

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

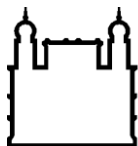
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MIOBLASTOS DE
MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Aline Araujo da Silva

RIO DE JANEIRO

Julho de 2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Aline Araujo da Silva

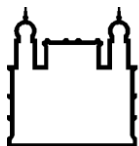
**PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MIOBLASTOS DE
MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Andrea Henriques Pons

RIO DE JANEIRO

Julho de 2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Aline Araujo da Silva

PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MIOBLASTOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Orientadora: Dra. Andrea Henriques Pons

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carmen Penido (Membro)

Prof. Dr. Ellen Mello (Membro)

Prof. Dr. Roberta Olmo (Membro)

Prof. Dr. Rubem Menna-Barreto (Revisor e Suplente)

Prof. Dr. Juliana De Meis (Suplente)

Rio de Janeiro, 17 de Julho de 2012

Araujo da Silva, Aline.

PARTICIPAÇÃO DA AUTOFAGIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MIOBLASTOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO / Aline Araujo da Silva. - Rio de Janeiro, 2012. 57 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.

Orientadora: Andrea Henriques Pons.

Bibliografia: f. 52-56

1. Músculo Esquelético. 2. Diferenciação Celular. 3. Autofagia. I. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre comandar minha vida, por ter me dado tudo o que tenho.

A minha orientadora Andrea Henriques por todo apoio científico e emocional, por ter me ensinado tanto, pelos fins de semana perdidos, por todo carinho e paciência. Não tenho mais palavras para descrever o quanto sou grata a você! Você é um anjo na minha vida.

Aos meus pais por serem essenciais na minha vida, por tudo o que tenho e sou. Devo minha vida a vocês!

Ao meu irmão Gil por ser um ótimo irmão, por sempre tentar me mostrar aspectos diferentes sobre vários assuntos e assim abrir minha cabeça para algumas idéias.

A minha amada avó Arcina por ser o pilar da minha família e nos ensinar que tudo é possível.

A minha enorme família por cada oração e incentivo. Amo cada um de vocês do fundo da minha alma.

A todos meus amigos por todos os conselhos e compreensão por não estar sempre presente. Amo vocês como minha família.

Ao meu querido Valter Arcanjo que, apesar do pouco tempo juntos, me ajudou muito.

A amiga Cristiane Bani por ter me apresentado à vida científica e me ensinado muito do que sei.

A amiga Cynthia Cascabulho por inúmeras vezes ter me socorrido na hora do sufoco. Você também é um anjinho na minha vida!

Ao amigo Marcelo Meuser por todas as dicas e a grande ajuda na realização de experimentos.

A amiga Aline Salgado pela força e disposição para me ajudar durante essa caminhada.

A amiga Natália por toda ajuda dada e oferecida na realização dos experimentos.

A amiga Jaciara por sempre dar sugestões e auxílio.

A amiga Daniela por sempre se prontificar a ajudar nas horas difíceis.

Ao amigo Rubem Menna-Barreto por sempre estar disposto a ajudar de todas as formas possíveis.

A todos os companheiros do Laboratório de Inovações em Terapia< Ensino e Bioprodutos (LITEB) por sempre colaborarem com tudo que foi preciso.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos Laboratório de Biologia Celular (LBC) e Laboratório de Biologia das Interações (LBI) pela ajuda e favores prestados.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Araujo da Silva

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia genética ligada ao cromossomo X que afeta 1 a cada 3.500 meninos nascidos vivos. A doença é caracterizada pela ausência funcional da distrofina, proteína essencial para a manutenção da integridade da fibra muscular. O paciente afetado apresenta dificuldades em deambular já na primeira infância e geralmente vem a óbito por volta da 2ª década de vida por insuficiência cardiorespiratória. Um dos modelos de estudo mais utilizados é o camundongo *mdx/mdx*, que apresenta uma mutação espontânea no cromossomo X e, apesar da doença não ser letal nesses animais, a sua progressão é semelhante a doença em humanos, principalmente no músculo diafragma. A fragilidade das fibras musculares devido à falta da distrofina leva à sua morte, principalmente por necrose, e resposta inflamatória crônica. Além do quadro degenerativo apresentado, a regeneração de fibras musculares tem um papel muito importante na progressão da doença e a formação de novas fibras depende da diferenciação de células progenitoras (mioblastos) encontrados nos músculos esqueléticos. Nosso objetivo é avaliar se a ativação da via autofágica leva à diferenciação de mioblastos e não à morte celular, baseando nossos resultados na ativação da molécula LC3-I, marcador típico de autofagia. Observamos por imunohistoquímica intensa marcação para LC3-I em fibras musculares jovens e mioblastos, sendo detectado ainda em mioblastos da linhagem C2C12, quando cultivados em meio pobre em nutrientes (estímulo clássico de indução autofágica), a capacidade de iniciar o processo de diferenciação com alta viabilidade celular, confirmada por citometria de fluxo. A avaliação por *Western Blotting* de células em diferenciação mostrou a alta expressão de LC3-I após 24 e 48 h de indução. Além disso, quando as células de linhagem C2C12 são cultivadas durante 24 h em meio de diferenciação contendo os inibidores de PI3K tipo III, 3-MA e Wortmanina (bloqueadores de autofagia), há uma redução na ativação de LC3-I, mas as células ainda se diferenciam. Nossos dados mostram que o processo de diferenciação de mioblastos ativa pelo menos as etapas iniciais da via de autofagia, mas aparentemente há vias alternativas independentes de PI3K tipo III e LC3.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Araujo da Silva

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked myopathy that affects 1 in every 3,500 male children born alive. The disease is characterized by the absence of functional dystrophin, an essential protein for maintaining muscle fiber integrity. The locomotion of affected patients is reduced since early childhood and usually the death occurs around the 2nd decade of life due to cardiorespiratory failure. One of the experimental models most commonly used is the *mdx/mdx* mice, which have a spontaneous mutation on the X chromosome. Although the disease is not lethal for these animals, the progression is similar to the human disease, especially in the diaphragm. The weakness of muscle fibers due to the lack of dystrophin leads to its cell death, mainly by necrosis, presenting chronic inflammatory response. In addition to degeneration, the regeneration of muscle fibers has a very important role in the progression of the disease and formation of new fibers relies on the differentiation of progenitor cells (myoblasts) found in skeletal muscles. Our goal is to evaluate whether the activation of autophagy leads to differentiation of myoblasts and not to cell death. basing our results on the activation of LC3-I, a well-known marker of autophagy. In immunohistochemistry assays, it was detected an intense LC3-I labelling in young muscle fibers and myoblasts. The incubation of C2C12 myoblast lineage in nutrient-poor medium (stimulus classic autophagic induction), trigger the process of differentiation, while high cellular viability was confirmed by flow cytometry. The evaluation blotting of cell differentiation by *Western Blotting* showed high expression of LC3-I after 24 and 48 hours of induction. Furthermore, when the cell line C2C12 is maintained for 24 hours in medium containing the PI3K III inhibitors 3-MA or wortmannin (autophagy blockers), a reduction in the activation of LC3-I is observed, however the cells still differentiate. Our data show that the process of differentiation of myoblasts activates at least the initial steps of autophagy, suggesting the existence of alternative PI3K III and LC3 independent pathways .

LISTA DE ABREVIATURAS

APAF-1.....	Fator apoptótico 1 ativador de proteases
ATGs.....	Genes relacionados à autofagia
Beclina 1.....	Homólogo de Atg6
CAD.....	DNase ativada por caspase
CK-MB.....	Creatina quinase subtipo MB
CK-NAC.....	Creatina quinase subtipo NAC
CS.....	Células satélites
d-ATP.....	Desoxiadenosina trifosfato
DGC.....	Complexo de glicoproteínas associadas à distrofina
DMD.....	Distrofia muscular do tipo Duchenne
FasL.....	Ligante de Fas
FIP200.....	Proteína de interação
hsc70.....	Proteína cognato de choque térmico 70
hVps34.....	Vps34 humana
IAP.....	Proteína inibidora de apoptose
ICE.....	Enzima conversora de IL-1 β
IL-1 β	Interleucina-1 β
LAMP-2.....	Proteína de membrana 2 associada ao lisossomo
Lamp2a.....	Proteína de membrana 2 associada ao lisossomo-a
LC3.....	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos

MRF.....Fatores de regulação miogênica

mTOR.....TOR de mamíferos

mTORc-1.....Complexo-1 da mTOR

Myf-5.....Fator miogênico 5

MyoD.....Proteína 1 de determinação de mioblastos

nNOS.....Óxido nítrico sintase neuronal

p150.....Homólogo do Vps15

pAMPK.....Proteína quinase ativada

Pax7..... Proteína 7 de emparelhamento

PdtIns3K.....Fosfatidilinositol 3 quinase

PE.....Fosfatidiletanolamina

RAPTOR.....Proteína associada a regulação de mTOR

RIPK-1.....Proteína quinase de interação ao receptor 1

RIPK-3.....Proteína quinase de interação ao receptor 3

ROS.....Espécies reativas de oxigênio

TNF.....Fator de necrose tumoral

TOR.....Alvo da rapamicina

ULK1/2.....Quinase semelhante a Unc-51

UVRAG.....Gene associado a resistência a radiação ultravioleta

Vps..... Proteína de classificação vacuolar

ÍNDICE

1-	Introdução.....	12
1.1-	Características gerais.....	12
1.2-	Músculo esquelético.....	12
1.3-	Distrofina e o complexo DGC.....	15
1.4-	Camundongos <i>mdx/mdx</i> – um modelo de estudo da DMD.....	16
1.5-	A distrofia muscular de Duchenne.....	18
1.6-	Diferenciação celular/muscular.....	20
1.7-	Morte celular.....	21
1.8-	Autofagia e diferenciação celular.....	26
2-	Objetivos.....	28
2.1-	Objetivo geral.....	28
2.2-	Objetivos específicos.....	28
3-	Materiais e métodos.....	29
3.1-	Animais.....	29
3.2-	Coleta de tecidos musculares.....	29
3.3-	Imunohistoquímica.....	29
3.4-	Marcação por TUNEL.....	30
3.5-	Cultura de células.....	30
3.6-	Avaliação de viabilidade por citometria de fluxo.....	30
3.7-	<i>Western Blotting</i>	31
3.8-	Microscopia eletrônica de transmissão.....	31
3.9-	Atividade da creatina quinase sérica (CK-NAC).....	32
4-	Resultados.....	33
5-	Discussão.....	46
6-	Conclusão.....	50
7-	Perspectivas.....	51
8-	Referências.....	52

1- INTRODUÇÃO

1.1- Características gerais

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia genética recessiva ligada ao cromossomo X que afeta um a cada 3.500 meninos nascidos vivos (van Putten e cols., 2012). Mutações no locus Xp21 do cromossomo X resultam na produção truncada da distrofina ou na sua ausência. A distrofina é uma proteína essencial no complexo glicoproteico (DGC) que liga a matriz extracelular ao citoesqueleto da fibra muscular. Acredita-se que a associação do complexo estrutural composto por componentes de matriz extracelular/complexo DGC/distrofina/citoesqueleto participe da manutenção da integridade da membrana da célula muscular esquelética e cardíaca. Os pacientes afetados pela DMD apresentam dificuldade em deambular já na primeira infância e o curso inexorável da doença progride até que ocorra o óbito geralmente na segunda década de vida por insuficiência cardiorrespiratória. A redução na capacidade respiratória ocorre principalmente devido ao contínuo processo degenerativo do músculo diafragma (Manzur & Muntoni, 2009), mas também pelo enfraquecimento da musculatura de sustentação, que leva à acentuada escoliose.

Por ser uma doença genética, não existe ainda terapia curativa até o momento. O tratamento dos pacientes distróficos é paliativo, baseado no uso de glicocorticóides (da Silva e cols., 2012), cirurgias ortopédicas e fisioterapia (Takaso e cols., 2010) na tentativa de prolongar e melhorar a qualidade de vida do doente.

1.2- Músculo Esquelético

A principal função do tecido muscular esquelético é gerar força e induzir movimento voluntário. Este tecido é composto por diversos tipos celulares e a miofibrila esquelética é responsável por essa característica motora. As miofibrilas são células multinucleadas (Fig. 1.1A) formadas a partir da fusão de precursores de mioblastos após lesões e durante o desenvolvimento embrionário. Estas células se ligam a lamina basal da matriz extracelular e

às proteínas do citoesqueleto como actina/miosina e filamentos intermediários através do complexo proteico (DGC), presente no sarcolema. Além de ser responsável pela manutenção da integridade da membrana, este complexo atua na transdução de sinais do ambiente e auxilia na organização das estriações das miofibras. Estas miofibras são formadas por miofibrilas que por sua vez são constituídas por inúmeros sarcômeros, unidade básica da fibra muscular. O sarcômero é constituído principalmente por filamentos de actina e miosina, além de outras proteínas como a desmina, troponina e tropomiosina (Rassier & Pavlov, 2012). Um sarcômero é delimitado por duas linhas Z, estando uma centralizada entre duas semibandas I, enquanto que a banda A está localizada entre duas bandas I (Fig 1.1B).

Um componente essencial para a contração uniforme das fibras musculares é o sistema de túbulos transversais (sistema de túbulos T), o qual é caracterizado por uma rede de invaginações tubulares do sarcolema. As junções das bandas A e I de cada sarcômero são envolvidas por ramos da rede formada por este sistema. Em cada lado do túbulo T existe uma expansão do retículo sarcoplasmático e este complexo é conhecido como tríade. Na tríade, a despolarização dos túbulos T é transmitida ao retículo sarcoplasmático para liberação de Ca^{++} e contração muscular (Stephenson, 2006) (Fig 1.1C).

