras dos músculos TA	67
Figura 12. Frequência de distribuição da área de secção transversal (AST) das fibras dos músculos TA	68
Figura 13. Fotomicrografias de secções transversais dos músculos TA corados com Sirius Red	69
Figura 14. Porcentagem da densidade de área do tecido conjuntivo de músculos TA	69
Figura 15. Expressão gênica do colágeno I.	70
Figura 16. Expressão gênica do colágeno III	71
Figura 17. Expressão da proteína FGF	72
Figura 18. Expressão gênica do TNF- α	73
Figura 19. Força de contração tetânica máxima (mN) do músculo EDL isolado.	74
Figura 20. Força específica do músculo EDL isolado	75
Figura 21. Expressão de HSP70	76
Figura 22. Fotomicrografias de mioblastos C2C12 em diferenciação	77
Figura 23. Imunofluorescência de miotubos no sexto dia em meio de diferenciação.	78
Figura 24. Espessura de miotubos no sexto dia em meio de diferenciação	79
Figura 25. Número de miotubos por campo no sexto dia em meio de diferenciação	79
Figura 26. Expressão gênica de Murf-1	80
Figura 27. Expressão proteica de Murf-1.	81

Figura 28. Expressão gênica de Atrogin-1	82
Figura 29. Expressão proteica de Atrogin-1	83
Figura 30. Expressão de proteínas ubiquitinadas n.....	84
Figura 31. Expressão de p65	85
Figura 32. Expressão gênica de FoxO3	85
Figura 33. Avaliação da proliferação das células satélite isoladas de animais selvagens (WT) e transgênicos hiperepressantes de HSP70 (HSP).	86
Figura 34. Células precursoras miogênicas oriundas de animais selvagens (WT) e de transgênicos hiperepressantes de HSP70.	88
Figura 35. Porcentagem de células precursoras miogênicas em meio de diferenciação por 24 horas marcadas com miogenina.....	89
Figura 36. Fusão de mioblastos em meio de diferenciação por 3 dias.	90
Figura 37. Índice de fusão de mioblastos em meio de diferenciação por 3 dias.	91
Figura 38. Expressão gênica de HSP70	92
Figura 39. Expressão proteica de HSP70.....	93
Figura 40. Imagens de mioblastos C2C12 em meio de diferenciação.	94
Figura 41. Expressão gênica de MyoD	95
Figura 42. Expressão gênica de Miogenina	96
Figura 43. Imunofluorescência de miotubos no quarto dia em meio de diferenciação.	97
Figura 44. Índice de fusão de células C2C12 após transfecção	97
Figura 45. Expressão do miRNA-326.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Grupos experimentais:	42
Quadro 2. Sequência de primers utilizados nos experimentos <i>in vivo</i>	46
Quadro 3. Grupos experimentais:	49
Quadro 4. Sequência dos primers usados nos experimentos com IT.....	52
Quadro 5. Sequência dos primers utilizados no experimento de transfecção.	60
Quadro 6. Sequência dos primers para análise da expressão do miR-326.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa Muscular	65
--------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT - Proteína kinase B

ALK – *activin-receptor like kinases*

ANOVA – Análise de Variância

AST – Área de Secção Transversal

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

BGP-15 – *O- (3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl) nicotinic amidoxime*

BMPs – *bone morphogenic proteins*

BSA – albumina de soro bovino

CaCl₂.2H₂O – Cloreto de cálcio dihidratado

CB6F1 - Camundongos provenientes do cruzamento entre C57bl/6 e balb/c

cDNA - fita de DNA complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CO₂ – Dióxido de carbono

DS – Donkey Serum

Ct – *Cycle threshold*

CTX – Crotoxina

C2C12- linhagem celular imortalizada de mioblastos

Dicer- enzima nuclear que cliva moléculas de RNA dupla fita

DGCR8 - *DiGeorge Syndrome critical region 8 gene*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP mix – solução contendo os quatro nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Drosha – enzima ribonuclease III

DTT – Ditioneitol

ECL - *Enhanced Chemiluminescence*

ECM – *Extra Cellular Matriz*

EDL - *Extensor Digitorum Longus*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EdU - 5-ethynyl-2-deoxyuridine
EGTA - *Ethylene glycol tetraacetic acid*
FGF - *Fibroblast growth factor*
FOXO - Fator de transcrição *forkhead box O*
GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GDFs - *Growth differentiation factors*
GTP - Guanosina trifosfato
Hams-F10 – Meio nutritivo sem proteínas e fatores de crescimento
HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
HSE- Heat Shock Element
HSF – Heat Shock Factor
HSP – Heat Shock Proteins
HSP1a1 – gene codificante de HSP70 induzível
IGF - *Insulin-like growth factor*
IKK - inibidor de kb kinase
IL-6 – *Interleukin-6*
IT – Interferon- γ e TNF- α
JNK - c-jun amino terminal kinase
KCl – Cloreto de Potássio
KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio Monobásico
miR- micro RNA
miRNA - micro RNA
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MgSO₄ - Sulfato de Magnésio
MRF-4 - *Myogenic regulatory factor-4*
mRNA - RNA mensageiro
mTOR - *Mammalian target of rapamycin*
Murf-1 - *muscle ring finger – 1*
Myf-5 – *Myogenic factor 5*
MyHC – *Myosin Heavy Chain*
MyHCn - *neonatal Myosin Heavy Chain*
Myo-D - *Myogenic determination factor*

NaCl- Cloreto de Sódio
NaF – Fluoreto de Sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ncRNA – *non coding RNA*
O₂ – Oxigênio
PAI-1 - *Plasminogen activator inhibitor-1*
Pax7 - *Paired box protein 7*
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
PCR - *Polymerase chain reaction*
PFA - Paraformaldeído
PI3K - *Phosphatidylinositide 3-kinases*
PIP2 - *Phospholipid phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*
PIP3 - *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*
piRNA – RNAs de interação Piwi
PMSF - *phenylmethylsulfonyl fluoride*
pre-miRNA – microRNA precursor
pri-miRNA – microRNA primitivo
Rac-1 – *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
Ran-GTP – pequena GTPase
Risc - *RNA- induced silencing complex*
RNA - Ácido ribonucleico
RNAseq - *RNA sequencing*
RT- *Reverse transcription*
RT-PCR – Reação de Transcrição Reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS - *sodium dodecyl sulfate*
Ser – Serina
siCTR - siRNA controle
siHSP70 – siRNA HSP70
siRNA – *small interfering RNA*
TA – *Tibialis Anterior*
TBS-T – *Tris buffered saline-Tween-20*
TFIID - *Trasncription factor IID*

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

Thr – *Treonina*

TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*

17-AAG – *geldanamycin derivative 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin*

Δ Ct- *Delta Cycle threshold*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Características gerais do músculo esquelético	24
1.2 Regeneração do músculo esquelético	27
1.3 Resposta regenerativa muscular no idoso	29
1.4 Proteínas de choque térmico	33
1.5 microRNAs no músculo esquelético	36
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Experimentos in vivo	41
4.1.1 Grupos experimentais.....	41
4.1.2 Criolesão.....	42
4.1.3 Tratamento com BGP-15.....	42
4.1.4 Coleta das amostras.....	43
4.1.5 Western blot.....	43
4.1.6 Análises histológicas.....	44
4.1.7 Reação de Transcrição Reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase.....	45
4.1.8 Contração muscular ex vivo.....	47
4.2 Experimentos in vitro	48
4.2.1 Mioblastos da linhagem C2C12.....	48
4.2.1.1 Experimentos com Interferon- γ e TNF - α (IT).....	49
4.2.1.1.1 Grupos experimentais.....	49
4.2.1.1.2 Tratamentos.....	49
4.2.1.2 Imunofluorescência.....	51
4.2.1.3 RT-PCR.....	51
4.2.1.4 Western blot.....	52
4.2.2 Células satélite.....	53
4.2.2.1 Grupos experimentais.....	53
4.2.2.2 Separação das células satélite por cell sorting.....	53
4.2.2.3 Avaliação da proliferação celular.....	55
4.2.2.4 Avaliação da diferenciação muscular inicial.....	55
4.2.2.5 Avaliação da diferenciação muscular tardia.....	55
4.2.2.6 Imunocitoquímica.....	56
4.2.3 Sequenciamento de miRNAs.....	56
4.2.3.1 Isolamento de mioblastos.....	56
4.2.3.2 Diferenciação de mioblastos.....	57
4.2.3.3 Isolamento do RNA total.....	57

4.2.3.4	Análise dos dados de sequenciamento – RNASeq.....	58
4.2.4	<i>Silenciamento de HSP70 em mioblastos C2C12</i>	58
4.2.4.1	Transfecção em mioblastos C2C12.....	58
4.2.4.2	Western blot.....	59
4.2.4.3	Imunofluorescência.....	59
4.2.4.4	RT - PCR.....	60
4.2.4.5	Expressão de miRNA - RT-PCR.....	61
4.3	Análise estatística	62
5	RESULTADOS	63
5.1	Experimentos <i>in vivo</i>	63
5.1.1	<i>Expressão da Proteína de choque térmico 70 induzível (HSP70)</i>	63
5.1.2	<i>Massa muscular</i>	64
5.1.3	<i>Análises morfológicas</i>	65
5.1.4	<i>Análise do tecido conjuntivo</i>	68
5.1.5	<i>Expressão gênica de Colágeno I, III e expressão proteica de FGF</i>	70
5.1.6	<i>Expressão gênica de TNF- α</i>	72
5.1.7	<i>Análise funcional contrátil</i>	73
5.2	Experimentos <i>in vitro</i>	75
5.2.1	<i>Experimentos envolvendo tratamento com IT</i>	75
5.2.1.1	<i>Expressão da proteína de choque térmico 70 induzível (HSP70)</i>	75
5.2.1.2	<i>Aspectos morfológicos de mioblastos C2C12 em diferenciação</i>	76
5.2.1.3	<i>Expressão de componentes envolvidos com o Sistema Ubiquitina-proteassomo</i>	80
5.2.1.3.1	Murf-1.....	80
5.2.1.3.2	Atrogin-1.....	81
5.2.1.3.3	Proteínas Ubiquitinadas.....	83
5.2.1.3.4	p65.....	84
5.2.1.3.5	FoxO3.....	85
5.2.2	<i>Efeito da hiperexpressão de HSP70 na função das células satélite</i>	86
5.2.2.1	<i>Proliferação de células satélite</i>	86
5.2.2.2	<i>Diferenciação muscular</i>	87
5.2.3	<i>Silenciamento de HSP70 em mioblastos C2C12 em diferenciação</i>	92
5.2.3.1	<i>Expressão de HSP70</i>	92
5.2.3.2	<i>Aspectos morfológicos de mioblastos C2C12 em diferenciação</i>	93
5.2.3.3	<i>Diferenciação muscular de mioblastos C2C12 transfectados com siRNA</i>	94
5.2.3.4	<i>Expressão do miR-326 em mioblastos em diferenciação transfectados</i>	98
6	DISCUSSÃO	99
7	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110