As principais estruturas do músculo esquelético são envolvidas por diferentes camadas de tecido conjuntivo. O epimísio que recobre o músculo em toda sua extensão, o perimísio envolve cada fascículo que é formado pela união de feixes de fibras musculares e o endomísio que recobre individualmente cada fibra muscular (Purslow, 2010). Essa disposição do tecido conjuntivo mantém as fibras musculares juntas e permite certa liberdade de movimento entre elas. Esses revestimentos se prolongam do músculo até os tendões que são ricos em colágeno, cuja função é fixar o músculo ao osso (Fig. 1.2). O tecido conjuntivo também está presente revestindo os vasos e nervos que irrigam e inervam os músculos.

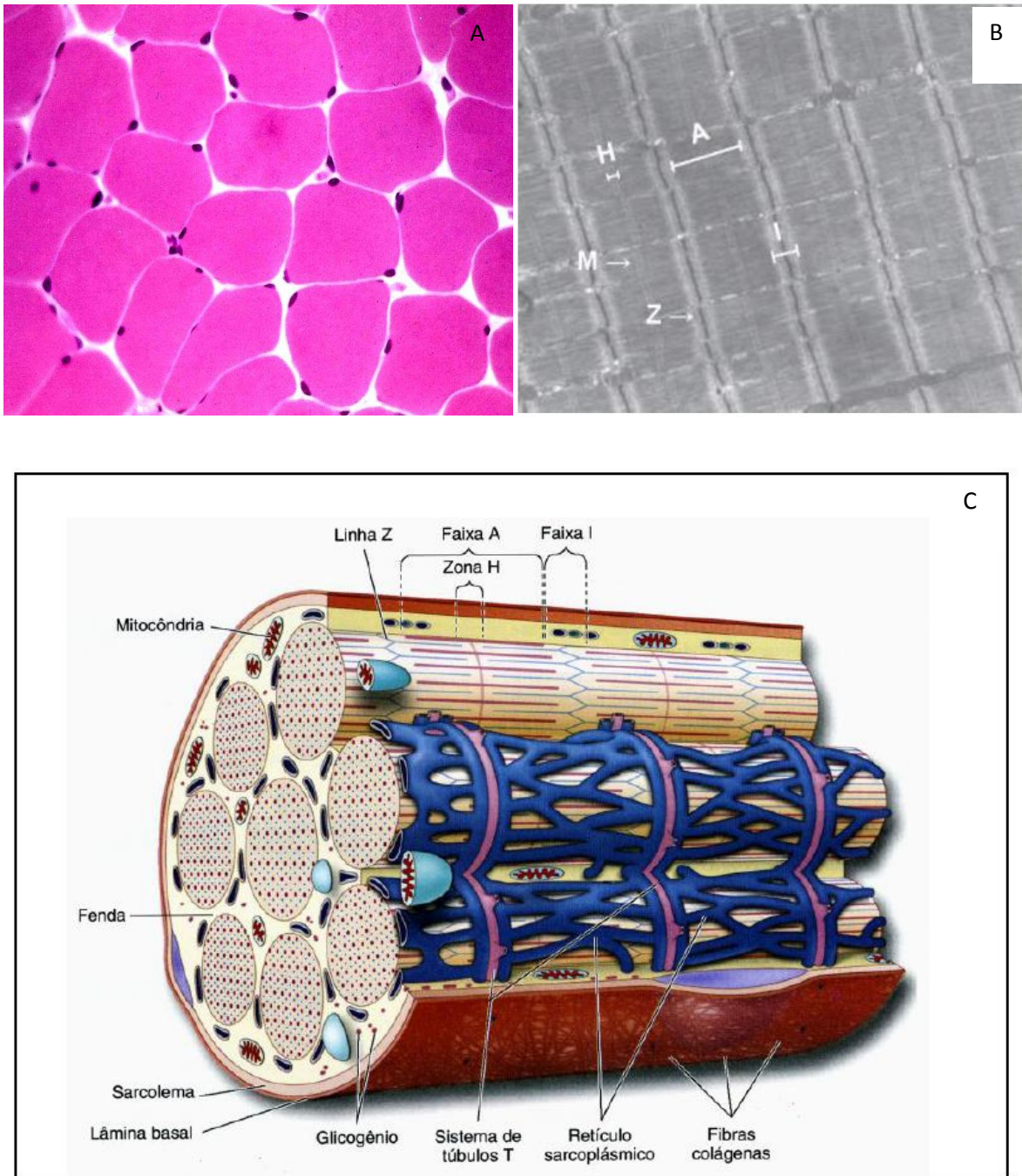


Figura 1.1: Características gerais do tecido muscular e da fibra esquelética. A: Características gerais do tecido estriado esquelético por coloração de hematoxilina e eosina em microscopia de luz (<http://anatpat.unicamp.br/muscnlHE2+.jpg> ; acesso em: 30 de junho de 2012); B: sarcômeros mostrados por microscopia eletrônica de transmissão (Silva & Carvalho, 2007); C: Sistema de túbulos T dentro de uma fibra muscular (adaptado de Mcardle, 2003).

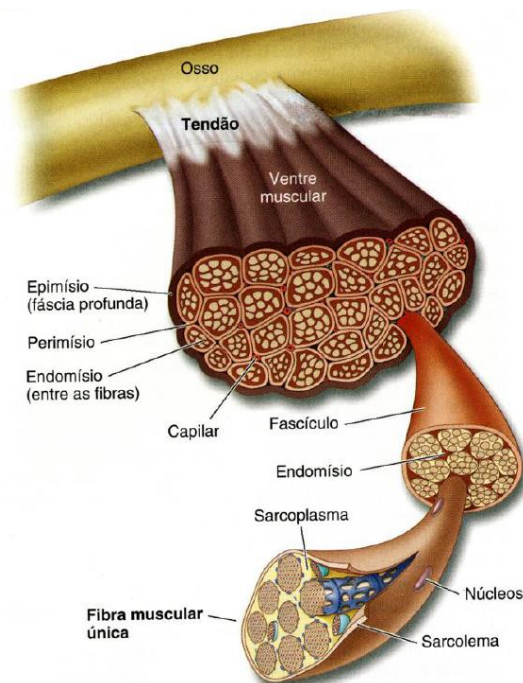


Figura 1.2: Corte transversal das estruturas do músculo esquelético e arranjo dos seus revestimentos de tecido conjuntivo (adaptado de Mcardle, 2003).

Uma linhagem de células muito utilizada em experimentos de diferenciação celular é a C2C12. Esses mioblastos são derivados de músculo esquelético de camundongos C3H (*mus musculus*). Quando mantidas em cultura até a sua confluência essas iniciam o processo de diferenciação, mostrando grande capacidade na formação de miotubos multinucleados através do alinhamento e fusão de várias dessas células (Jahn, 1994). Outra forma de induzir diferenciação de mioblastos é a substituição de meio rico em nutrientes por meio pobre (Crescenzi, 1994).

1.3- Distrofina e o complexo DGC

A integridade da fibra muscular depende da manutenção de sua estrutura e organização. O complexo proteico (DCG), responsável por estabilizar a fibra muscular especialmente

durante a contração do músculo, é parte essencial para manter as condições de homeostase deste tecido. O DGC é composto pelas proteínas sarcoglicanas (α , β , γ , δ , ϵ , e ζ), distrobrevinas (α e β), sintrofinas (α e β), sarcospan, caveolina-3, distroglicana (α e β), além da própria distrofina e da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Lapidos e cols., 2004; Moorwood e cols., 2011; Gumerson & Michele, 2011). Com 427 kDa, a distrofina é a maior proteína que participa do DGC (Fig. 1.3). É uma proteína que possui quatro domínios funcionais, sendo no domínio amino terminal o ponto de ligação ao citoesqueleto, através do domínio amino terminal da proteína γ -actina e o domínio carboxi terminal. Neste domínio há ainda a interação com outras proteínas do DGC, como as sintrofinas e a β -distroglicana. A distrofina possui ainda um domínio central com 25 triplas hélices contendo aproximadamente 3.000 resíduos de aminoácidos e um domínio rico em cisteína com 280 aminoácidos. A ausência da distrofina confere excessiva fragilidade à fibra muscular pelo comprometimento da estabilidade do sarcolema, a contração muscular normal leva ao dano da fibra e conseqüente morte principalmente por necrose (Muntoni e cols., 2003; Deconinck & Dan, 2007; Ervasti; 2007).

1.4- Camundongos *mdx/mdx* – um modelo de estudo da DMD

Os camundongos *mdx/mdx* apresentam uma mutação espontânea no códon terminal do éxon 23 do gene da distrofina (Widrick e cols., 2011). Os *mdx/mdx* foram identificados em colônias de camundongos C57BL/10 por apresentarem altas concentrações de enzimas musculares, como creatina quinase subtipo NAC e MB, no soro e padrões de lesão histológica muscular semelhante aos humanos com DMD (Bulfield e cols., 1984). Também são encontradas alterações histológicas nos músculos desses camundongos como necrose de miofibras, fibrose e inflamação (Cerri e cols., 2008).

Apesar de não ser letal nesses camundongos, alguns músculos como o diafragma, têm a progressão da doença bastante semelhante aos humanos. Acredita-se que a doença não seja letal no camundongo *mdx/mdx* pela reversão da expressão da distrofina em diversas fibras musculares por mecanismos ainda desconhecidos. Além disso, há a substituição parcial da distrofina por uma proteína homóloga, a utrofina (Fig X), uma proteína que substitui estruturalmente a distrofina (Porter, 2008). Animais duplo-deficientes em distrofina e utrofina

(*mdx/mdx/utrn*^{-/-}) apresentam um quadro grave da doença, que se assemelha à doença em humanos. Esses animais apresentam retardo no crescimento, perda de peso e morte prematura (Li e cols., 2010).

O Complexo Proteico Associado à Distrofina

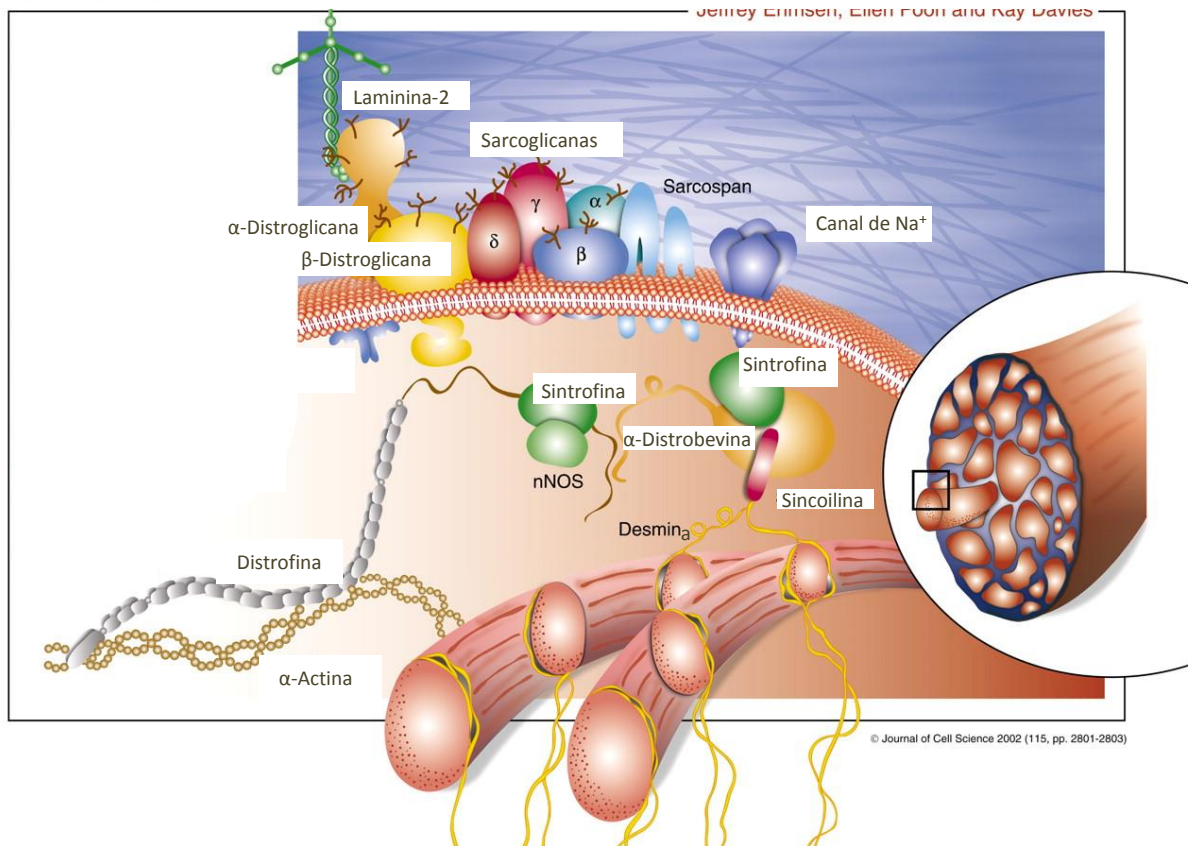


Figura 1.3: Complexo proteico (DGC) e seus componentes (adaptado de Ehmsen, 2002).

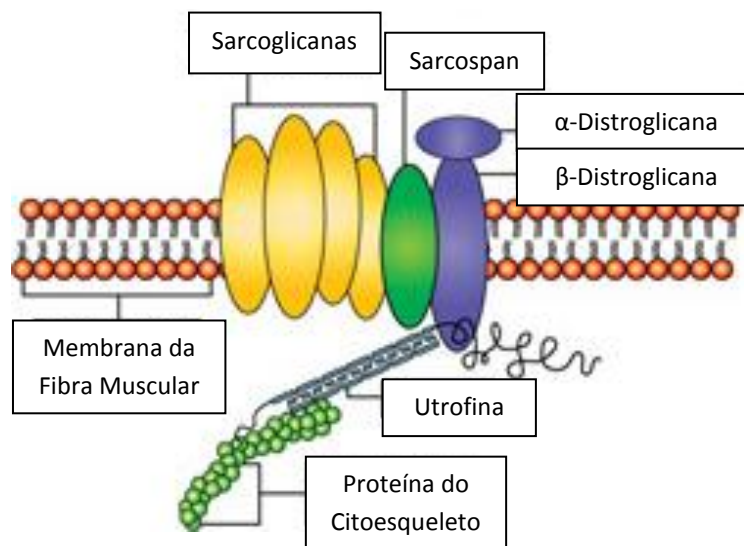


Figura X: Localização e interação da utrofina com as proteínas do complexo glicoproteico. (Adaptado de <http://wikis.lib.ncsu.edu/index.php/Image:Utrophin.jpg>; acesso em 27 de agosto de 2012)

Apesar dos camundongos apresentarem certas limitações no estudo da DMD pela progressão diferenciada da doença, estes animais são ferramentas imprescindíveis na pesquisa, pelo fácil manuseio e pelas semelhanças genéticas e na resposta inflamatória, além de serem um bom modelo para os estudos de subpopulações de células progenitoras indiferenciadas para regeneração. Um dos aspectos mais relevantes do estudo da DMD é a avaliação de mecanismos de indução e controle da resposta inflamatória crônica, tanto em humanos como em modelos experimentais.

1.5- A distrofia muscular de Duchenne (DMD)

A falta da distrofina torna as células musculares frágeis e assim suscetíveis à morte, principalmente necrótica, devido à contração normal das fibras. As múltiplas fibras mortas são fundamentais para recrutar e ativar células inflamatórias e levar à diferenciação de células progenitoras que possam gerar novas fibras musculares ou se fundir a fibras danificadas. A

reposição gradual de fibras musculares por colágeno (fibrose) e tecido adiposo confere a aparência hipertrófica característica da musculatura esquelética na doença. A gravidade da DMD está associada à ação dos diversos componentes do processo inflamatório crônico na musculatura esquelética, havendo a liberação de citocinas, quimiocinas, adesão celular aos vasos e transmigração de leucócitos para o sítio de inflamação. Ao redor das fibras necróticas é possível observar a presença maciça de macrófagos e outras células mielóides e em menor frequência linfócitos. A depleção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ou macrófagos *in vivo*, reduz significativamente a gravidade da DMD em camundongos *mdx/mdx* (Lagrotta-Candido e cols., 2002; Deconinck & Dan, 2007), mostrando a importância da resposta imune na patologia. Além disso, a terapia de imunossupressão geral com glicocorticóides melhora a contração muscular, previne a escoliose, prolonga significativamente a capacidade de andar, além de retardar o óbito (Deconinck & Dan, 2007, Bushby e cols., 2010).

Apesar das células inflamatórias terem um papel muito importante no agravamento da DMD, a presença do processo inflamatório é essencial para o recrutamento e ativação de células com potencial para regenerar as fibras musculares lesadas. Diferentes tipos celulares que possuem capacidade de regenerar a musculatura esquelética já foram descritos. As células satélites (CS) são assim chamadas por estarem presentes em grandes quantidades na periferia das células musculares, sendo células indiferenciadas e principais responsáveis pelo reparo e manutenção das fibras do músculo adulto. Essas células permanecem em estado de repouso por longos períodos de tempo, e em resposta a danos no tecido muscular, proliferam e passam a expressar marcadores específicos de linhagens celulares com potencial miogênico. Estas células podem desencadear duas vias celulares bastante distintas, que são a autorenovação, na qual múltiplos ciclos de proliferação ocorrem para manter a população de CS, e diferenciação terminal para miotubos. Estas vias envolvem a expressão sequencial e combinada de fatores transcricionais miogênicos, tais como *paired box protein 7* (Pax7) e membros da família de fatores de regulação miogênica (MRF) como Myf-5, MyoD, miogenina e MRF-4. Acredita-se que CS em autorenovação expressem Pax7 e MyoD ao mesmo tempo e talvez ainda Myf5. Já as células que iniciam a diferenciação expressam em sua maioria Pax7, em seguida MyoD e finalmente miogenina, que é um marcador de estágios finais de diferenciação (Braun & Gautel, 2011). Embora esses marcadores de linhagem muscular sejam facilmente observados em músculos distróficos, ainda não são completamente esclarecidas quais moléculas complementares e vias bioquímicas disparam a ativação dessas células em cada uma das vias.

Na DMD, as novas fibras originadas da diferenciação das CS também não expressam a distrofina e alguns autores propõem que acontece o esgotamento da capacidade proliferativa dessas células satélites no músculo distrófico (Collins & Morgan, 2003). Por este motivo, muitos grupos buscam outras populações celulares com potencial miogênico mais prolongado e de restauração da expressão de distrofina no tecido muscular esquelético. Apesar das terapias baseadas no uso de células-tronco serem fortes candidatas para o tratamento da DMD, muitos estudos ainda são necessários para que esta possibilidade terapêutica torna-se viável (Vieira e cols., 2008; Farini e cols., 2009).

1.6- Diferenciação celular/muscular

Por ser um tecido constantemente exposto ao estresse mecânico, as células da musculatura esquelética estão sujeitas a lesões frequentes. Para a manutenção da funcionalidade desse tecido, existe um processo de regeneração contínuo e várias células são candidatas à função regenerativa no músculo esquelético. Apesar das CS terem um papel bem definido na regeneração muscular esquelética, existem outras populações celulares tais como células-tronco derivadas de músculo (mdsc), células-tronco CD133⁺, células-tronco hematopoiéticas, pericito e mesoangioblastos (Figeac e cols., 2007). Além das células residentes nos músculos, existem outros grupos celulares capazes de se diferenciar em células musculares esqueléticas, como as células-tronco da medula óssea (Usas & Huard, 2007).

As CS são encontradas em um estado quiescente abaixo da lâmina basal, entre as fibras musculares, e quando ativadas passam a ser chamadas de mioblastos. As CS quiescentes são morfológicamente diferentes das ativadas, uma vez que a relação núcleo/citoplasma é maior nas células ativadas, assim como há um aumento do número de organelas intracelulares e diminuição da heterocromatina. As CS inicialmente foram consideradas células-tronco monopotentes ou seja, capazes de originar apenas células musculares. Porém, vários estudos *in vitro* mostram que essas células podem se diferenciar em osteócitos e adipócitos (Asakura, 2007), tendo grande capacidade de proliferação. Essas células originam células filhas precursoras miogênicas essenciais para o crescimento pós-natal e regeneração muscular (Aziz e cols., 2012). Células-tronco musculares são positivas para o marcador hematopoiético de

antígeno 1 de células-tronco (Sca-1), entretanto não expressam nenhum marcador de CS. Por sua vez, as células CS são negativas para Sca-1 e não dão origem a células hematopoiéticas (Asakura, 2007). Pode-se encontrar células Sca-1⁺ em diversos tecidos como glândulas mamárias, fígado, coração, próstata, músculo esquelético e o sistema hematopoiético (Kafadar, 2009). Desta forma, pode-se observar que a alteração genética leva ao dano muscular inicial, o qual é amplificado pela resposta inflamatória local, gerando danos secundários ao tecido e manutenção de resposta inflamatória crônica. Todo este quadro coloca os processos de morte celular no centro da patogenia da DMD.

1.7- Morte celular

A morte celular, enquanto processo controlado e orquestrado bioquimicamente, foi sugerida no final da década de 60 em 1966 (Lockshin, 1966), levando a formação do conceito da apoptose alguns anos depois (Kerr, 1972). Atualmente se conhecem diferentes tipos de morte celular, sendo os principais: apoptose, necrose e autofagia (Hotchkiss, 2009). A apoptose é considerada um tipo de morte ativa e silenciosa, na qual existe uma sequência de processos muito bem definidos que minimizam os danos resultantes da morte de uma célula ao tecido adjacente. A apoptose possui sequência de alterações morfológicas bem característica, como condensação citoplasmática e da cromatina, formação de fragmentos celulares envoltos por membrana plasmática íntegra (corpos apoptóticos), que são capturados por células fagocíticas e degradados em seus lisossomos (Reed, 2000). A ocorrência da apoptose em uma célula está relacionada à ativação de uma cascata de proteases chamadas caspases que em células vivas, são proteínas monoméricas inativas e principalmente encontradas no citoplasma. Quando ocorre a sinalização para a morte celular, ocorre a ativação da enzima através da clivagem proteolítica de dois monômeros inativos formando um heterotetrâmero. Em um primeiro momento, ocorre uma primeira clivagem que separa a molécula em uma subunidade maior e outra menor, e em um segundo evento, uma nova clivagem retira o pró domínio.

As caspases são divididas em caspases iniciadoras como as caspases 8, 9, 10 e 12 (em camundongos), e executoras, como as caspases 3, 6 e 7. Porém, nem todas as caspases estão envolvidas em morte celular. Por exemplo, a caspase 1 induz ativação proteolítica de IL-1 β e inicialmente era chamada de ICE (enzima conversora de IL-1 β). As vias de ativação das

caspses podem ser: extrínseca, via receptores na membrana celular, ou intrínsecas, iniciadas na mitocôndria ou retículo endoplasmático. Na via intrínseca há a liberação de citocromo c e Smack/Diablo da mitocôndria, possivelmente através do poro de transição de permeabilidade (poro PT). O citocromo c se associa à APAF-1 citoplasmática e a Smack/Diablo libera a pro caspase 9 da associação com uma proteína inibidora de apoptose chamada IAP (proteína inibidora de apoptose)(Cullen, 2008). Na ausência da IAP, o complexo formado pela pelo citocromo c, APAF-1 e d-ATP denominado apoptossomo cliva a pro caspase 9 em caspase 9 ativa. No retículo endoplasmático, a pró caspase 12 é ativada pela calpaína, porém esta via tem sido descrita apenas em células murinas e não em humanas. Uma vez ativando a primeira caspase, as seguintes são ativadas em cascata por clivagem proteolítica. Cada caspase tem um grupo de proteínas alvo a serem degradadas dentro das células em apoptose, tais como o inibidor da enzima CAD (*caspase activated deoxyribonucleotidyl*), gelsolina, componentes da lâmina nuclear, componentes do citoesqueleto dentre outros (Vaughan, 2002). A apoptose geralmente está associada a pouco dano aos tecidos adjacentes às células em processo de morte e ausência de inflamação, permitindo a reutilização de componentes derivados das células apoptóticas (Fink & Cookson, 2005).

Por outro lado, a necrose é frequentemente associada a um tipo de morte acidental, uma vez que não existe um controle no disparo ou via de indução deste tipo de morte celular (Christofferson & Yuan, 2010). Na necrose há o rompimento da membrana plasmática e de organelas celulares e com o extravasamento de conteúdo intracelular há o disparo de resposta inflamatória local (Fink & Cookson, 2005; Kitsis & Molkentin, 2010; Moquin & Chan, 2010). Além disso, alguns autores descrevem a necroptose, ou necrose celular programada independente de caspses (Tait & Green, 2008), como um tipo de necrose na qual a sua ativação depende da participação de fatores como TNF (Fator de Necrose Tumoral) e FasL, geralmente associados com a ativação da via apoptótica, essenciais para a indução desse tipo de morte (Ye e cols., 2011). Além de outros processos bioquímicos como a ativação da RIPK-1 (proteína quinase de interação ao receptor 1) e RIPK-3, associada a altos níveis de ROS (espécies reativas de oxigênio) e permeabilidade de membranas mitocondriais e lisossomais (Kepp e cols, 2011).

Outro processo que frequentemente é associado à morte celular é a autofagia. Porém, nem sempre a ocorrência da autofagia está associada à morte, pois é um mecanismo natural de degradação de componentes não funcionais para reaproveitamento intracelular e em geral

ocorre em níveis basais (Barth, 2010). No entanto, quando a célula é exposta a baixos níveis de nutrientes, esta via é exacerbada. Acredita-se que esta resposta inicial é uma via de sobrevivência da célula, que busca reaproveitar componentes intracelulares. Porém, se houver deprivação nutricional prolongada, os níveis de autofagia podem ser bastante elevados e levar a célula efetivamente à morte.