1. INTRODUÇÃO

A regeneração muscular esquelética é essencial para a manutenção da integridade muscular e em indivíduos idosos tem sido mostrado que a resposta regenerativa está deprimida (Barber et al., 2015; Grounds, 1998; Welle, 2002). Inicialmente cabe uma breve introdução sobre as características gerais do músculo esquelético e sobre o processo de regeneração muscular esquelética, para posteriormente entendermos as principais modificações estruturais desse processo durante o envelhecimento.

1.1 Características gerais do músculo esquelético

O músculo esquelético é o órgão mais abundante do corpo humano (Grefte et al., 2007; Karagounis, Hawley, 2010), sendo um dos componentes do aparelho locomotor, e tem como função principal a sustentação e movimentação coordenada do corpo. O músculo esquelético é composto por células longas, poligonais e multinucleadas denominadas de fibras musculares, as quais apresentam núcleos periféricos (Bassel-Duby, 2006; Junqueira, 2008; Lieber, 2002; Ten Broek, 2010).

Além das fibras musculares, o tecido muscular esquelético também é composto por tecido conjuntivo, tecido nervoso e vasos sanguíneos (Powers, Howley, 2005). O músculo esquelético é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo chamada de epimísio. Do epimísio partem finas camadas de tecido conjuntivo delimitando as fibras musculares em feixes, os fascículos musculares, esta camada é denominada perimísio. Além disso, cada fibra muscular é envolvida pelo tecido conjuntivo denominado endomísio. O tecido conjuntivo mantém unidas as fibras musculares, permitindo que a contração gerada por cada fibra muscular ocorra de forma homogênea e seja transmitida para os tendões e ossos, além de alocar uma extensa rede de capilares sanguíneos entre as fibras musculares e permitir a ligação de nervos às mesmas (Charge, 2004; Grefte, 2007; Jarvinen, 2005; Junqueira, Carneiro., 2008).

As fibras musculares são compostas por miofibrilas que são estruturas cilíndricas com cerca de 1 a 2 μm de diâmetro, que contêm miofilamentos proteicos, e ficam paralelas ao eixo maior da fibra muscular. São as miofibrilas que garantem o padrão de estriamento devido à presença de faixas claras e escuras, que se alternam por toda a extensão da fibra muscular

(Tajsharghi, 2008). As faixas claras são denominadas de bandas I, isotrópicas, enquanto as escuras denominam-se bandas A, anisotrópicas (Junqueira, Carneiro., 2008; Lieber, 2002; MacIntosh, 2006). No centro de cada banda A, há uma banda H e no centro de cada banda I, existe uma linha transversal escura, chamada de linha Z (Junqueira, Carneiro., 2008; Lieber, 2002; MacIntosh, 2006). A região entre duas linhas Z é nomeada sarcômero, que é a unidade funcional contrátil do músculo esquelético (Lieber, 2002; Tajsharghi, 2008). A faixa clara é composta principalmente por miofilamentos finos, e a faixa escura é composta principalmente por miofilamentos grossos. Os sarcômeros são constituídos principalmente por quatro proteínas, miosina, actina, tropomiosina e troponina. Os miofilamentos grossos são compostos por miosina e as outras três proteínas compõem os miofilamentos finos. A actina e miosina representam juntas 55% do total de proteínas do músculo esquelético (Junqueira, Carneiro., 2008; MacIntosh, 2006; MacIntosh, 2006; MacIntosh, 2006).

Para que a contração muscular ocorra é necessário que impulsos nervosos sejam enviados por um neurônio motor. Este tem o papel de transmitir o estímulo enviado para as fibras musculares na forma de potencial de ação. O local onde ocorre a interação entre o neurônio motor e a fibra muscular é chamado de junção neuromuscular. Um único neurônio motor tem a capacidade de inervar diversas fibras musculares, e o conjunto de um neurônio motor e as fibras musculares que este inerva é denominado unidade motora (Junqueira, Carneiro., 2008; MacIntosh, 2006).

O processo de contração muscular é altamente especializado, e se inicia com um comando do sistema nervoso que por meio do neurônio motor chega à fibra muscular, induzindo uma cascata de reações. No músculo em repouso, as moléculas de troponina e tropomiosina envolvem a molécula de actina evitando que esta entre em contato com a molécula de miosina. Quando uma fibra do nervo motor recebe um impulso, há liberação de acetilcolina na placa motora, resultando na liberação dos íons cálcio e iniciando o ciclo de contração. A presença do cálcio no sarcoplasma faz com que o complexo troponina tropomiosina permita a interação da actina com a miosina, fazendo com que haja deslocamento da molécula de actina sobre a miosina, resultando em contração da fibra muscular. Logo após, o cálcio é transportado ativamente para o retículo sarcoplasmático, sendo a contração muscular dependente da disponibilidade de cálcio. Assim, quando a concentração deste íon se reduz no sarcoplasma, ocorre o relaxamento muscular. Variações na composição de proteínas miofibrilares podem resultar em propriedades metabólicas

e contráteis distintas, o que caracterizam diferentes tipos de fibras musculares (Clark et al., 2002; Pette, Staron, 2000).

A molécula de miosina é composta de duas subunidades de miosina de cadeia pesada (*myosin heavy chain*–MyHC) e duas subunidades de dois pares de miosina de cadeia leve (*myosin light chain* –MLC) (Tajsharghi, 2008). Podemos considerar as fibras musculares são de tipos distintos de acordo com a predominância de isoformas da proteína MyHC (Bassel-Duby, Olson, 2006): 1) a MyHC I é expressa em maior quantidade em fibras do tipo I, também denominadas fibras de contração lenta e resistentes à fadiga; 2) a MHC IIx ou IIb está presente principalmente em fibras do tipo IIb ou fibras de contração rápida e pouco resistentes à fadiga (Powers, Howley, 2005; Tajsharghi, 2008); 3) As fibras musculares do tipo IIa (possuem alta expressão da miosina de cadeia pesada do tipo IIa, são de contração rápida), possuem propriedades metabólicas e contráteis intermediárias entre as fibras do tipo I e IIb ou IIx (Schiaffino, 2011; Schiaffino, 2007). As fibras musculares do tipo I são abundantes em músculos posturais e que exercem trabalhos de resistência, como por exemplo, o músculo sóleo (Kamanga-Sollo et al., 2011), enquanto as fibras musculares do tipo II são predominantes em músculos de movimentos rápidos e que exercem atividades que requerem velocidade, como por exemplo, o músculo extensor longo dos dedos (EDL) (Bassel-Duby, Olson, 2006).

O músculo esquelético apresenta grande capacidade de se adaptar a diversos estímulos. Sendo assim, pode haver conversão gradual do tipo de fibras musculares, do tipo I para tipo II ou do tipo II para o tipo I de acordo com diversos estímulos (Tiidus et al., 2008). Através de um estímulo, como por exemplo, a sobrecarga mecânica induzida pelo treinamento de força (Matsakas, Patel, 2009; Schoenfeld, 2010) ocorre hipertrofia muscular que é caracterizada pelo aumento da área de secção transversal das fibras musculares e, conseqüentemente aumento da força muscular (Matsakas, Patel, 2009; Schoenfeld, 2010). A falta de estímulo também pode induzir uma resposta da musculatura esquelética, como ausência ou redução da mobilidade muscular em situações de imobilização ou longos períodos de repouso, o que acarreta em atrofia do músculo esquelético, que é caracterizada pela redução da massa muscular indicada pela diminuição da área de secção transversal das fibras musculares e, conseqüente diminuição da força muscular (Cassano et al., 2009; Jackman, Kandarian, 2004; Lieber, 2002; Murphy et al., 2011). Além disso, em situação de lesão o músculo esquelético, na tentativa de recuperar a

sua estrutura e função, também apresenta uma resposta adaptativa. Esse processo é denominado regeneração muscular e depende das células satélite, que serão abordadas no próximo item.

1.2 Regeneração do músculo esquelético

O músculo esquelético apresenta notável habilidade de se regenerar após uma lesão. O processo de regeneração inclui a instalação de um processo inflamatório, proliferação e diferenciação de células satélite, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e recuperação funcional do músculo lesado (Ciciliot, Schiaffino, 2010; Conte et al.).

A lesão muscular ocorre a partir da ruptura do sarcolema da fibra muscular com consequente ampliação da permeabilidade celular (Charge, Rudnicki, 2004; Grefte et al., 2007; Jarvinen et al., 2005). O dano muscular pode ser ocasionado por lesão química, como por exemplo, toxinas (Salvini et al., 2001), mecânica, como lesões por distensões, normalmente observadas em atletas (Jarvinen et al., 2005), ou térmica, como queimaduras, ou congelamento (Miyabara et al., 2010; Sugita et al., 2011).