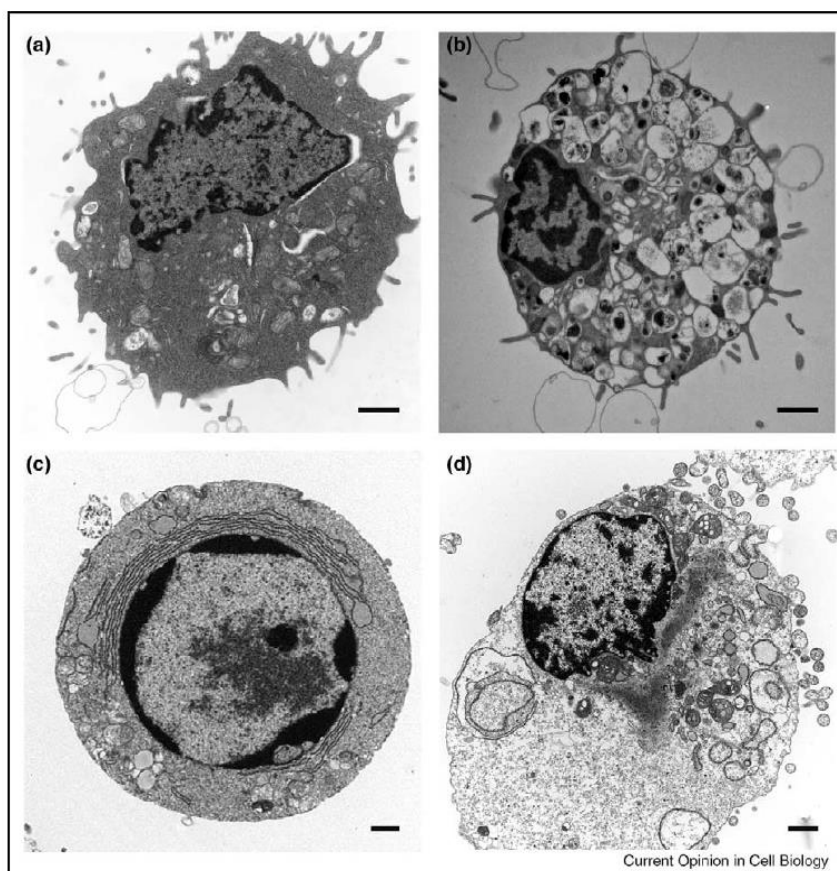


Figura 1.4: Morfologia dos tipos de morte celular. (a) célula viável, (b) célula em autofagia, (c) célula em apoptose e (d) célula em necrose (Edinger & Thompson, 2004)

A autofagia propriamente dita consiste em um mecanismo de degradação de proteínas, organelas e outros componentes celulares (Di Bartolomeo e cols., 2010). Em situações de falta de nutrientes, a degradação desses componentes funciona na obtenção de aminoácidos para a síntese de novas proteínas que sejam essenciais para o metabolismo celular. As alterações morfológicas na autofagia são bem caracterizadas pela presença de vacúolos de membrana dupla (autofagossomos), embora a membrana interna desta vesícula seja degradada após a fusão

com lisossomos (Chen e cols., 2011). Apesar do destino final ser sempre os lisossomos, a via pela qual o material é encaminhado para essa organela pode variar. Sendo assim, a autofagia pode ser classificada como macroautofagia (comumente referida apenas como autofagia), microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (Yang & Klionsky, 2010). A macroautofagia é caracterizada pela presença de autofagossomos que se fundem aos lisossomos formando os autolisossomos (Glick e cols., 2010). Na microautofagia ocorre apenas a invaginação da membrana lisossomal envolvendo o material que será degradado. Já na autofagia mediada por chaperonas é um processo de degradação de proteínas-alvo citoplasmáticas que expõem uma sequência de cinco aminoácidos (KFERQ) para chaperonas, dentre as quais principalmente a hsc70. A proteína alvo então é translocada através da membrana lisossomal por uma estrutura composta por monômeros de Lamp2a e é degradada (Lee & Lee, 2012).

A regulação e a realização do processo autofágico contam com a participação de vários componentes (Fig. 1.5). Os genes identificados que possuem relação com a ocorrência da autofagia são coletivamente chamados de ATGs (genes relacionados à autofagia). Existem descritos pelo menos 34 ATGs em leveduras e muitos destes são conservados em humanos (Weidberg e cols., 2011). Na maioria dos organismos onde a via autofágica encontra-se ativa, um componente importante para a sua regulação é a TOR (alvo da rapamicina), sendo em mamíferos denominada mTOR. A mTOR pode estar associada a dois complexos distintos, sendo que o complexo 1 (mTORc-1) é o que induz morte celular por autofagia e está associado a proteínas como a RAPTOR (proteína associada com a regulação de mTOR) dentre outras. Já a interação de mTOR com o complexo Atg13-ULK1/2 (*Unc-51-like kinase*)-FIP200 (*Family interacting protein*)-Atg10 impede a ativação da via autofágica. Em situação de escassez de nutrientes, a mTOR se desliga do complexo como resultado de mudanças na fosforilação do complexo por ação da pAMPK (Aymard e cols., 2011), ativando a quinase ULK1/2 que fosforila Atg13 e FIP200 induzindo autofagia (Chen e cols., 2011).

A origem da membrana do autofagossomo ainda não é totalmente esclarecida, sendo dentre as hipóteses descritas até o momento o retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndria e membrana plasmática, as principais possibilidades (Weidberg e cols., 2011). A ativação do complexo PtdIns3K (fosfatidilinositol 3 quinase) é essencial para a formação do fagossomo inicial. O complexo I composto pela Vps34 (*vacuolar protein sortin*), Atg6 (Vps30),

Atg14 e Vps15 e o complexo II composto Vps34, Vps15, Atg6 e Vps38. Diferentemente de leveduras, os mamíferos possuem dois tipos de PdtIns3K, de classe I, e classe III, com funções de regulação negativa e positiva da autofagia. O complexo de classe III é composto por hVps34 (humanVps34), Beclina 1 (homólogo de Atg6), p150 (homólogo do Vps15) e os recém identificados Atg14L (Atg14-Like) e UVRAG (gene associado a resistência a radiação ultravioleta), ortólogos de Atg14 e Vps38, respectivamente (Yang & Klionsky, 2010).

Duas proteínas e seus sistemas conjugados são essenciais para a expansão e alongamento da membrana do autofagossomo: Atg12 e Atg8 ou LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos) em mamíferos. As enzimas Atg7 e Atg10 catalisam a conjugação da Atg12 com a Atg5, depois ocorre uma interação não covalente entre o complexo Atg12-Atg5 com Atg16. A enzima Atg4 cliva o LC3 na sua porção C terminal gerando o LC3-I. Em seguida, a conjugação do LC3-I com a fosfatidiletanolamina (PE) dá origem ao LC3-II e é catalisada pela Atg7 e Atg3 (Yang & Klionsky, 2010; Glick e cols., 2010). A fusão entre o autofagossomo e o lisossomo é mediada pela Rab7 e pela proteína lisossomal transmembrana LAMP-2 (proteína de membrana 2 associada ao lisossomo), sendo a degradação do conteúdo autofagossomal decorrente da atividade de várias proteases como a catepsinas D, B e L (Lee & Lee, 2012).

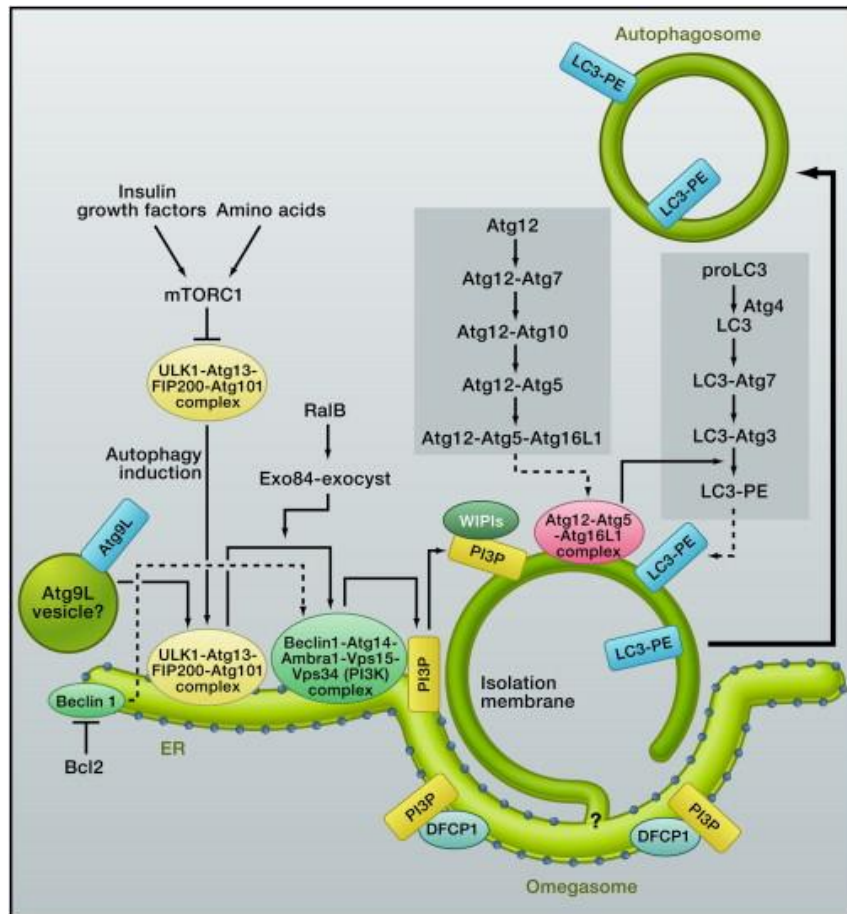


Figura 1.5: Autofagia e seus componentes. (<http://2.bp.blogspot.com/-6gRodb6RWWY/TsvjLUHJTEI/AAAAAAAAANSa/3UCOqud1FmM/s1600/autophagy2.jpg>; acesso em: 30 de junho de 2012).

1.8- Autofagia e diferenciação

O estímulo clássico *in vitro* para a indução de autofagia é o estresse nutricional, onde as células são cultivadas em meio pobre em nutrientes. Porém, em algumas células há a indução de diferenciação e não morte. Desta forma, dependendo do tipo celular e do tempo de estresse nutricional no qual a célula foi submetida, pode ocorrer a indução tanto da diferenciação quanto da autofagia. De fato, a literatura recente tem mostrado a relação entre a indução da via autofágica e a ocorrência de diferenciação celular. Embora os mecanismos de interação entre esses processos ainda não estejam esclarecidos, a exposição de queratinócitos humanos ao estresse nutricional por exemplo leva ao aumento da expressão de proteínas da via autofágica e

também de proteínas ligadas ao processo de diferenciação em cultura (Aymard e cols., 2011). Além do aumento da expressão de LC3-II, o uso da rapamicina *in vitro* e *in vivo* (inibidor da mTORc1), resulta na alta expressão de marcadores associados à diferenciação de células-tronco/progenitoras de glioma (Zhuang e cols., 2011). No caso de diferenciação de mioblastos primários ou de linhagens como C2C12, a redução do conteúdo de soro fetal bovino (SFB) de 10-20% para apenas 2% de soro de cavalo acarreta um estresse nutricional e diferenciação para miotubos, no entanto, as vias celulares envolvidas ainda não são conhecidas.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar se há a ativação de componentes iniciais da via de autofagia como LC3-I, durante o processo de diferenciação terminal de mioblastos, sem indução de morte celular.

2.2- Objetivos específicos

- A- Avaliar os níveis de morte celular induzida por diferentes vias (apoptose, necrose e autofagia) em fibras musculares esqueléticas utilizando camundongos *mdx/mdx*, modelo de estudo da distrofia muscular de Duchenne;
- B- Avaliar se a indução de diferenciação de mioblastos da linhagem C2C12 por cultivo em meio pobre leva à ativação de LC3-I como um indicador de ativação de autofagia;
- C- Avaliar se indutores e bloqueadores farmacológicos de autofagia afetam o processo de diferenciação de mioblastos C2C12.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos distróficos *mdx/mdx* e C57BL/10 machos nas idades de 6, 12, 24 e 48 semanas fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (L-13/11).

3.2- Coleta de tecidos musculares

Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os músculos gastrocnêmio e diafragma foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C para serem cortados em criostato à -35°C.

3.3- Imunohistoquímica

Cortes congelados dos músculos gastrocnêmio e diafragma com espessura de 10µm foram fixados em acetona gelada e lavados durante 10 min em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Foi realizado o bloqueio de receptores Fcγ com meio RPMI 1640 com 2 mM de L-glutamina, 2 g/L de bicarbonato de sódio (LCG Biotecnologia) acrescido com 10% SFB (Cultilab) e 10% de soro de carneiro, ambos previamente inativados à 50°C durante 30 min. O anticorpo primário contra LC3-I (Sigma) de camundongo foi diluído em PBS e os cortes incubados por doze h à temperatura ambiente em câmara úmida. Os cortes foram extensivamente lavados em PBS e incubados durante 1 h com anticorpo secundário contra coelho conjugado à FITC, diluído também em PBS. Após lavagem, as lâminas foram coradas com 0,0001% de azul de Evans durante 5 min, lavadas com PBS e montadas em DABCO, para posterior visualização no microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM510 Meta (Oberkochen, Alemanha).

3.4- Marcação por TUNEL

Cortes congelados de músculos esqueléticos foram utilizados para a avaliação de apoptose através da visualização de fragmentação da cromatina através da técnica de TUNEL de acordo com as instruções do fabricante (kit de TUNEL peroxidase) (Roche).

3.5- Cultura de células

A linhagem de mioblastos de músculo esquelético humano C2C12 foi cultivada em meio de proliferação (DMEM alta glicose (4,5g/L), 4 nM L-glutamina, 3,7 g/L bicarbonato de sódio (LCG Biotecnologia) acrescido com 20% de SFB (Sigma), 10% de extrato III de embrião de galinha e penicilina (100U/ml) /estreptomicina (100µg/ml)) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Quando as células atingiam subconfluência de 60%, eram feitas passagens por desaderência utilizando solução de tripsina 0.25% e EDTA 2mM (Sigma) por menos de 1 min. A atividade enzimática era rapidamente inibida pela adição de PBS contendo 10% de SFB. Para a diferenciação terminal, as células eram mantidas em meio de diferenciação (DMEM alta glicose (4,5g/L), 4 nM L-glutamina, 3,7g/L bicarbonato de sódio, penicilina (100U/ml) /estreptomicina (100µg/ml) e 2% de soro de cavalo (Sigma). Para indução de morte celular por autofagia, as células foram incubadas em meio DMEM sem SFB. Para a incubação com os inibidores de autofagia, todas as células foram plaqueadas em meio de proliferação por 24 h. Em seguida o meio foi trocado por novo meio de proliferação ou meio de diferenciação com ou sem 10nM 3-metiladenina (3-MA) ou 100nM Wortmanina, ambos da Sigma.