Após a lesão muscular, células inflamatórias invadem o músculo lesado, principalmente os macrófagos, sendo responsáveis pela fagocitose e digestão das fibras musculares necrosadas e pela secreção de citocinas que são capazes de ativar as células satélite (Nathan, 1987). As células satélite, descritas pela primeira vez por Mauro em 1961 em fibras musculares de rã, são células mononucleadas e indiferenciadas, que foram assim denominadas por sua localização na periferia da célula, ou seja, encontradas entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular no músculo esquelético adulto em estado quiescente (Muir, 1965; Grounds, 1993; Schultz, 1994). Quando ativadas estas células se proliferam, posteriormente se diferenciam e se fundem à porção da fibra muscular previamente lesada, acarretando na recomposição do tecido muscular (Wozniak, 2005; Hawke, 2001).

Durante a fase de recomposição do tecido lesado em resposta a citocinas pró-fibróticas, como o *Transforming growth factor* β (TGF- β), fibroblastos migram para o local da lesão para produzir e remodelar a matriz extracelular, resultando na síntese de seus componentes, como por exemplo, fibronectina, laminina, elastina, proteoglicanas, colágeno do tipo I e tipo III (colágenos mais abundantes do músculo esquelético). Esses elementos são importantes para a reparação do

tecido danificado, contribuindo para a angiogênese e para a recomposição do nicho das células satélite (Mann et al., 2011; Silva et al., 2016).

Como previamente mencionado, as células satélite são ativadas por citocinas e diversos fatores de crescimento, tais como os *Insulin-like growth factors I e II* (IGF I e II), o *Hepatocyte growth factor* (HGF), o *Fibroblast growth factor* (FGF), o TGF- β , citocinas inflamatórias como *Interleukin-6* (IL-6), óxido nítrico, além de fatores liberados pelo neurônio motor (Grefte et al., 2007; Carosio, 2011). Além disso, diversos fatores de transcrição, dentre os quais podemos destacar o *Paired box protein 7* (Pax7) e os fatores regulatórios miogênicos (MRFs) da família *basic helix loop helix* (MyoD, Myf-5, MRF-4 e miogenina) são importantes reguladores dos processos de proliferação e diferenciação das células satélite durante a regeneração muscular. O estado de quiescência das células satélite é sustentado pela alta expressão de Pax7. Após ativação, as células satélite apresentam alta expressão dos fatores regulatórios miogênicos MyoD e Myf5 e se proliferam acarretando no aumento do número de células precursoras miogênicas (Ciciliot, 2010; Grefte, 2007; Tiidus, 2008). A concomitante redução da expressão de Pax7 e o aumento da expressão de miogenina e MRF4 proporcionam a diferenciação das células precursoras miogênicas durante o processo regenerativo muscular (Grefte et al., 2007). A diferenciação terminal das células precursoras miogênicas é caracterizada pela fusão destas para formar miotubos, os quais passam a expressar a miosina de cadeia pesada neonatal (MyHCn) que em seguida será substituída pelas isoformas adultas de MyHCs (Ciciliot, 2010; Grefte et al., 2007; Tiidus, 2008).

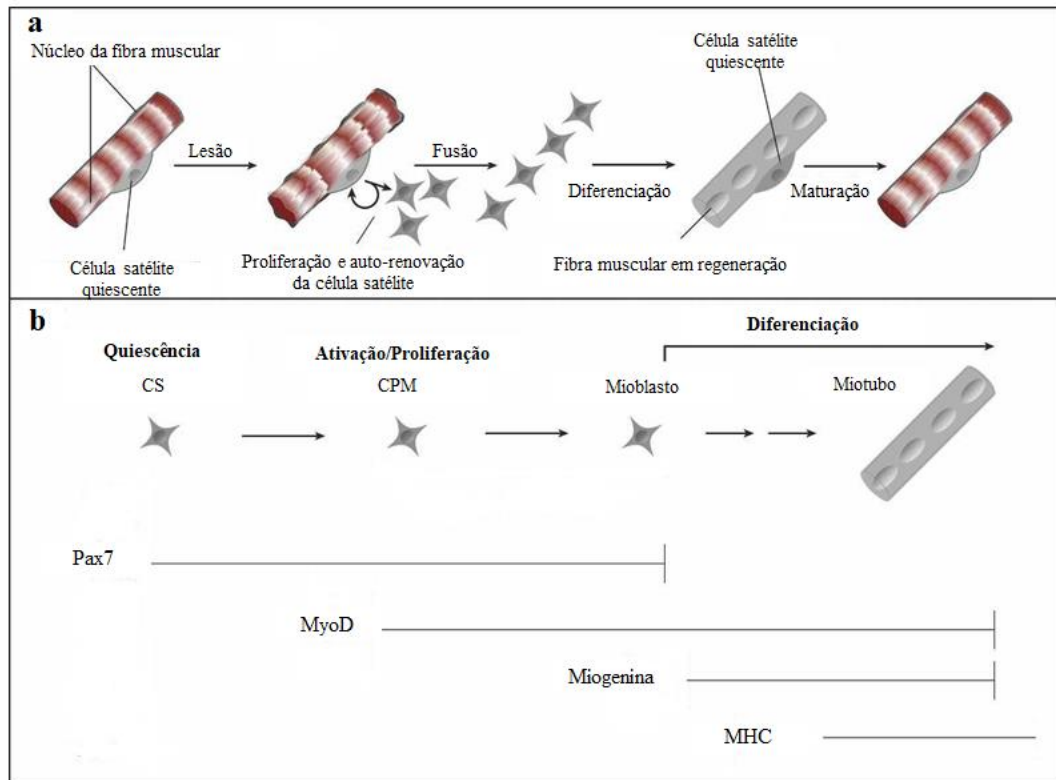


Figura 1. a) Participação das Célula Satélite no processo de regeneração muscular; b) Processo de ativação, proliferação e diferenciação de Célula Satélite e exemplos de fatores miogênicos expressos em cada fase. CS, Célula Satélite; CPM, Células Precursoras Miogênicas. Adaptado de Shi e Garry, 2006.

Apesar do músculo esquelético apresentar importante capacidade de se regenerar frente a diversos estímulos lesivos, com o avanço da idade ocorre deficiência no processo de regeneração muscular esquelética (O'leary et al., 2012), tema que será abordado a seguir.

1.3 Resposta regenerativa muscular no idoso

À medida que a expectativa de vida vem aumentando, torna-se cada vez mais importante aprofundar nossos conhecimentos sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no envelhecimento do sistema muscular, cuja integridade é reconhecidamente importante para a qualidade de vida. Sabe-se que durante o envelhecimento ocorre significativa perda de massa muscular, denominado sarcopenia, cujas causas são multifatoriais, como por exemplo, alterações no sistema endócrino, como a redução de hormônios sexuais e GH (*Growth Hormone*),

diminuição da atividade física e da nutrição (Arthur, Cooley, 2012; Clark, Manini, 2012; Narici, Maffulli, 2010; O'leary et al., 2012).

O termo sarcopenia foi proposto por Rosenberg em 1989, e refere-se à perda de massa muscular ocorrida durante o envelhecimento. Entretanto, diversos autores associam esse termo também à perda de força muscular observada ao longo do envelhecimento. Estudos epidemiológicos demonstraram que entre 20 a 80 anos de idade ocorre uma redução da massa muscular de aproximadamente 18 % em homens e 27 % em mulheres (Narici, Maffulli, 2010). A sarcopenia é caracterizada pela redução do diâmetro e do número das fibras musculares, principalmente das fibras musculares do tipo II. No músculo do idoso, as fibras musculares são gradualmente substituídas por elementos não contráteis, como os adipócitos e o tecido conjuntivo. Alguns trabalhos sugerem que a sarcopenia é sustentada pela liberação de adipocinas por células adiposas, como por exemplo, leptina, e pela liberação de citocinas inflamatórias como por exemplo, TNF- α , por parte dos macrófagos, contribuindo para o desenvolvimento de resistência à insulina e para o surgimento de doenças metabólicas. Além disso, a morfologia do tecido muscular comprometida durante o envelhecimento, contribui para o déficit na força muscular, que é acompanhado pela limitação de movimento, diminuição da resposta imunológica e maior susceptibilidade às lesões (Arthur, Cooley, 2012; Conte et al., 2012; Narici, Maffulli, 2010).

Além das alterações estruturais citadas anteriormente, com o avanço da idade ocorre aumento de espécies reativas de oxigênio, o que ocasiona a elevação da oxidação do DNA mitocondrial, de lipídios e de proteínas (O'leary et al., 2012). O balanço entre síntese e degradação proteica também é afetado, pois há aumento de degradação proteica com elevação da expressão de elementos da via ubiquitina-proteassomo, maior ativação da via das caspases e de autofagia, e redução da síntese proteica através da inibição de elementos da via Akt/mTOR (Arthur, Cooley, 2012; Gumucio, Mendias, 2013; O'leary et al., 2012).

No sistema ubiquitina-proteassomo, a principal via de degradação proteica no músculo esquelético, há a participação do complexo multiproteico contendo um centro proteolítico o qual regula a degradação das proteínas ubiquitinadas, o proteassomo, da enzima ativadora de ubiquitina, denominada E1, da enzima que conjuga as ubiquitinas ativadas, denominada E2, e a participação das enzimas ligantes de ubiquitina, as E3, como por exemplo, Murf-1 e Atrogin-1,

que são responsáveis por ligar as proteínas que serão degradadas ao conjugado de ubiquitinas para que estas sejam reconhecidas e degradadas pelo proteassomo (Bilodeau et al., 2016).