3.6- Avaliação de viabilidade por citometria de fluxo

As células desaderidas foram lavadas duas vezes com PBS contendo 10% de SFB. Após a lavagem, as células incubadas a 37°C durante 20 min com ou sem 10nM do ester de tetrametilrodamina (TMRE) (Invitrogen), um indicador do potencial de membrana mitocondrial. A aquisição das amostras foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur.

3.7- Western Blotting

As células C2C12 foram desaderidas e extensivamente lavadas em meio DMEM. Em seguida, as proteínas totais foram extraídas com tampão de extração (150 μ M NaCl, 50 μ M TRIS, 1 μ M PMSF e 10 μ g/mL aprotinina, 1% NP-40, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para quantificação de proteínas totais pelo kit Pierce[®] BCA (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (125 mM TRIS-Cl, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, pH 6,8) e aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%, sendo a corrida realizada em voltagem constante de 100v. As amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose com voltagem de 50v durante 2 h e feito bloqueio por doze h em tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado, 10 mM TRISMA BASE, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA e 2% glicina). A membrana foi então incubada com anticorpo primário contra LC3-I por três h à temperatura ambiente, lavada em tampão de bloqueio e incubada com anticorpo secundário contra coelho conjugado à fosfatase alcalina (Southern). A revelação foi feita com solução de NBT/BCIP (Southern).

3.8- Microscopia eletrônica de transmissão

Os fragmentos de músculo esquelético foram lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixados com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7.2 por 1h a 4°C. Os fragmentos foram então pós-fixados por 30 min a temperatura ambiente em solução contendo OsO₄ 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e CaCl₂ 5 mM em tampão cacodilato 0,1M. Ferricianteo de potássio e cloreto de cálcio foram adicionados para uma melhor visualização e preservação de estruturas membranares. O material foi então desidratado em concentrações crescentes de acetona, incubado overnight a 4°C em mistura de acetona 100% e resina Polybed 812 (v:v), incubado por mais 4 h em resina pura a temperatura ambiente, incluído em Polybed 812. A polimerização da resina ocorreu a 60°C por 3 dias. Os cortes ultra-finos (70 nm) foram coletados em grades de cobre, corados com acetato de uranila 2% e observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-10C.

3.9- Atividade da creatina quinase sérica (CK-NAC)

Para este ensaio foram utilizados soros de camundongos *mdx/mdx* e C57Bl/10 com 6, 12, 24 e 48 semanas de idade obtidos a partir de punção cardíaca sem heparina. A atividade sérica da enzima creatina quinase isotipo esquelético (CK-NAC) foi utilizada como indicativo da destruição de fibras esqueléticas. A enzima catalisa a fosforilação da creatina gerando fosfocreatina e ADP além de outros produtos finais como D-ribose-5fosfato, CO₂ e NADPH. O aumento dos níveis de NADPH foi determinado espectrofotometricamente e é diretamente proporcional à atividade da enzima. As leituras foram feitas com 5 µl de soro + 100 µl do reagente de trabalho fornecido pelo fabricante (LabTest). As amostras foram mantidas por 15 min à temperatura ambiente e em seguida foram feitas 6 leituras sucessivas a 340 nm com intervalos de 1 min em espectrofotômetro de placa (Molecular Device – VERSAmax microplate reader). Estes valores de absorbância referentes à leitura de NADPH são expressos como diferenças de leitura a cada minuto ($\Delta E/\text{min}$).

4- RESULTADOS

Inicialmente fizemos uma avaliação da ocorrência dos diferentes tipos de morte celular nos músculos esqueléticos, dada à importância da morte celular na progressão da doença. A literatura aponta a morte necrótica como a principal via de morte na DMD e nossos dados de dosagem da CK-NAC no sangue indicam de fato altos níveis de necrose. Esses valores são crescentes ao longo do período estudado, sendo basais em camundongos controle C57BL/10 (Fig. 4.1).

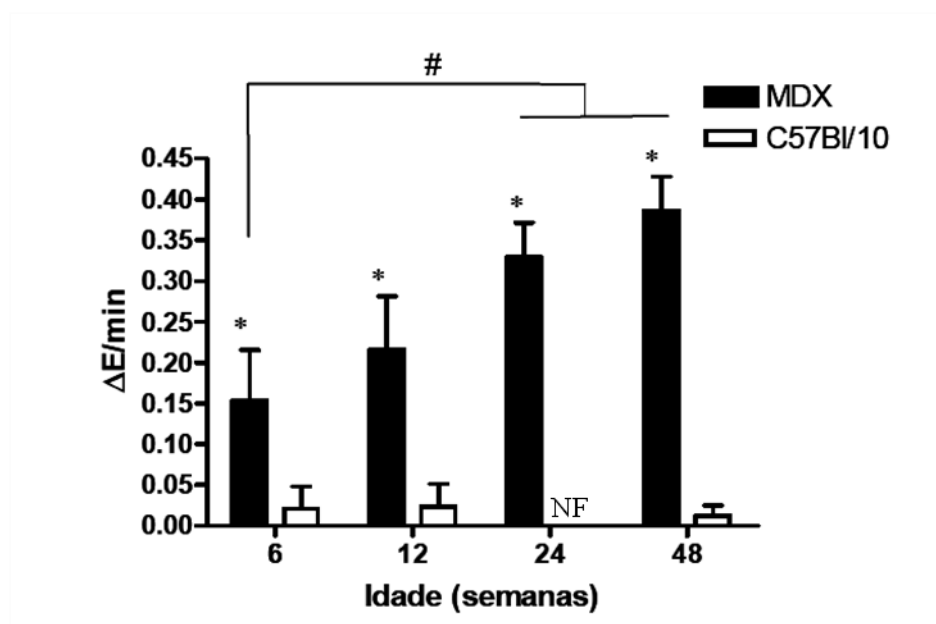


Figura 4.1: Quantificação de lesão muscular esquelética pela atividade da CK-NAC. O plasma de 15 a 20 camundongos *mdx/mdx* ou C57BL/10 da mesma idade foram coletados e a atividade enzimática quantificada. * $p < 0,05$ quando camundongos *mdx/mdx* são comparados com C57BL/10 de mesma idade e # $p < 0,05$ quando comparados camundongos *mdx/mdx* de idades diferentes. NF significa que não foi feito.

Embora a morte necrótica seja provavelmente o principal tipo de morte de fibras observado na DMD, outras vias também podem ser relevantes e por esse motivo iniciamos o estudo da ocorrência de apoptose e autofagia. Primeiramente avaliamos a morte apoptótica pela marcação com TUNEL e observamos poucas fibras musculares TUNEL⁺ nos músculos gastrocnêmio (Figs. 4.2A e B) e diafragma (Figs. 4.2D e E) em animais de 6 (Figs. 4.2A e D) e 12 (Fig 4.2B e E) semanas. Observamos algumas marcações pontuais em regiões de células

inflamatórias, porém em número apenas um pouco maior no músculo diafragma de 6 semanas (Fig. 4.2D). Como esperado, os animais controle não apresentaram marcação para TUNEL (Figs. 4.2C e F).

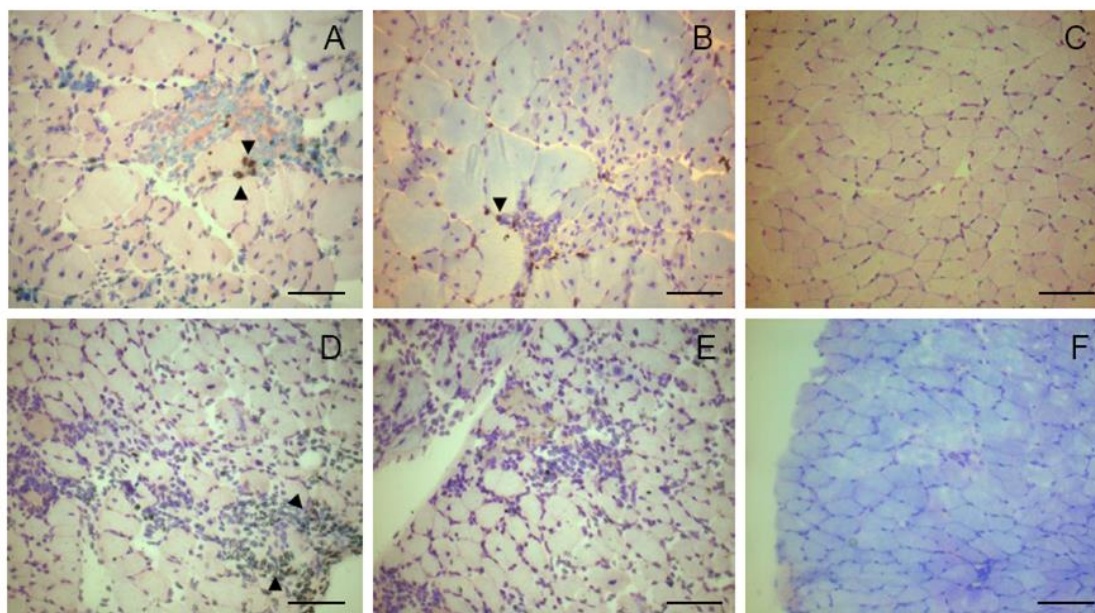


Figura 4.2: Avaliação de apoptose em músculos esqueléticos através da técnica de TUNEL. A detecção da apoptose foi realizada pela identificação de células positivas para TUNEL (cabeça de seta) em gastrocnêmio (A e B) e diafragma (D e E) de camundongos *mdx/mdx* de 6 (A e D) e 12 semanas (B e E). Em paralelo, gastrocnêmio (C) e diafragma (F) de animais C57BL/10 de 12 semanas foram utilizados como controle. Os resultados são representativos de pelo menos 3 camundongos por idade em 2 experimentos independentes. Barra: 100 μ m.

Para a avaliação de autofagia, inicialmente realizamos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão para identificação de indícios morfológicos da ocorrência da autofagia em fibras musculares. Como esperado, o diafragma dos camundongos C57BL/10 não apresentou alterações estruturais, sendo evidenciadas estriações e mitocôndrias morfológicamente típicas (Figs. 4.3A e B). A análise do diafragma de camundongos *mdx/mdx* de 6 semanas apontou um grande número de vacúolos e vesículas com estruturas membranares duplas (Figs. 4.3C-4F).

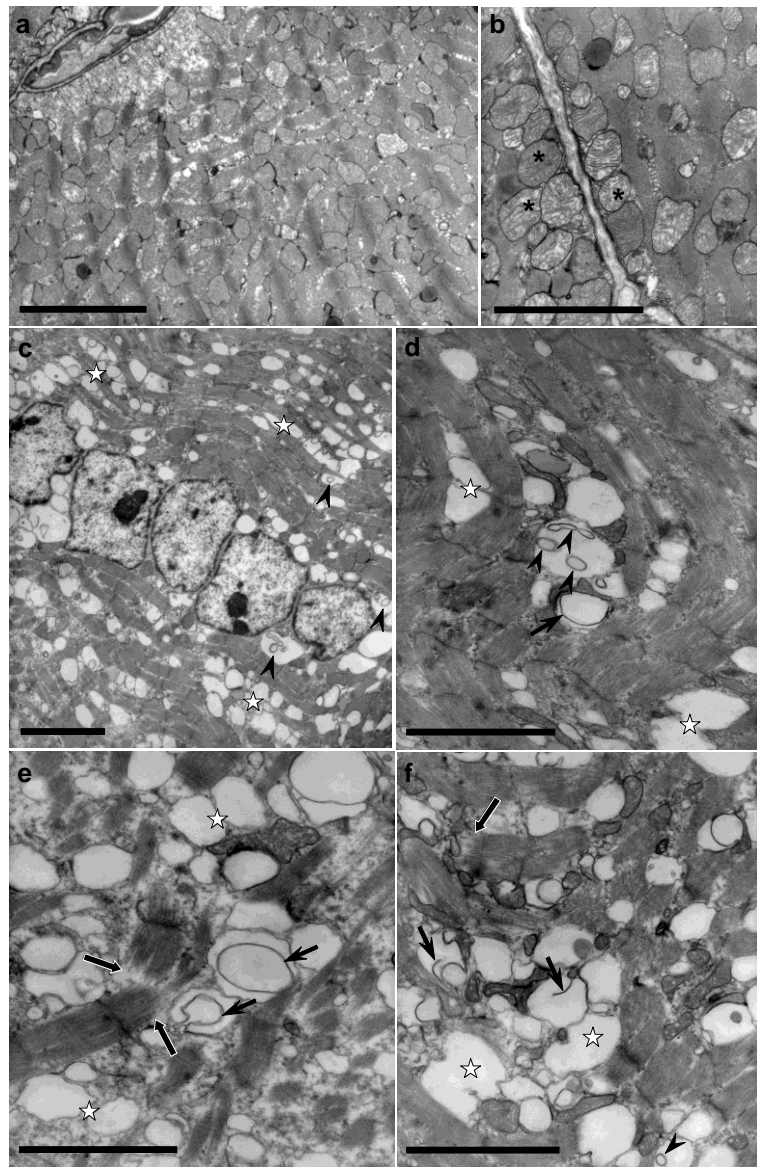


Figura 4.3: Análise ultra-estrutural do diafragma. Fragmentos de diafragma foram coletados de camundongos C57BL/10 (A e B) e *mdx/mdx* (C-F) de 6 semanas e processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. O diafragma de animais *mdx/mdx* apresentou estruturas em diferentes estágios de degradação como vacúolos citoplasmáticos (estrelas), que em alguns casos continham vesículas menores (cabeça de seta) e as próprias miofibrilas (setas). Os fenótipos foram observados em três camundongos por idade. Barra: 10 μ m (A e C), 50 μ m (B, D – F).