Além disso, o declínio da capacidade regenerativa muscular constitui uma alteração marcante durante o envelhecimento (Grounds, 1998; Welle, 2002) e está relacionado com o retardo na ativação e menor proliferação de células satélite, resultando na redução do número e da função destas (Chakkalakal et al., 2012; Charge, Rudnicki, 2004). Embora as alterações estruturais envolvidas no decaimento da capacidade regenerativa muscular em idosos sejam bem conhecidas, os mecanismos intracelulares envolvidos em tal evento ainda não estão totalmente esclarecidos.

A capacidade regenerativa do tecido muscular do idoso também é comprometida pela maior susceptibilidade deste em desenvolver fibrose, que é caracterizada pelo acúmulo de fibroblastos no tecido e consequente secreção excessiva de componentes da matriz extracelular, como por exemplo, o colágeno e a fibronectina, o que acarreta no comprometimento da estrutura e da função tecidual (Hawinkels, Ten Dijke, 2011). Como já descrito anteriormente, é bem estabelecido que o TGF- β induz o desenvolvimento de fibrose através da indução da produção e deposição de colágeno pelos fibroblastos em diversos tecidos (Hawinkels, Ten Dijke, 2011). Dentre as isoformas de TGF- β (TGF- β 1, β 2 e β 3), o TGF- β 2 parece ser mais produzido e portanto mais ativo durante o desenvolvimento de fibrose muscular (Tripathi et al. 1994). A exagerada produção de TGF- β no músculo esquelético de idosos (Beggs et al., 2004) está relacionada à expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- α e IL-6, que são responsáveis por ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), e este é capaz de induzir a expressão de TGF- β (Aldaba-Muruato et al., 2012; Ogawa et al., 2004).

Quase todas as células secretam TGF- β e possuem receptores para o mesmo. A superfamília do TGF- β é composta de TGF- β s, as *bone morphogenic proteins* (BMPs), os fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) e as activinas. Os membros dessa superfamília ativam vias intracelulares através de sua ligação a receptores transmembrânicos serina/treonina kinase do tipo I (também denominado de *activin-receptor like kinases*, ALK) e II (Hawinkels, Ten Dijke, 2011; Meulmeester, Ten Dijke, 2011).

O TGF- β possui co-receptores auxiliares, como por exemplo, a betaglicana (receptor III do TGF- β) e a endoglicana. TGF- β se liga primeiramente a um co-receptor auxiliar e é subsequentemente apresentado ao receptor II do TGF- β (T β R-II) com o qual forma um complexo

heteromérico. Subsequentemente, ALK-5 é recrutado, o co-receptor se dissocia, e ALK-5 é fosforilado por T β R-II, o que inicia a sinalização intracelular através da fosforilação das proteínas Smads 2 e 3. Ativadas, as Smads 2 e 3 formam complexos heteroméricos com a co-smad Smad 4, que se acumula no núcleo. Esses complexos de Smads interagem com outros fatores de transcrição em regiões promotoras de genes alvo (como colágeno tipo I, fibronectina e *plasminogen activator inhibitor-1*-PAI-1) regulando, portanto, a transcrição destes (Hawinkels, Ten Dijke, 2011; Meulmeester, Ten Dijke, 2011).

Diante do gradativo aumento da expectativa de vida e da importância da integridade da musculatura esquelética, a investigação de estratégias terapêuticas capazes de minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento sobre o tecido muscular esquelético é essencial para a conservação da qualidade de vida. Neste contexto, boas candidatas seriam as proteínas de choque térmico (HSPs) em especial a HSP de 70 kDa induzível (HSP70), uma vez que esta é uma proteína citoprotetora podendo atuar na proteção contra o estresse oxidativo (Lightfoot et al., 2009), contra a degradação proteica (Senf et al., 2010) e na inibição da ativação de NF- κ B (Senf et al., 2008), que como previamente mencionado, é responsável por induzir aumento da expressão de TGF- β , fator este envolvido no desenvolvimento de fibrose (Aldaba-Muruato et al., 2012). Considerando-se que tais eventos interferem sobremaneira na resposta regenerativa do tecido muscular, a hiperexpressão de HSPs poderia auxiliar na melhoria da capacidade regenerativa muscular de indivíduos idosos (Gombos et al., 2011).

1.4 Proteínas de choque térmico

Embora as HSPs tenham recebido este nome por serem sintetizadas em condições de elevadas temperaturas, são proteínas expressas em todas as células de eucariontes e procariontes em condições normais, e sua síntese é amplamente aumentada quando são expostas a diversos estímulos nocivos (Baba, 1998; Collins, 1982; Plesset, 1982; Fan, 2012).

As HSPs compõem uma família caracterizada por grande homologia estrutural, demonstrada pela conservação da sequência de DNA e proteína ao longo da evolução (Lindquist, 1986; Liu et al., 2006). Além disso, são divididas em 6 subfamílias, distribuídas de

acordo com a massa molecular: 1) HSPs grandes (110 a 100 kDa), 2) HSP90, 3) HSP70, 4) HSP60, 5) HSP40 e 6) HSPs pequenas (30 a 18 kDa) (Lindquist, 1988; Liu, 2006).

A indução das HSPs ocorre logo após um estímulo de estresse. O estresse celular leva à dissociação do *heat shock factor-1* (HSF-1) do complexo de chaperonas localizados no citoplasma, o qual permanece ligado a este complexo em situação basal reprimindo a ativação das HSPs (Zou et al., 1998). Em sua forma livre no citoplasma o HSF-1 pode se conectar a outros HSFs-1 formando trómeros que se translocam para o núcleo (Wu, 1995) e ligam-se à região promotora do gene das HSPs, que é denominada *heat shock element* (Literati-Nagy et al., 2009), levando a transcrição dos genes HSPs (Morimoto et al., 1997). Consequentemente, os níveis de HSPs (RNAm e proteína) aumentam nas células em situação de estresse. Uma vez sintetizadas, as HSPs se unem à proteína desnaturada na tentativa de restaurar a sua estrutura terciária e atividade enzimática em um ciclo envolvendo a hidrólise de ATP (Gebauer et al., 1997).

No intuito de se investigar a influência das HSPs na proteção do tecido muscular em diversas situações nocivas, tem-se utilizado diferentes métodos de indução da hiperexpressão de tais proteínas no músculo esquelético. Em modelo de atrofia muscular em animais, a hiperexpressão de HSPs induzida por altas temperaturas causou a atenuação da perda de massa muscular (Naito et al., 2000). A hiperexpressão de HSPs em músculos esqueléticos, induzida por eletroporação de plasmídeo ou por meio da utilização de animais transgênicos que hiperexpressam HSP70 também acarretou na atenuação da atrofia muscular e melhor recuperação da massa muscular após remoção do estímulo atrofico (Senf et al., 2008); (Miyabara et al., 2012). Estudos utilizando o fármaco indutor de HSP *geldanamycin derivative 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin* (17-AAG), no tratamento de músculo esquelético lesado são contraditórios, pois um deles demonstrou melhora na recuperação da força de músculos em regeneração de animais idosos (Kayani et al., 2008a), porém o outro não mostrou eficiente melhora da regeneração de músculos lesados por um protocolo de contrações excêntricas (Baumann et al., 2016). Além disso, a utilização do fármaco *O-(3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl)nicotinic amidoxime* (BGP-15), indutor de HSPs, mostrou-se eficiente na atenuação de lesão muscular, de fibrose e da perda da função contrátil muscular durante a progressão da distrofia muscular de Duchenne em modelo animal (Gehrig et al., 2012).

O BGP-15 é um derivado de hidroxilamina capaz de induzir a síntese de HSPs através da ativação do fator de transcrição HSF-1 (Gehrig et al., 2012; Gombos et al., 2011; Literati-Nagy et al., 2009). Apesar do mecanismo pelo qual o BGP-15 induz a expressão de HSPs não ser bem conhecido, Gombos et al., (2011) sugerem que o BGP-15 se liga à membrana plasmática, devido à alta afinidade a lipídios, ativando PI3K (*Phosphatidylinositide 3-kinases*). Em seguida, PI3K dirige a conversão de PIP2 (*Phosphatidylinositol diphosphate*) para PIP3 (*Phosphatidylinositol triphosphate*), ativando a cascata de sinalização Rac-1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*; pequena GTPase). Rac-1 é capaz de ativar NADPH oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), que por sua vez induz a produção de espécies reativas de oxigênio ativando o fator de transcrição HSF-1 (Gombos et al., 2011; Literati-Nagy et al., 2012).