Visando complementar os dados obtidos sobre a ocorrência de autofagia através da análise ultraestrutural, fomos avaliar por imunohistoquímica a marcação com anticorpo contra LC3-I. Esta molécula é um dos indicadores moleculares de ativação da via autofágica mais utilizados atualmente. Como esperado, não observamos marcação de LC3-I em animais C57BL/10 (Figs. 4.4A e B), entretanto tanto no gastrocnêmio quanto no diafragma foram observados altos níveis de marcação para LC3-I em áreas de inflamação e em fibras adultas em degradação (Fig 4.4C-G). Contudo, observamos forte marcação também em células com morfologia sugestiva de fibras jovens ou mioblastos em processo de diferenciação para células musculares (Figs. 4.4C e F) e aparentemente viáveis. Dessa forma, decidimos avaliar se a expressão de LC3-I poderia estar associada também à diferenciação de mioblastos e não morte autofágica.

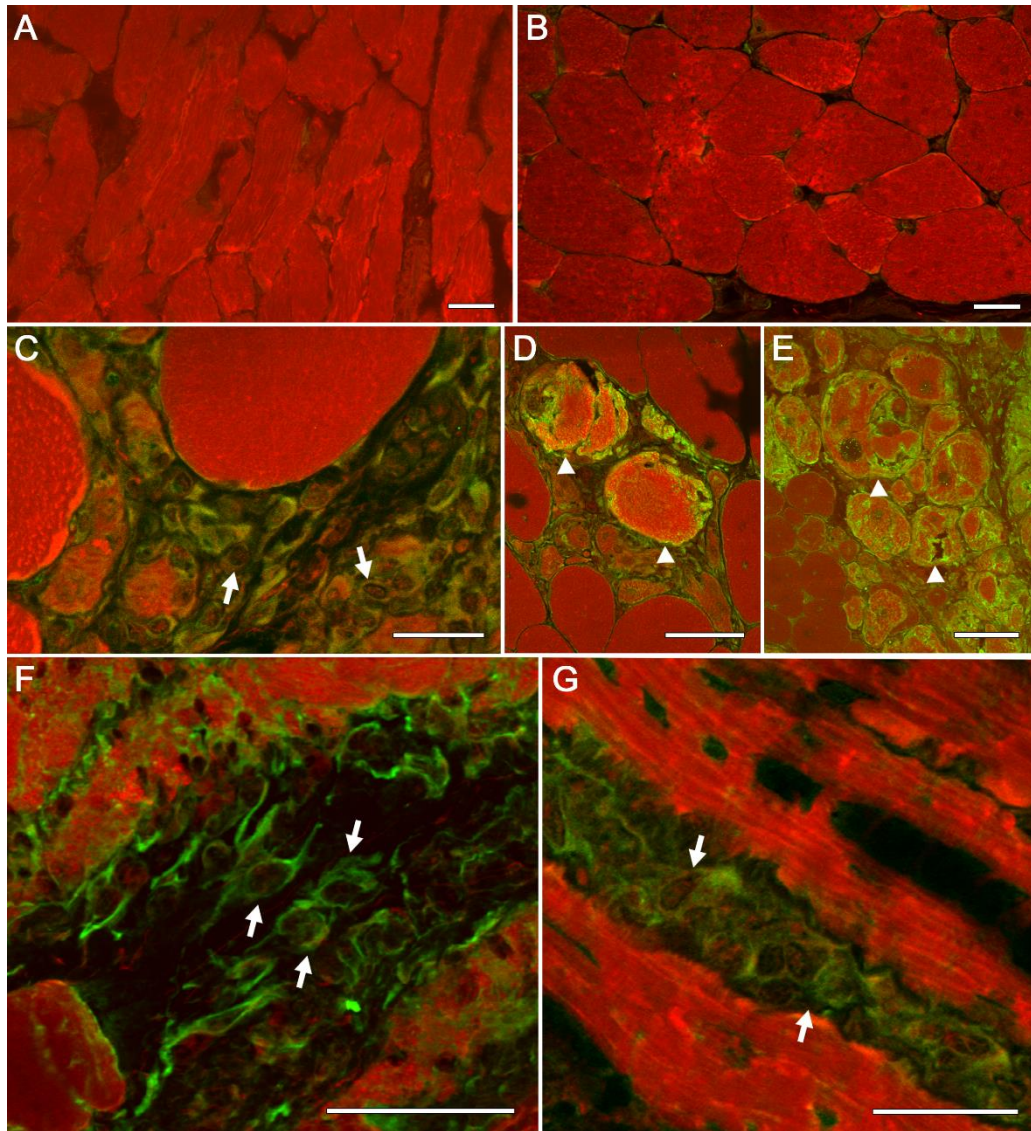


Figura 4.4: A avaliação de autofagia em músculos esqueléticos foi realizada através da marcação com anticorpo contra LC3-I em gastrocnêmio e diafragma de animais C57BL10 (A,B) e de animais *mdx/mdx* (C-G). Os resultados são representativos de pelo menos 3 camundongos de 12 semanas de idade. Barras: 20 μ m (A-C e G), 50 μ m (D-F). Foi observada marcação para LC3-I em células do infiltrado inflamatório (seta) e em fibras adultas (cabeça de seta).

Utilizamos a linhagem C2C12 de mioblastos para avaliarmos se a ativação bioquímica da autofagia poderia estar associada à diferenciação, e não morte deste tipo celular. Estas células têm morfologia semelhante a culturas de mioblastos primários quando mantidas em meio de proliferação (Fig. 4.5A). Quando mantidas em meio de diferenciação, essas células reduzem

progressivamente os ciclos de proliferação e iniciam diferenciação terminal para miotubos maduros e multinucleados (Fig. 4.5B).

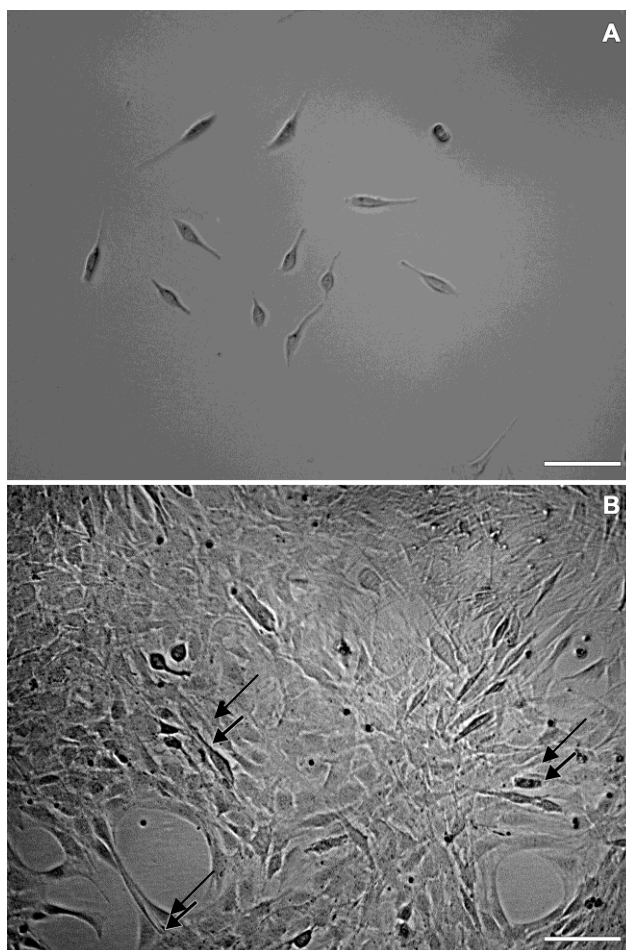


Figura 4.5: Aspecto geral de culturas de células de mioblastos C2C12. (A) As células mantidas em meio de proliferação até subconfluência máxima de 60% mantêm morfologia característica com projeções citoplasmáticas afiladas. (B) Em meio de diferenciação por 72 h, as células passam a se alinhar e fundir, formando estruturas celulares alongadas e multinucleadas semelhantes à miotubos (setas). Barras = 100 μ m.

Mantivemos então culturas de C2C12 por 24 h após a passagem para adaptação e em seguida trocamos o meio de proliferação por meio de diferenciação. Nas primeiras 24h ainda em meio de proliferação, foram observadas projeções citoplasmáticas características de mioblastos indiferenciados (Fig. 4.6A), sendo que entre 5 a 10% da cultura assume uma morfologia um pouco diferenciada, início do pareamento/alinhamento e apresentando menores

projeções (Fig. 4.6A, seta). Depois de 24 h em meio de diferenciação, o aspecto morfológico das células é bastante diferenciado, sendo possível observar o padrão característico de células agrupadas (Fig. 4.6B, setas). Entretanto, ainda são observadas células com morfologia afilada e alongada (Fig. 4.6B, cabeça de seta), sugerindo estágios intermediários do processo de diferenciação. Nos tempos de 24 e 48 h (Fig. 4.6C) ainda é possível distinguir individualmente as células, com membranas plasmáticas justapostas, mas ainda individualizadas. Já a partir de 72h de diferenciação é difícil identificar células individualizadas devido à característica deste tipo celular de se fundir às células vizinhas, formando sincícios maiores que se assemelham a miotubos em cultura (Figs. 4.6D e E). Ao longo de todos tempos de cultivo investigados (24, 48, 72 e 96 h) foram observadas alterações morfológicas gerais indicativas de diferenciação terminal (Fig. 4.6).

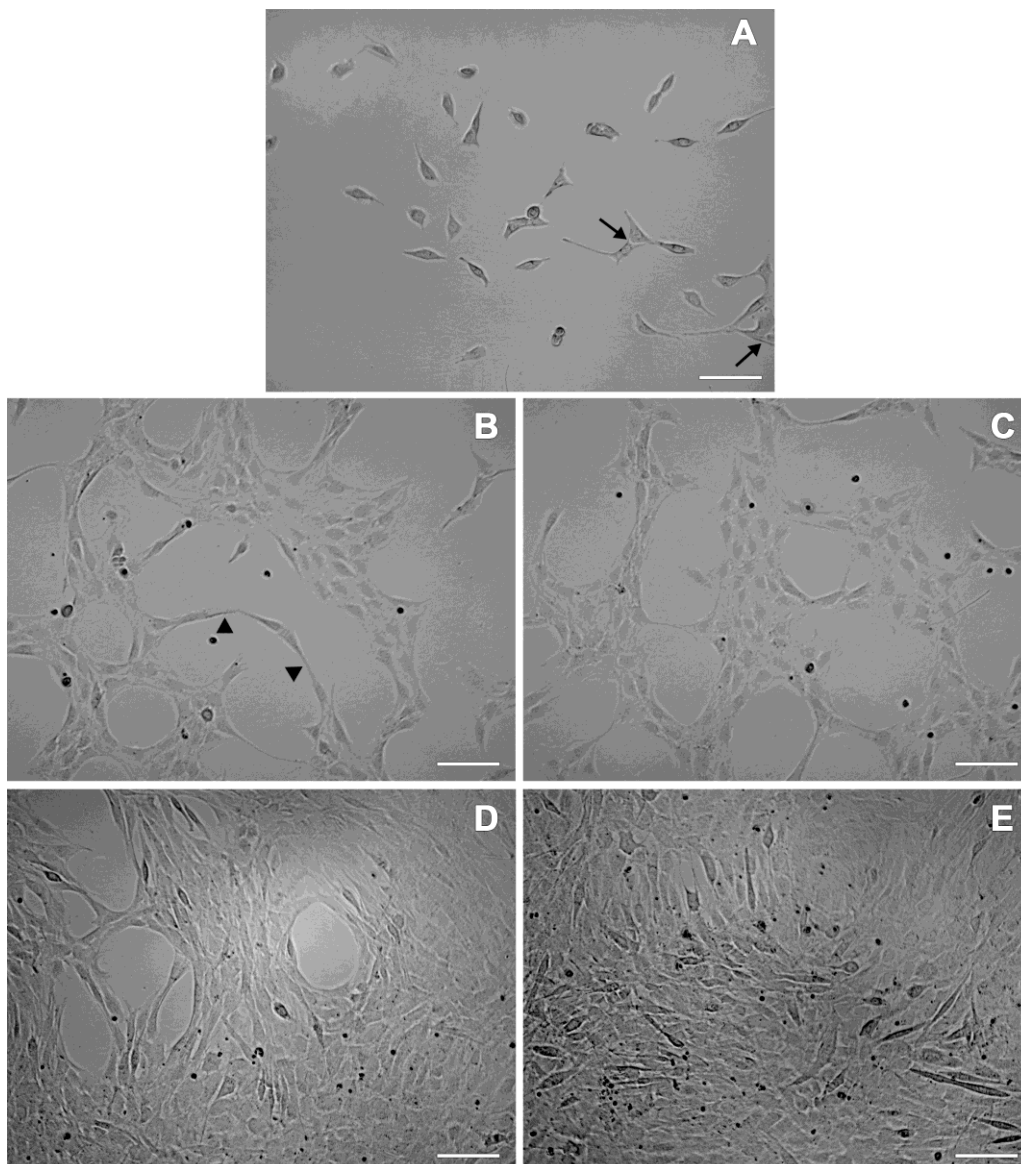


Figura 4.6: Aspecto morfológico de culturas de células C2C12 em diferenciação. As células foram mantidas em meio de proliferação por 24 h (A) ou meio de diferenciação por 24 (B), 48 (C), 72 (D) ou 96 (E) h. Setas indicam células em meio de proliferação e cabeças de seta células em diferenciação. Barras = 100µm.

Uma vez que nosso objetivo geral era avaliar se ao longo da diferenciação das células musculares se havia a participação da via autofágica, decidimos analisar a viabilidade das células ao longo de toda a cinética por citometria de fluxo. Para essa avaliação, utilizamos como parâmetro o TMRE, fluorocromo capaz de atravessar livremente a membrana plasmática e marcar a diferença de potencial intermembranas de mitocôndrias. Este é um marcador muito

sensível, capaz de indicar pequenas variações funcionais na atividade mitocondrial e por isso é largamente utilizado para caracterização de morte celular por qualquer via. Entretanto, primeiramente avaliamos as alterações celulares (FSC x SSC) que correspondem à diferenciação por citometria de fluxo, que reforçaram nossos dados obtidos por microscopia de luz (Fig. 4.7). As células individuais em meio de proliferação (Fig. 4.7A) e após 24 h de incubação em meio de diferenciação (Fig. 4.7B) são em sua maioria menores em comparação com as células incubadas por 48 (Fig. 4.7C), 72 (Fig. 4.7D) e 96 (Fig. 4.7E) h em meio de diferenciação. Desta forma, as análises por citometria foram feitas dentro das regiões indicadas na Figura 4.7.

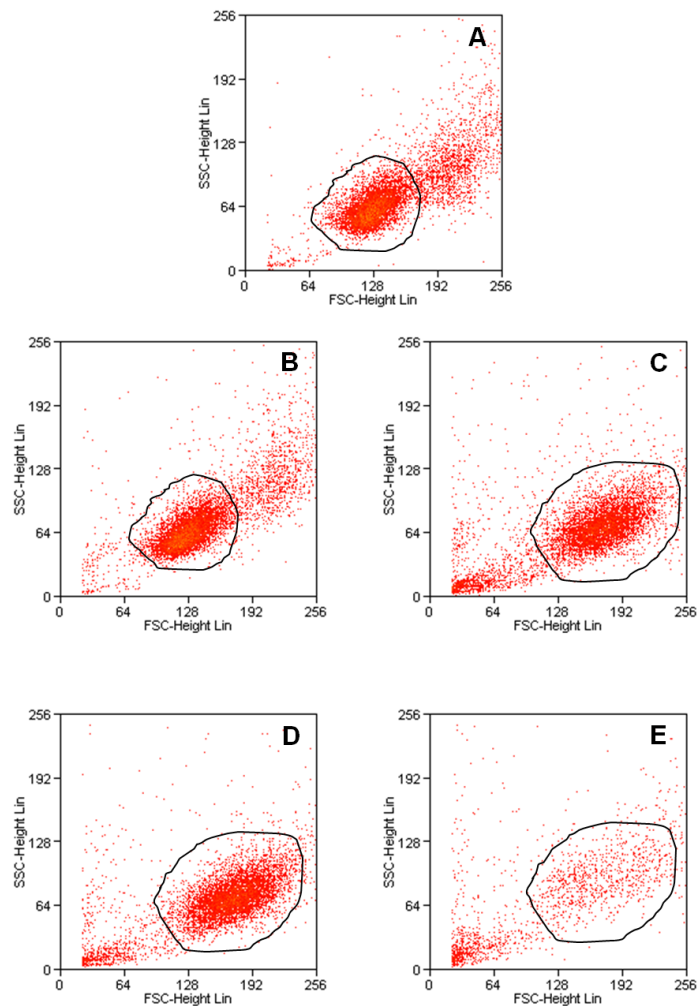


Figura 4.7: Alterações morfológicas de células C2C12 em diferenciação por citometria de fluxo. As células foram mantidas em meio de proliferação por 24 h (A) ou meio de diferenciação por 24 (B), 48 (C), 72 (D) ou 96 (E) h. Em seguida foram desadheridas, lavadas e analisadas por citometria de fluxo. FSC se refere ao tamanho dos eventos e SSC à complexidade interna ou granulosidade, as análises de fluorescência foram realizadas nas regiões indicadas.

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial mostrou que pelo menos 90% das células são viáveis após 24 e 48 h de cultivo em meio de diferenciação (Figs. 4.8A e B). Entretanto, após 72 (Fig. 4.8C) e 96 h (Fig. 4.8D) a viabilidade cai para 76,0% e 17%, respectivamente.

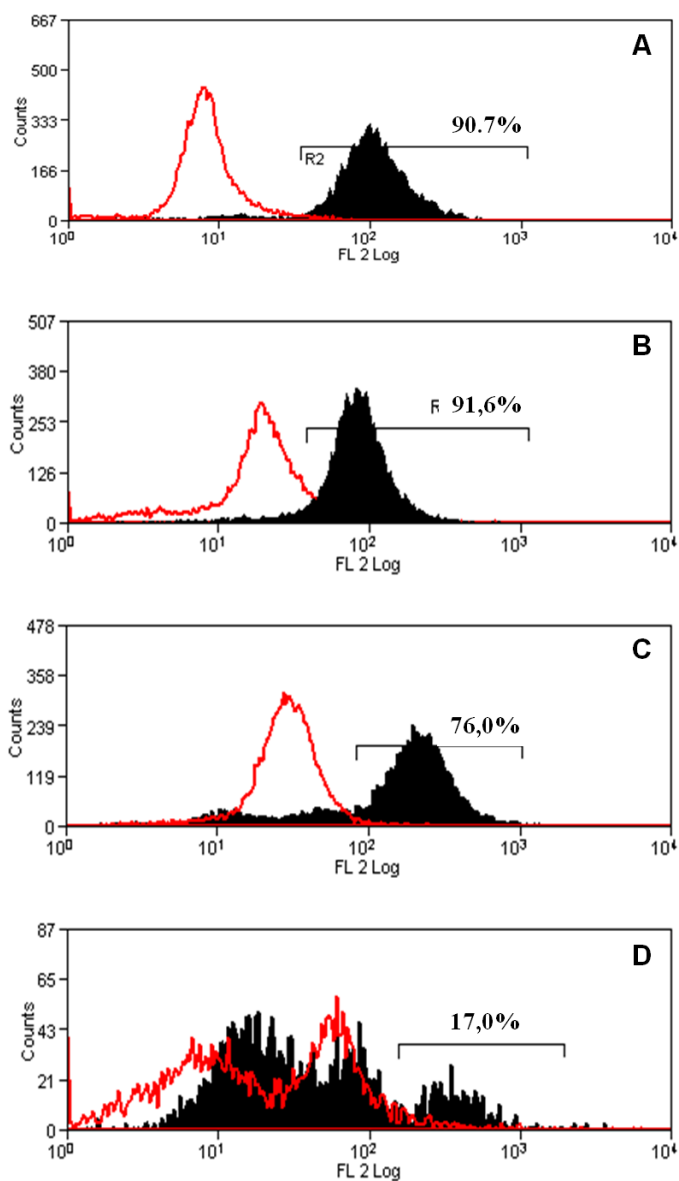


Figura 4.8: Viabilidade celular por citometria de fluxo. As células foram mantidas em meio de diferenciação por 24 (A), 48 (B), 72 (C) ou 96 (D) h, desaderezadas da cultura e lavadas em PBS. Em seguida as células foram marcadas com TMRE por 30 min a 37°C e adquiridas em citômetro de fluxo no canal de FL-2 (585/42 nm). A curva preenchida mostra as células da cinética experimental marcadas e a linha vermelha mostra as células mortas que foram obtidas de culturas mantidas em paralelo na presença de brefeldina A (10µg/ml). O percentual de células viáveis (valor) é referente aos eventos na região R2.

Em seguida, realizamos a corrida por eletroforese das proteínas totais extraídas das mesmas culturas que avaliamos a diferenciação e viabilidade, sendo observada uma pequena expressão de LC3-I em meio de proliferação (Fig. 4.9). Porém, apesar da alta viabilidade celular, houve uma regulação positiva na ativação de LC3 para LC3-I nos tempos de 24 e 48 h em meio de diferenciação, quando observamos forte marcação para essa molécula.

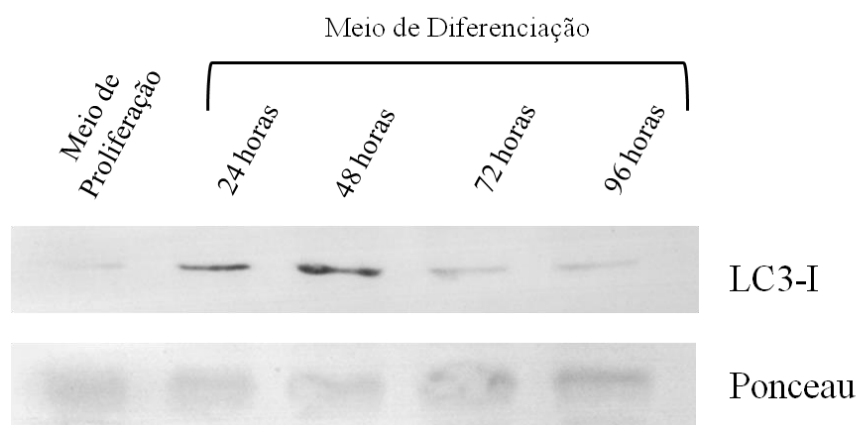


Figura 4.9: Ativação de LC3-I durante a diferenciação de C2C12. As células foram mantidas em meio de proliferação por 24 h ou em meio de diferenciação por 24 a 96 h. As células foram então desaderidas da cultura, lavadas e congeladas em tampão de extração. As proteínas foram separadas em gel de poli-acrilamida a 10%, transferidas para nitrocelulose e a membrana foi incubada com anticorpo contra LC3-I de camundongo e em seguida com anticorpo secundário contra coelho conjugado à fosfatase alcalina. A revelação foi feita com NBT/BCIP. A coloração por Ponceau indica que a quantidade de proteínas aplicada por *slot* foi equivalente.

Para entender melhor o papel da ativação da via de autofagia na diferenciação de mioblastos da linhagem C2C12, células em meio de diferenciação foram cultivadas na presença dos inibidores de autofagia 3-MA e Wortmanina por apenas 24 h. Estes antagonistas bloqueiam a autofagia em componentes iniciais da via bioquímica, inibindo a PI3K tipo III. Nossos resultados demonstraram um aumento da expressão de LC3-I em meios de diferenciação, que foi parcialmente regulada na presença de cada inibidor (Fig. 4.10), indicando que a ativação da via de autofagia ocorre dependente desde seus componentes iniciais.

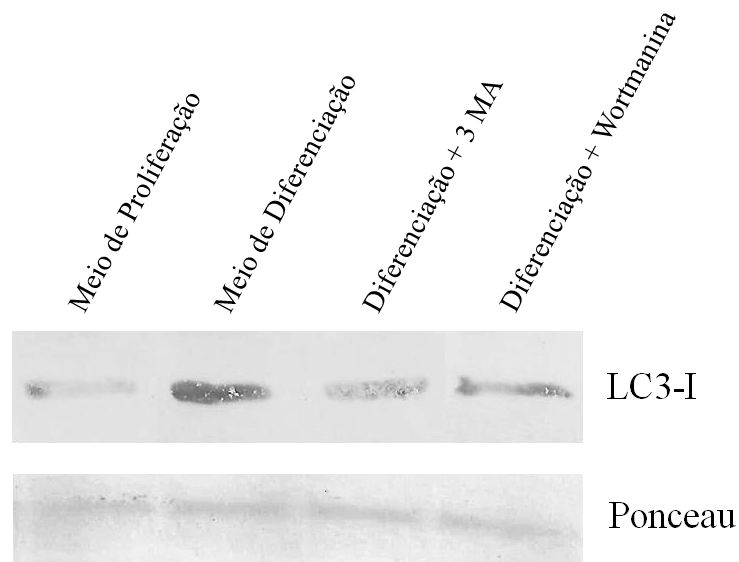


Figura 4.10: Diferenciação de C2C12 na presença de antagonistas de autofagia. As células foram mantidas por 24 h em meio de proliferação, diferenciação na ausência ou presença de 3-MA (10nM) ou Wortmanina (100nM). Após desadidas da cultura, as células foram lavadas e congeladas em tampão de extração. As amostras (50 μ g de proteínas totais) foram separadas em gel de poliacrilamida a 13%, transferidas para nitrocelulose e a membrana foi incubada com anticorpo contra LC3-I de camundongo e em seguida com anticorpo secundário contra coelho conjugado à fosfatase alcalina. A revelação foi feita com NBT/BCIP.

5- DISCUSSÃO

A DMD é uma doença genética que induz resposta inflamatória crônica, sendo que o ponto central da patogenia, além da mutação no gene da distrofina, é a morte celular. Seja morte de fibras musculares induzida pela própria mutação ou pela resposta inflamatória local (Kostek, 2012). Por esse motivo, decidimos inicialmente avaliar nos tecidos musculares esqueléticos de camundongos *mdx/mdx* as 3 principais vias de morte: apoptose; necrose e autofagia. De acordo com a literatura, foram observadas poucas células musculares em apoptose, entretanto há diversas células inflamatórias TUNEL⁺. Não há descrição na literatura sobre possíveis vias indutoras de morte de células inflamatórias na DMD e por esse motivo, nosso grupo avaliou em paralelo algumas alternativas compatíveis com a resposta inflamatória observada nos músculos. Foram avaliados por exemplo a possibilidade de níveis elevados de óxido nítrico (NO) como indutor de morte tanto de fibras como de células inflamatórias. Embora o tratamento *in vivo* de animais *mdx/mdx* e C57BL/10 com L-NAME tenha sido eficiente no bloqueio da óxido nítrico sintase induzida (iNOs) com redução dos níveis séricos de nitrito, não foi observada redução na morte de células inflamatórias por microscopia eletrônica (dados não publicados do nosso grupo). No entanto, é possível, por exemplo, que os níveis locais elevados de citocinas inflamatórias como TNF e IFN- γ contribuam para a morte dessas células inflamatórias. De qualquer forma, ainda pretendemos avaliar possíveis mecanismos que levem essas células a apoptose.