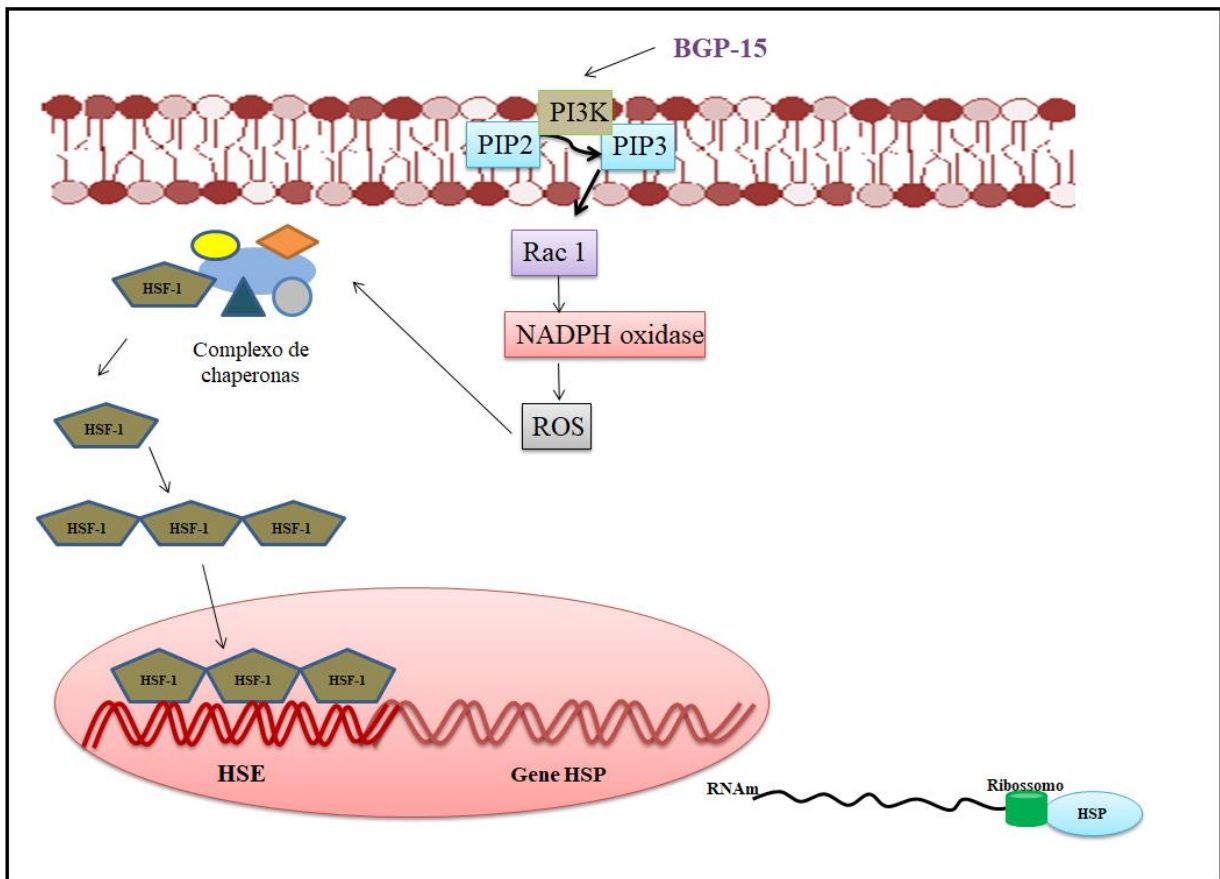


Figura 2. Mecanismo de ação do fármaco BGP-15.. Adaptado de Gombos et al., 2011 e Literati-Nagy et al., 2012.

O BGP-15 tem sido amplamente estudado na proteção contra resistência à insulina. Estudos demonstram que pacientes com diabetes do tipo-II apresentam baixa expressão do gene HSP70 no músculo esquelético, o qual tem sido associado à redução da sensibilidade à insulina (Chung et al., 2007, Literat-Nagy et al., 2012). O desenvolvimento de resistência à insulina está relacionado a um estado de crônica inflamação nos tecidos responsivos a insulina, como por exemplo, tecido adiposo, fígado e tecido musculo esquelético, no qual há liberação de TNF- α resultando na ativação de c-jun amino terminal kinase (JNK) e do inibidor de kb kinase (IKK), responsável pela ativação de NF- κ B. Chung e colaboradores demonstraram em 2007 que a hiperexpressão de HSP70 através do tratamento com BGP-15 previne a fosforilação de JNK em músculo esquelético protegendo contra a resistência à insulina, sendo que testes clínicos têm confirmado esse potencial terapêutico (Chung et al., 2008; Literati-Nagy et al., 2009; Literati-Nagy et al., 2012; Wellen, Hotamisligil, 2005).

Dentre as HSPs, podemos destacar a HSP70 que é a mais abundante e que possui diversas funções, dentre as quais, faz parte do sistema ubiquitina/proteassoma, desempenha função de chaperona em vias de degradação proteica, faz ligação de novas cadeias de aminoácidos nos ribossomos e mantém a translocação e a conformação correta de proteínas precursoras do retículo endoplasmático e da mitocôndria no citosol (Pilon, Schekman, 1999).

A família da HSP70 é composta de quatro isoformas; a 72 kDa, a 73 kDa, a 75 kDa e a 78 kDa. A proteína com o peso molecular de 72 kDa é também conhecida como HSP70 induzível (HSP70), pois sua síntese é estimulada através de estresse, sendo assim, pode constituir mais de 20% do total de proteínas celulares em condições de estresse e lesão celular, dessa forma tal proteína também é considerada um marcador de estresse (Liu et al., 2006).

Estudos utilizando a indução da hipexpressão da proteína HSP70 através da transgenia, observaram que tal proteína atua na proteção de cardiomiócitos contra lesão induzida por isquemia-reperfusão (Marber et al., 1995), de músculos esqueléticos submetidos a lesões induzidas por contrações repetidas (Mcardle et al., 2004), ou por criolesão (Miyabara et al., 2006). Além disso, o tratamento com radicicol, um indutor de HSPs, em animais lesados com crotoxina (CTX) se mostrou capaz de melhorar a regeneração estrutural do músculo esquelético evidenciada pelo aumento do número de células satélite e das células musculares em diferenciação marcadas com MyHCn (Conte et al., 2008).

Apesar de alguns trabalhos terem mostrado que a indução de HSPs promove uma melhora dos aspectos morfológicos do tecido muscular em regeneração de camundongos jovens (Conte et al., 2008) e da função contrátil de músculos em regeneração de animais idosos (Kayani et al., 2008a; Mcardle et al., 2004) a influência das HSPs no processo de regeneração muscular de indivíduos jovens bem como na melhoria da resposta regenerativa de idosos ainda não foi estudada de maneira sistemática. Além disso, pouco se sabe sobre a participação de pequenos RNAs não codificantes na regeneração muscular de idosos.

1.5 microRNAs no músculo esquelético

Nos últimos anos tem surgido diversos estudos a respeito dos RNAs não codificantes (ncRNA) de cadeia pequena, este grupo de RNAs inclui os pequenos RNAs de interferência (siRNA- *short interfering RNA*), RNAs de interação Piwi (piRNAs) e os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são RNAs não codificantes de proteínas que apresentam de 20 a 30 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica geralmente inibindo o seu alvo, por diversos mecanismos, como por exemplo alteração na estrutura da cromatina, inibindo a transcrição ou alterando o processamento do RNA mensageiro (Carthew, Sontheimer, 2009).

O mecanismo de biossíntese dos miRNAs é conservado evolutivamente e envolve a clivagem basicamente por duas enzimas RNase III, Drosha e Dicer. O processo se inicia no núcleo onde a RNA polimerase II transcreve o miRNA primário (pri-miRNA), que é longo e apresenta uma estrutura em *stem-loop* e contém em sua cauda 5' um grupo 7-metil-guanosina (7mG) e na extremidade 3' uma calda poli-A (Figura 3). Após a formação do pri-miRNA a sua estrutura *stem-loop* é reconhecida por um complexo microprocessador composto pela enzima Drosha, a proteína de ligação RNA-dupla-fita e DGCR8, e processada formando uma fita dupla em grampo que apresenta de 60 a 100 nucleotídeo denominada miRNA precursor (pre-miRNA). Após a clivagem pelo complexo Drosha, o pre-miRNA é transportado para fora do núcleo através da interação com a Exportina -5 e Ran-GTP, responsável por transportar o pre-miRNA do núcleo para o citoplasma. No citoplasma o pre-miRNA é catalisado pela Dicer. Essa clivagem resulta no miRNA maduro apresentando de 20 a 22 nucleotídeos em fita dupla. O miRNA maduro associado a um complexo de silenciamento chamado complexo indutor de silenciamento de RNA

(RISC) se liga à região 3'UTR dos genes alvo, fazendo com que estes genes sejam inibidos ou degradados (Davis-Dusenbery, Hata, 2010; Olena, Patton, 2010).

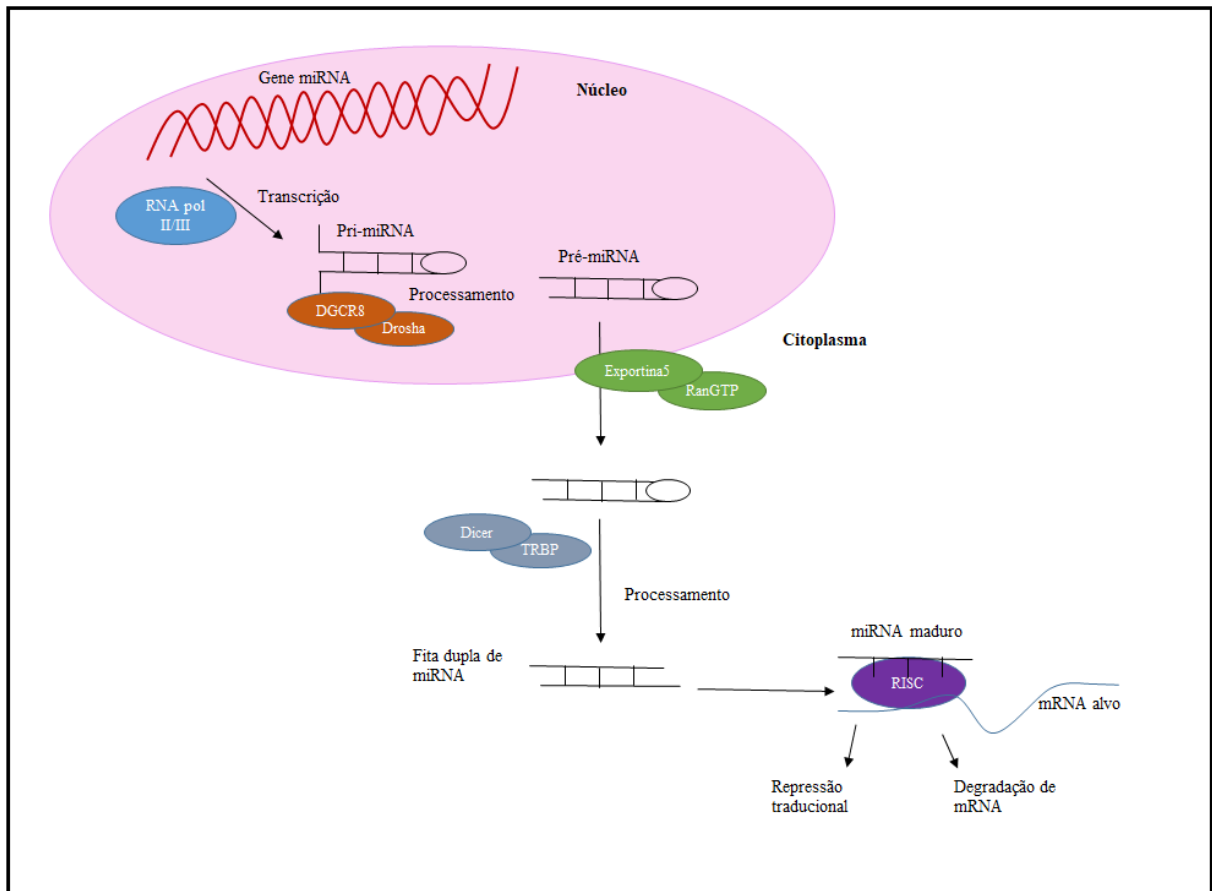


Figura 3. Biogênese do miRNA e mecanismo de ação. Adaptado de Diniz e Wang, 2016.

Nas últimas décadas, tem sido descrito o envolvimento de miRNAs como reguladores de diversos processos biológicos, incluindo aqueles relacionados ao músculo esquelético (Diniz, Wang, 2016; Krutzfeldt et al., 2006).

Os miRNAs conhecidos como músculo-específicos foram descritos como participantes principalmente dos processos de proliferação de células satélite, miogênese e hipertrofia muscular, são eles, miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b, miR-486 e miR-499, os quais estão presentes nos músculos esquelético e cardíaco (Di Filippo et al., 2016; Horak et al., 2016; Van Rooij et al., 2008). Além disso, diversos estudos têm relatado outros miRNAs envolvidos na miogênese, como por exemplo, miR-26 na diferenciação de mioblastos (Dey et

al., 2012), miR-128 na inibição de proliferação de mioblastos (Motohashi et al., 2013), e miR-489 na manutenção do estado de quiescência das células satélite (Cheung et al., 2012).

Tendo em vista que as proteínas de choque térmico têm importante participação em diversos processos biológicos, e que os miRNAs atuam na regulação de genes, a hiperexpressão de HSPs poderia melhorar aspectos da regeneração muscular de idosos envolvendo a participação de miRNAs.

Considerando-se que a) a influência das HSPs na melhoria da resposta regenerativa da musculatura esquelética de idosos ainda não é bem conhecida, b) o tratamento com BGP-15 atenua a fibrose muscular (Gehrig et al., 2012) e que, c) a hiperexpressão de HSPs pode inibir a ativação do fator NF- κ B (Mccarthy, Esser, 2010; Senf et al., 2008) em músculo esquelético atrofiado; a hiperexpressão de HSPs no músculo esquelético através do tratamento com BGP-15 poderia melhorar o processo regenerativo muscular através da atenuação da fibrose do tecido muscular em regeneração de indivíduos idosos por meio da inibição de NF- κ B e consequente redução dos níveis de TGF- β , um potente indutor de fibrose (Aldaba-Muruato et al., 2012; El-Khouly et al., 2012). Portanto, decidimos investigar a influência das HSPs na resposta regenerativa do tecido muscular esquelético de camundongos idosos através do estudo dos aspectos morfológicos, moleculares e funcionais da regeneração de músculos de camundongos idosos tratados com BGP-15, e de análises *in vitro* da função de células satélite oriundas de camundongos idosos transgênicos hiperexpressantes de HSP70.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Considerando-se que a expectativa de vida tem aumentado mundialmente, o estudo de estratégias capazes de minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento, em especial, o déficit da capacidade regenerativa da musculatura esquelética que afeta de maneira significativa a qualidade de vida, é extrema importância. Sendo as HSPs, proteínas citoprotetoras capazes de atenuar os processos de atrofia, lesão e fibrose muscular, estas seriam boas candidatas para reduzir os efeitos deletérios do envelhecimento e auxiliar na resposta regenerativa muscular de camundongos idosos. Uma vez que a influência das HSPs na melhoria da resposta regenerativa da musculatura esquelética de idosos ainda não é bem esclarecida, e como tais proteínas participam da atenuação do processo de fibrose muscular; este trabalho contribuirá para o melhor entendimento da influência das HSPs na resposta regenerativa de músculos esqueléticos de idosos. Além disso, este trabalho poderá servir de base para futuros estudos no intuito de se investigar o papel do fármaco BGP-15 como um possível agente terapêutico no tratamento de lesões do músculo esquelético de indivíduos idosos.

7. CONCLUSÃO

Em geral, este estudo demonstra que a hiperexpressão de HSPs, induzida por BGP-15, melhora a regeneração muscular em camundongos idosos por meio da aceleração da recuperação do tamanho da fibra muscular em regeneração. Experimentos *in vitro* sugerem que esse efeito é mediado pela atenuação do déficit na diferenciação de células precursoras miogênicas. Paralelamente, este trabalho demonstra que a HSP70 participa do início da diferenciação muscular por meio de mecanismo envolvendo o fator de transcrição MyoD e o miR-326. Além disso, BGP-15 atenua a sarcopenia em camundongos idosos e a perda de miotubos atróficos *in vitro*. Este último efeito é mediado pela redução na expressão da E3 ligase Atrogin-1.

Por fim, futuros estudos deveriam investigar o papel das HSPs como alvos para intervenções terapêuticas por meio de agentes farmacológicos como o BGP-15 ou terapia gênica, no intuito de atenuar o déficit da capacidade regenerativa de indivíduos idosos.

REFERÊNCIAS*

Acharyya, S, Sa Villalta, N Bakkar, T Bupha-Intr, Pm Janssen, M Carathers, Zw Li, Aa Beg, S Ghosh, Z Sahenk, M Weinstein, Kl Gardner, Ja Rafael-Fortney, M Karin, Jg Tidball, As Baldwin e Dc Guttridge. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **J Clin Invest.**2007; 117(4):889-901.

Aldaba-Muruato, Lr, Mg Moreno, E Hernandez-Mercado, M Shibayama e P Muriel. Secondary biliary cirrhosis in the rat is prevented by decreasing NF-kappaB nuclear translocation and TGF-beta expression using allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. **Can J Physiol Pharmacol.**2012; 90(11):1469-78.

Arnold, L, A Henry, F Poron, Y Baba-Amer, N Van Rooijen, A Plonquet, Rk Gherardi e B Chazaud. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med.**2007; 204(5):1057-69.

Arthur, St e Id Cooley. The effect of physiological stimuli on sarcopenia; impact of Notch and Wnt signaling on impaired aged skeletal muscle repair. **Int J Biol Sci.**2012; 8(5):731-60.

Baba, Ha, Kw Schmid, C Schmid, S Blasius, A Heinecke, S Kerber, Hh Scheld, W Bocker e Mc Deng. Possible relationship between heat shock protein 70, cardiac hemodynamics, and survival in the early period after heart transplantation. **Transplantation.**1998; 65(6):799-804.

Barber, L, Bm Scicchitano e A Musaro. Molecular and Cellular Mechanisms of Muscle Aging and Sarcopenia and Effects of Electrical Stimulation in Seniors. **Eur J Transl Myol.**2015; 25(4):231-6.

Bassel-Duby, R e En Olson. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem.**2006; 75:19-37.

Baumann, Cw, Rg Rogers e Js Otis. Utility of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin treatment for skeletal muscle injury. **Cell Stress Chaperones.**2016; 21(6):1111-1117.

Beggs, Ml, R Nagarajan, Jm Taylor-Jones, G Nolen, M Macnicol e Ca Peterson. Alterations in the TGFbeta signaling pathway in myogenic progenitors with age. **Aging Cell.**2004; 3(6):353-61.

Bentzinger, Cf, K Romanino, D Cloetta, S Lin, Jb Mascarenhas, F Oliveri, J Xia, E Casanova, Cf Costa, M Brink, F Zorzato, Mn Hall e Ma Ruedg. Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: Rio de Janeiro, 2002.

not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. **Cell Metab.**2008; 8(5):411-24

Bilodeau, Pa, Es Coyne e Ss Wing. The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation. **Am J Physiol Cell Physiol.**2016; 311(3):C392-403.

Blau, Hm, Bd Cosgrove e At Ho. The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging. **Nat Med.**2015; 21(8):854-62.

Bodine, Sc e Lm Baehr. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**2014; 307(6):E469-84.

Bodine, Sc, Tn Stitt, M Gonzalez, Wo Kline, Gl Stover, R Bauerlein, E Zlotchenko, A Scrimgeour, Jc Lawrence, Dj Glass e Gd Yancopoulos. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol.**2001; 3(11):1014-9.

Broome, Cs, Ac Kayani, J Palomero, Wh Dillmann, R Mestril, Mj Jackson e A Mcardle. Effect of lifelong overexpression of HSP70 in skeletal muscle on age-related oxidative stress and adaptation after nondamaging contractile activity. **FASEB J.**2006; 20(9):1549-51.

Carlson, Bm e Ja Faulkner. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Med Sci Sports Exerc.**1983; 15(3):187-98.

Carosio, S, Mg Berardinelli, M Aucello e A Musaro. Impact of ageing on muscle cell regeneration. **Ageing research reviews.**2011; 10(1):35-42.

Carthew, Rw e Ej Sontheimer. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell.**2009; 136(4):642-55.

Cassano, M, M Quattrocchi, S Crippa, I Perini, F Ronzoni e M Sampaolesi. Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. **Journal of muscle research and cell motility.**2009; 30(7-8):243-53.

Chakkalakal, Jv, Km Jones, Ma Basson e As Brack. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. **Nature.**2012; 490(7420):355-60.

Charge, Sb e Ma Rudnicki. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev.**2004; 84(1):209-38.

Cheung, Th, Ni Quach, Gw Charville, L Liu, L Park, A Edalati, B Yoo, P Hoang e Ta Rando. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. **Nature**.2012; 482(7386):524-8.

Choi, I, Jh Woo, I Jou e Eh Joe. PINK1 Deficiency Decreases Expression Levels of mir-326, mir-330, and mir-3099 during Brain Development and Neural Stem Cell Differentiation. **Exp Neurobiol**.2016; 25(1):14-23.

Chung, J, Ak Nguyen, Dc Henstridge, Ag Holmes, Mh Chan, JI Mesa, Gi Lancaster, Rj Southgate, Cr Bruce, Sj Duffy, I Horvath, R Mestrl, Mj Watt, PI Hooper, Ba Kingwell, L Vigh, A Hevener e Ma Febbraio. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**.2008; 105(5):1739-44.

Ciciliot, S e S Schiaffino. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. **Current pharmaceutical design**.2010; 16(8):906-14.

Clark, Bc e Tm Manini. What is dynapenia? **Nutrition**.2012; 28(5):495-503.

Clark, Ka, As Mcelhinny, Mc Beckerle e Cc Gregorio. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annu Rev Cell Dev Biol**.2002; 18:637-706.

Collins, Pl e Le Hightower. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins. **J Virol**.1982; 44(2):703-7.

Conboy, Im, Mj Conboy, Aj Wagers, Er Girma, Il Weissman e Ta Rando. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. **Nature**.2005; 433(7027):760-4.

Conte, Tc, Dv Franco, Il Baptista, Cr Bueno, Jr., Hs Selistre-De-Araujo, Pc Brum, As Moriscot e Eh Miyabara. Radicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. **Toxicol**.2008; 52(1):146-55.

Conte, Tc, Lh Silva, Mt Silva, Sm Hirabara, Ac Oliveira, R Curi, As Moriscot, Ms Aoki e Eh Miyabara. The beta2-adrenoceptor agonist formoterol improves structural and functional regenerative capacity of skeletal muscles from aged rat at the early stages of postinjury. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**.2012; 67(5):443-55.

Corral-Fernandez, Ne, Jd Cortes-Garcia, Rs Bruno, S Romano-Moreno, Se Medellin-Garibay, M Magana-Aquino, Ra Salazar-Gonzalez, R Gonzalez-Amaro e Dp Portales-Perez. Analysis of transcription factors, microRNAs and cytokines involved in T lymphocyte differentiation in patients with tuberculosis after directly observed treatment short-course. **Tuberculosis (Edinb)**.2017; 105:1-8.

Davis-Dusenbery, Bn e A Hata. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **J Biochem.**2010; 148(4):381-92.

Dey, Bk, J Gagan, Z Yan e A Dutta. miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice. **Genes Dev.**2012; 26(19):2180-91.

Di Filippo, Es, R Mancinelli, T Pietrangelo, Rm La Rovere, M Quattrocchi, M Sampaolesi e S Fulle. Myomir dysregulation and reactive oxygen species in aged human satellite cells. **Biochem Biophys Res Commun.**2016.

Di Marco, S, A Cammas, Xj Lian, En Kovacs, Jf Ma, Dt Hall, R Mazroui, J Richardson, J Pelletier e Ie Gallouzi. The translation inhibitor pateamine A prevents cachexia-induced muscle wasting in mice. **Nat Commun.**2012; 3896.

Diniz, Gp e Dz Wang. Regulation of Skeletal Muscle by microRNAs. **Compr Physiol.**2016; 6(3):1279-94.

Dodd, S, B Hain e A Judge. Hsp70 prevents disuse muscle atrophy in senescent rats. **Biogerontology.**2009; 10(5):605-11.

El-Khouly, D, Wm El-Bakly, As Awad, Ho El-Mesallamy e E El-Demerdash. Thymoquinone blocks lung injury and fibrosis by attenuating bleomycin-induced oxidative stress and activation of nuclear factor Kappa-B in rats. **Toxicology.**2012; 302(2-3):106-13.

Fan, Gc. Role of heat shock proteins in stem cell behavior. **Prog Mol Biol Transl Sci.**2012; 111305-22.

Garg, K, Bt Corona e Tj Walters. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. **Front Pharmacol.**2015; 687.

Gebauer, M, M Zeiner e U Gehring. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. **FEBS Lett.**1997; 417(1):109-13.

Gehrig, Sm, C Van Der Poel, Ta Sayer, Jd Schertzer, Dc Henstridge, Je Church, S Lamon, Ap Russell, Ke Davies, Ma Febbraio e Gs Lynch. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. **Nature.**2012; 484(7394):394-8.

Gombos, I, T Crul, S Piotto, B Gungor, Z Torok, G Balogh, M Peter, Jp Slotte, F Campana, Am Pilbat, A Hunya, N Toth, Z Literati-Nagy, L Vigh, Jr., A Glatz, M Brameshuber, Gj Schutz, A Hevener, Ma Febbraio, I Horvath e L Vigh. Membrane-lipid therapy in operation: the HSP co-

inducer BGP-15 activates stress signal transduction pathways by remodeling plasma membrane rafts. **PLoS One**.2011; 6(12):e28818.

Grefte Et Al., G, S., Am Kuijpers-Jagtman, R Torensma e Jw Von Den Hoff. Skeletal muscle development and regeneration. **Stem Cells Dev**.2007; 16(5):857-68.

Grounds, Md. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. **Ann N Y Acad Sci**.1998; 85478-91.

Grounds, Md e Z Yablonka-Reuveni. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. **Mol Cell Biol Hum Dis Ser**.1993; 3210-56.

Gumucio, Jp e Cl Mendias. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. **Endocrine**.2013; 43(1):12-21.

Guttridge, Dc, Mw Mayo, Lv Madrid, Cy Wang e As Baldwin, Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. **Science**.2000; 289(5488):2363-6.

Hawinkels, Lj e P Ten Dijke. Exploring anti-TGF-beta therapies in cancer and fibrosis. **Growth Factors**.2011; 29(4):140-52.

Hawke, Tj e Dj Garry. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of applied physiology**.2001; 91(2):534-51.

Horak, M, J Novak e J Bienertova-Vasku. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. **Dev Biol**.2016; 410(1):1-13.

Jackman, Rw e Sc Kandarian. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **American journal of physiology. Cell physiology**.2004; 287(4):C834-43.

Jarvinen, Ta, Tl Jarvinen, M Kaariainen, H Kalimo e M Jarvinen. Muscle injuries: biology and treatment. **The American journal of sports medicine**.2005a; 33(5):745-64.

Junqueira, Lcu e J Carneiro. Histologia Básica. Brasil. 2008

Kamanga-Sollo, E, Ms Pampusch, Me White, Mr Hathaway e Wr Dayton. Effects of heat stress on proliferation, protein turnover, and abundance of heat shock protein messenger ribonucleic acid in cultured porcine muscle satellite cells. **J Anim Sci**.2011; 89(11):3473-80.

Karagounis, Lg e Ja Hawley. Skeletal muscle: increasing the size of the locomotor cell. **Int J Biochem Cell Biol**.2010; 42(9):1376-9.

Karalaki, M, S Fili, A Philippou e M Koutsilieris. Muscle regeneration: cellular and molecular events. **In Vivo**.2009; 23(5):779-96.

Kayani, Ac, Gl Close, Cs Broome, Mj Jackson e A Mcardle. Enhanced recovery from contraction-induced damage in skeletal muscles of old mice following treatment with the heat shock protein inducer 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin. **Rejuvenation Res**.2008a; 11(6):1021-30.

Kayani, Ac, Gl Close, Mj Jackson e A Mcardle. Prolonged treadmill training increases HSP70 in skeletal muscle but does not affect age-related functional deficits. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**.2008b; 294(2):R568-76.

Krutzfeldt, J, Mn Poy e M Stoffel. Strategies to determine the biological function of microRNAs. **Nat Genet**.2006; 38 SupplS14-9.

Lee, Sj, M Yoo, Gy Go, J Hwang, Hg Lee, Yk Kim, Dw Seo, Ni Baek, Jh Ryu, Js Kang e Gu Bae. Tetrahydropalmatine promotes myoblast differentiation through activation of p38MAPK and MyoD. **Biochem Biophys Res Commun**.2014; 455(3-4):147-52.

Lieber, Rl. Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation Lippincott Williams e Wilkins 2002. 369 p.

Lightfoot, A, A Mcardle e Rd Griffiths. Muscle in defense. **Crit Care Med**.2009; 37(10 Suppl):S384-90.

Lindquist, S. The heat-shock response. **Annu Rev Biochem**.1986; 55:1151-91.

Lindquist, S e Ea Craig. The heat-shock proteins. **Annu Rev Genet**.1988; 22:631-77.

Literati-Nagy, B, E Kulcsar, Z Literati-Nagy, B Buday, E Peterfai, T Horvath, K Tory, A Kolonics, A Fleming, J Mandl e L Koranyi. Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial. **Horm Metab Res**.2009; 41(5):374-80.

Literati-Nagy, Z, K Tory, B Literati-Nagy, A Kolonics, Z Torok, I Gombos, G Balogh, L Vigh, Jr., I Horvath, J Mandl, B Sumegi, Pl Hooper e L Vigh. The HSP co-inducer BGP-15 can prevent the metabolic side effects of the atypical antipsychotics. **Cell Stress Chaperones**.2012; 17(4):517-21.

Liu, Y, L Gampert, K Nething e Jm Steinacker. Response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. **Front Biosci**.2006; 11:2802-27.

Ma, Jf, Bj Sanchez, Dt Hall, Ak Tremblay, S Di Marco e Ie Gallouzi. STAT3 promotes IFN γ /TNF α -induced muscle wasting in an NF- κ B-dependent and IL-6-independent manner. **EMBO Mol Med**.2017; 9(5):622-637.

Mann, Cj, E Perdiguero, Y Kharraz, S Aguilar, P Pessina, Al Serrano e P Munoz-Canoves. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skelet Muscle**.2011; 1(1):21.

Macintosh, B, Pf Gardiner; e Aj Mccomas. Skeletal muscleform and function. 2006. 423 p.

Marber, Ms, R Mestril, Sh Chi, Mr Sayen, Dm Yellon e Wh Dillmann. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. **J Clin Invest**.1995; 95(4):1446-56.

Mathieu, O, Lm Cruz-Orive, H Hoppeler e Er Weibel. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. **J Microsc**.1981; 121(Pt 1):75-88.

Matsakas, A e K Patel. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. **Histology and histopathology**.2009; 24(5):611-29.

Mcardle, A, Wh Dillmann, R Mestril, Ja Faulkner e Mj Jackson. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. **Faseb J**.2004; 18(2):355-7.

Mcardle, A, A Vasilaki e M Jackson. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. **Ageing Res Rev**.2002; 1(1):79-93.

Mccarthy, Jj e Ka Esser. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**.2010; 13(3):230-5.

Meulmeester, E e P Ten Dijke. The dynamic roles of TGF- β in cancer. **J Pathol**.2011; 223(2):205-18.

Miljkovic, N, Jy Lim, I Miljkovic e Wr Frontera. Aging of skeletal muscle fibers. **Ann Rehabil Med**.2015; 39(2):155-62.

Mitchell, Wk, J Williams, P Atherton, M Larvin, J Lund e M Narici. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. **Front Physiol**.2012; 3260.

Miyabara, Eh, Ms Aoki, Ag Soares e As Moriscot. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. **Cell Tissue Res.**2005; 319(3):479-89.

Miyabara, Eh, Tc Conte, Mt Silva, Il Baptista, C Bueno, Jr., J Fiamoncini, Rh Lambertucci, Cs Serra, Pc Brum, T Pithon-Curi, R Curi, Ms Aoki, Ac Oliveira e As Moriscot. Mammalian target of rapamycin complex 1 is involved in differentiation of regenerating myofibers in vivo. **Muscle Nerve.**2010; 42(5):778-87.

Miyabara, Eh, Jl Martin, Tm Griffin, As Moriscot e R Mestril. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. **Am J Physiol Cell Physiol.**2006; 290(4):C1128-38.

Miyabara, Eh, Tl Nascimento, Dc Rodrigues, As Moriscot, Wf Davila, Y Aitmou, Pp Detombe e R Mestril. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy. **Pflugers Arch.**2012; 463(5):733-41.

Morimoto, Ri, Mp Kline, Dn Bimston e Jj Cotto. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. **Essays Biochem.**1997; 32:17-29.

Motohashi, N, Ms Alexander, Y Shimizu-Motohashi, Ja Myers, G Kawahara e Lm Kunkel. Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. **J Cell Sci.**2013; 126(Pt 12):2678-91.

Muir, Ar, Ah Kanji e D Allbrook. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. **J Anat.**1965; 99(3):435-44.

Murakami, N, Is Mclellan, I Nonaka, K Koishi, C Baker e G Hammond-Tooke. Transforming growth factor-beta2 is elevated in skeletal muscle disorders. **Muscle Nerve.**1999; 22(7):889-98.

Murphy, Kt, V Cobani, Jg Ryall, C Ibebunjo e Gs Lynch. Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice. **Journal of applied physiology.**2011; 110(4):1065-72.

Naito, H, Sk Powers, Ha Demirel, T Sugiura, Sl Dodd e J Aoki. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. **J Appl Physiol.**2000; 88(1):359-63.

Narici, Mv e N Maffulli. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. **Br Med Bull.**2010; 95:139-59.

Nathan, Cf. Secretory products of macrophages. **J Clin Invest.**1987; 79(2):319-26.

O'leary, Mf, A Vainshtein, S Iqbal, O Ostojic e Da Hood. Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**.2012.

Olena, Af e Jg Patton. Genomic organization of microRNAs. **J Cell Physiol**.2010; 222(3):540-5.

Pereira, Mg, Mt Silva, Eo Carlassara, Da Goncalves, Pa Abrahamsohn, Ic Kettelhut, As Moriscot, Ms Aoki e Eh Miyabara. Leucine supplementation accelerates connective tissue repair of injured tibialis anterior muscle. **Nutrients**.2014; 6(10):3981-4001.

Pette, D e Rs Staron. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**.2000; 50(6):500-9.

Pilon, M e R Schekman. Protein translocation: how Hsp70 pulls it off. **Cell**.1999; 97(6):679-82.

Plesset, J, C Palm e Cs Mclaughlin. Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem Biophys Res Commun**.1982; 108(3):1340-5.

Po, A, F Begalli, L Abballe, V Alfano, Zm Besharat, G Catanzaro, A Vacca, M Napolitano, M Tafani, F Giangaspero, F Locatelli, E Ferretti e E Miele. beta-Arrestin1/miR-326 Transcription Unit Is Epigenetically Regulated in Neural Stem Cells Where It Controls Stemness and Growth Arrest. **Stem Cells Int**.2017; 20175274171.

Powers, Sk e Et Howley. *Fisiologia do Exercício*. 2005. 598 p.

Prisk, V e J Huard. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. **Histol Histopathol**.2003; 18(4):1243-56.

Salah, H, M Li, N Cacciani, S Gastaldello, H Ogilvie, H Akkad, Av Namuduri, V Morbidoni, Ka Artemenko, G Balogh, V Martinez-Redondo, P Jannig, Y Hedstrom, B Dworkin, J Bergquist, J Ruas, L Vigh, L Salviati e L Larsson. The chaperone co-inducer BGP-15 alleviates ventilation-induced diaphragm dysfunction. **Sci Transl Med**.2016; 8(350):350ra103.

Salvini, Tf, Ss Belluzzo, Hs Selistre De Araujo e Dh Souza. Regeneration and change of muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. **Toxicon**.2001; 39(5):641-9.

Schoenfeld, Bj. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. **Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association**.2010; 24(10):2857-72.

Schultz, E e Km McCormick. Skeletal muscle satellite cells. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.**1994; 123:13-57.

Senf, Sm, Sl Dodd e Ar Judge. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. **Am J Physiol Cell Physiol.**2010; 298(1):C38-45.

Senf, Sm, Sl Dodd, Jm Mcclung e Ar Judge. Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. **FASEB J.**2008; 22(11):3836-45.

Senf, Sm, Tm Howard, B Ahn, Lf Ferreira e Ar Judge. Loss of the inducible Hsp70 delays the inflammatory response to skeletal muscle injury and severely impairs muscle regeneration. **PLoS One.**2013; 8(4):e62687.

Serrano, Al, Cj Mann, B Vidal, E Ardite, E Perdiguero e P Munoz-Canoves. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. **Curr Top Dev Biol.**2011; 96:167-201.

Silva, Mt, Tl Nascimento, Mg Pereira, As Siqueira, Pc Brum, Rg Jaeger e Eh Miyabara. beta2-Adrenoceptor is involved in connective tissue remodeling in regenerating muscles by decreasing the activity of MMP-9. **Cell Tissue Res.**2016.

Smith, C, Mj Kruger, Rm Smith e Kh Myburgh. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. **Sports Med.**2008; 38(11):947-69.

Sousa-Victor, P, S Gutarra, L Garcia-Prat, J Rodriguez-Ubreva, L Ortet, V Ruiz-Bonilla, M Jordi, E Ballestar, S Gonzalez, Al Serrano, E Perdiguero e P Munoz-Canoves. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. **Nature.**2014; 506(7488):316-21.

Sousa-Victor, P e P Munoz-Canoves. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. **Mol Aspects Med.**2016.

Sugita, M, H Sugita, M Kim, J Mao, Y Yasuda, M Habiro, S Shinozaki, S Yasuhara, N Shimizu, Ja Martyn e M Kaneki. Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice. **Metabolism.**2011; 61(1):127-36.

Tajsharghi, H. Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. **Int J Mol Sci.**2008; 9(7):1259-75.

- Tang, Yf, Y Zhang, Xy Li, C Li, W Tian e L Liu. Expression of miR-31, miR-125b-5p, and miR-326 in the adipogenic differentiation process of adipose-derived stem cells. **OMICS**.2009; 13(4):331-6.
- Ten Broek, Rw, S Grefte e Jw Von Den Hoff. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. **J Cell Physiol**.2010; 224(1):7-16.
- Tiidus, Pm. Skeletal muscle damage and repair. Champaign, IL: Human Kinetics. 2008. xiii, 337 p. p.
- Tiidus, Pm, L Brown, A Brant, D Enns e Pj Bryden. Physiological, sensory, and functional measures in a model of wrist muscle injury and recovery. **Physiother Can**.2008; 60(1):30-9.
- Van Rooij, E, N Liu e En Olson. MicroRNAs flex their muscles. **Trends Genet**.2008; 24(4):159-66.
- Welle, S. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. **Can J Appl Physiol**.2002; 27(1):19-41.
- Wellen, Ke e Gs Hotamisligil. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**.2005; 115(5):1111-9.
- Wozniak, Ac, J Kong, E Bock, O Pilipowicz e Je Anderson. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. **Muscle & nerve**.2005; 31(3):283-300.
- Wu, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. **Annu Rev Cell Dev Biol**.1995; 11441-69.
- Wynn, Ta. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**.2008; 214(2):199-210.
- Zou, J, Y Guo, T Guettouche, Df Smith e R Voellmy. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. **Cell**.1998; 94(4):471-80.