Por outro lado, observamos altos níveis de morte necrótica em fibras de animais *mdx/mdx* através da atividade da enzima CK-NAC, um marcador de morte de fibras esqueléticas. Essa morte foi confirmada também por microscopia eletrônica, onde pode ser observada morte tanto de fibras musculares como de células inflamatórias (dados não publicados do nosso grupo). Ambas as células apresentavam membrana plasmática danificada e mitocôndrias com cristas destruídas. De acordo com a literatura, a morte necrótica de fibras musculares é de fato a via principal de destruição do músculo e é possível que a morte necrótica de células inflamatórias seja um componente adicional para recrutamento de novas células inflamatórias e fonte de mais lesão muscular (Kostek, 2012).

Com relação à autofagia, nossos dados iniciais por microscopia eletrônica revelaram diversas estruturas morfológicas características desse processo como vesículas de membrana dupla (autofagossomos ou autolisossomos) em células musculares. Além disso, nossos dados de marcação de tecido muscular esquelético com anticorpo contra LC3-I confirmaram que algumas fibras musculares adultas estavam em processo de autofagia. Considerando a avaliação dos 3 tipos de morte celular, nossos dados corroboram que a morte necrótica é a principal via de morte de fibras musculares no modelo camundongo *mdx/mdx* de DMD. Ainda com relação à expressão de LC3-I no tecido muscular, também observamos células com morfologia de mioblastos e fibras musculares jovens com forte marcação para esta molécula. Este aumento na expressão de LC3-I nos chamou a atenção e, juntamente com o fato de que do indutor clássico de diferenciação de mioblastos (primários ou de linhagem) ser a transferência para meio pobre em nutrientes (estresse nutricional), decidimos avaliar a participação da autofagia na diferenciação terminal de células musculares. Dessa forma, a autofagia teria um papel duplo nessas células: em células adultas está envolvida na morte, e em mioblastos leva a diferenciação. Para testar essa hipótese, optamos por trabalhar com mioblastos C2C12 por ser uma linhagem muito utilizada por diversos grupos de pesquisa e bastante caracterizada (Wang, 2012).

Uma das características da diferenciação de mioblastos é a mudança na morfologia individual das células e da cultura como um todo. As células indiferenciadas são bastante afiladas e têm projeções longas. Porém, após cerca de 12 a 15 h em meio de diferenciação, as células se alinham e reduzem as projeções, formando grupos celulares cada vez maiores. Com a continuidade desse processo, as células tendem a se fundir e formar sincícios alongados que se desenvolvem em miotubos. Isso ilustra que o estímulo clássico para indução de autofagia leva mioblastos em cultura ao processo de diferenciação. Para avaliar nossa hipótese, foram analisados em paralelo o processo de diferenciação e morte celulares através do cultivo de células em meio pobre (meio de diferenciação). As células exibiram as alterações características da diferenciação ao longo de toda a cinética e mantiveram alta viabilidade até 48 h de cultivo. Porém, a partir de 72 h o percentual de células viáveis reduziu bastante, alcançando 17% após 96 h de cultivo. Ainda não sabemos o motivo da redução da viabilidade celular. Antes da desaderência, as células pareciam ter alta viabilidade, estavam aderidas e altamente refringentes inclusive formando pequenos tubos. O procedimento usando tripsina/EDTA foi repetido em cada ponto da cinética e a morfologia das células sempre indicava alta viabilidade. É possível

que após períodos mais longos de cultivo, e enquanto o processo de diferenciação estava em estágios mais avançados, a resistência das células à desadêrência fosse menor quando comparado às culturas de células indiferenciadas. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que quando são feitos repiques de culturas com subconfluência superior a ideal (>50% em processo de diferenciação), a viabilidade da cultura resultante é em geral bem menor. Uma vez estabelecida a cultura e o padrão de viabilidade celular por citometria de fluxo, fizemos a marcação com anticorpo contra LC3-I nas células em diferenciação por *Western Blotting*. Observamos uma banda referente à ativação de LC3-I em células mantidas em meio de proliferação e isso pode ser por pelo menos 3 possibilidades não excludentes: (a) a autofagia acontece em níveis basais em células nucleadas como um processo normal de destruição e reciclagem de componentes celulares, sem indução de morte; (b) em qualquer cultura de células sempre são observados níveis baixos de morte celular por diferentes vias e a banda que observamos pode ser resultado de morte por autofagia mesmo em culturas normais e em expansão; e/ou (c) normalmente observamos algum nível de diferenciação espontânea de mioblastos, em geral não excedendo 10%, mesmo quando mantidos em meio de proliferação. É possível que essa ativação de LC3-I na cultura em proliferação seja resultado da diferenciação dependente de LC3-I em níveis basais, mas essa alternativa ainda deve ser testada por imunofluorescência combinando a marcação para LC3-I e para miogenina, por exemplo. Por outro lado, foi observado um aumento da expressão de LC3-I em células mantidas em meio de diferenciação por até 48 h, no entanto essa ativação reduziu a níveis basais após 72 h. Interessantemente, nas etapas da cinética onde as células mantêm alta viabilidade e estão em processo de diferenciação é que foi observada alta marcação para LC3-I, indicando que a ativação da autofagia não estaria relacionada realmente associada à indução de morte. Porém, a redução na marcação a partir de 72 h pode sugerir pelo menos duas possibilidades: (a) de acordo com o aspecto geral da cultura, as células estão viáveis, e a ativação de LC3-I foi resultado apenas dos estágios iniciais de diferenciação, havendo regulação negativa da via quando as células já iniciaram o processo; e/ou (b) de acordo com a baixa viabilidade, as células poderiam de fato estar morrendo, mas por uma via independente da ativação de LC3-I como a apoptose por exemplo. Independente dos tempos mais tardios, nossos resultados sugerem que pelo menos no início da diferenciação a via autofágica é ativada, sem indução de morte celular.

Para avaliarmos mais a fundo a via de disparo do processo de autofagia para diferenciação celular, mantivemos culturas de C2C12 em meio de diferenciação na presença de

inibidores de PI3K tipo III e conseqüentemente de autofagia. Para estas análises, escolhemos o tempo de 24 h de cultivo para não termos a interferência da possível morte em tempos mais longos (viabilidade maior que 90%). Mais uma vez foi observada a expressão de LC3-I em meio de diferenciação, que na presença dos inibidores farmacológicos da autofagia reduziram sua expressão em estágios iniciais. Logo, é possível que haja vias alternativas independentes da ativação de LC3 para o disparo da autofagia, embora aparentemente esta via pareça ser a principal.

Nossos dados iniciais indicam que a participação da autofagia no processo de diferenciação de mioblastos, porém provavelmente existem vias alternativas caso a autofagia não possa ser disparada bioquimicamente. Atualmente não se conhecem quais fatores e vias induzem a diferenciação de mioblastos e quaisquer avanços que se façam nesse sentido pode estar diretamente implicado na regeneração em doenças degenerativas musculares.

6- CONCLUSÃO

Nossos dados apontaram que o tipo predominante de morte dos músculos esqueléticos no modelo de DMD estudado é a necrose, entretanto também há a ativação da via autofágica. A autofagia parece não somente estar relacionada com a morte de fibras musculares adultas e jovens, mas também com a diferenciação de mioblastos em cultura.

7- PERSPECTIVAS

- 1- Avaliar a expressão de marcadores característicos de diferenciação muscular esquelética como α -actina sarcomérica em culturas de C2C12 submetidas ao estresse nutricional com ou sem inibidores farmacológicos de autofagia.
- 2- Avaliar a diferenciação em células C2C12 cultivadas em meio de proliferação na presença do indutor de autofagia, Rapamicina.
- 3- Verificar a expressão de outros marcadores relacionados a autofagia como outros ATGs.

8- REFERÊNCIAS

Asakura A. Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(3):123-8.

Aymard E, Barruche V, Naves T, Bordes S, Closs B, Verdier M, et al. Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? *Exp Dermatol.* 2011;20(3):263-8.

Aziz A, Sebastian S, Dilworth FJ. The origin and fate of muscle satellite cells. *Stem Cell Rev.* 2012;8(2):609-22.

Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol.* 2010, 221(2): 117–124

Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(6):349-61.

Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(4):1189-92.

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77-93.

Cerri DG, Rodrigues LC, Stowell SR, Araujo DD, Coelho MC, Oliveira SR, et al. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. *Glycobiology.* 2008;18(11):842-50.

Chen Z, Bai H, Pan YZ, Wang CB, Zhao Q, Hu XY, et al. [X-ray induces autophagy in human mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011;32(9):602-5.

Christofferson DE, Yuan J. Cyclophilin A release as a biomarker of necrotic cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(12):1942-3.

Collins C, Morgan J. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol.* 2003;84(4):165-72.

- Cullen SP, Lüthi AU, Martin SJ. Analysis of apoptosis in cell-free systems. *Methods* 2008; 44: 273–279
- da Silva EC, Machado DL, Resende MB, Silva RF, Zanoteli E, Reed UC. Motor function measure scale, steroid therapy and patients with Duchenne muscular dystrophy. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012;70(3):191-5.
- Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 2007;36(1):1-7.
- Di Bartolomeo S, Nazio F, Cecconi F. The role of autophagy during development in higher eukaryotes. *Traffic.* 2010;11(10):1280-9.
- Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(6):663-9.
- Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(2):108-17.
- Farini A, Razini P, Erratico S, Torrente Y, Meregalli M. Cell based therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol.* 2009;221(3):526-34.
- Figeac N, Daczewska M, Marcelle C, Jagla K. Muscle stem cells and model systems for their investigation. *Dev Dyn.* 2007;236(12):3332-42.
- Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73(4):1907-16.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3-12.
- Gumerson JD, Michele DE. The dystrophin-glycoprotein complex in the prevention of muscle damage. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:210797.
- Hotchkiss R, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death. *N Engl J Med* 2009; 361:1570-1583

- Kafadar KA, Yi L, Ahmad Y, So L, Rossi F, Pavlath GK. Sca-1 expression is required for efficient remodeling of the extracellular matrix during skeletal muscle regeneration. *Dev Biol.* 2009;326(1):47-59.
- Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(3):221-37.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
- Kitsis RN, Molkentin JD. Apoptotic cell death "Nixed" by an ER-mitochondrial necrotic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(20):9031-2.
- Kostek M, Nagaraju K, Pistilli E, Sali A, Lai SH, Gordon B, Kishimoto T, Chen YW. IL-6 signaling blockade increases inflammation but does not improve muscle function in the mdx mouse. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012, 106(13).
- Lagrotta-Candido J, Vasconcellos R, Cavalcanti M, Bozza M, Savino W, Quirico-Santos T. Resolution of skeletal muscle inflammation in mdx dystrophic mouse is accompanied by increased immunoglobulin and interferon-gamma production. *Int J Exp Pathol.* 2002;83(3):121-32.
- Lapidos K, Kakkar R, McNally E. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res.* 2004;94(8):1023-31.
- Lee JS, Lee GM. Rapamycin treatment inhibits CHO cell death in a serum-free suspension culture by autophagy induction. *Biotechnol Bioeng.* 2012.
- Li D, Yue Y, Duan D. Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PLoS One.* 2010;5(12):e15286.
- Lockshin RA, Insect embryogenesis: macromolecular syntheses during early development. *Science*, 1966; 154(3750):775-6.
- Manzur AY, Muntoni F. Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(7):706-14.

Mcardle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano*. Guanabara Koogan, 2003: 370.

Moorwood C, Lozynska O, Suri N, Napper AD, Diamond SL, Khurana TS. Drug discovery for Duchenne muscular dystrophy via utrophin promoter activation screening. *PLoS One*. 2011;6(10):e26169.

Moquin D, Chan FK. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(8):434-41.

Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*. 2003;2(12):731-40.

Porter JD. Commentary: extraocular muscle sparing in muscular dystrophy: a critical evaluation of potential protective mechanisms. *Neuromuscul Disord*. 1998;8(3-4):198-203.

Purslow PP. Muscle fascia and force transmission. *J Bodyw Mov Ther*. 2010;14(4):411-7.

Rassier DE, Pavlov I. Force produced by isolated sarcomeres and half-sarcomeres after an imposed stretch. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(1):C240-8.

Reed CJ. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. *Semin Hematol*. 2000;37(4 Suppl 7):9-16.

Silva MDP, Carvalho RF. Cellular and molecular mechanisms that control muscular development and growth. *R. Bras. Zootec*. 2007; 36: 21-31.

Stephenson DG. Tubular system excitability: an essential component of excitation-contraction coupling in fast-twitch fibres of vertebrate skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006;27(5-7):259-74.

Tait SW, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*. 2008;27(50):6452-61.

Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Okada T, Fukushima K, Ueno M, et al. Surgical management of severe scoliosis with high risk pulmonary dysfunction in Duchenne

muscular dystrophy: patient function, quality of life and satisfaction. *Int Orthop*. 2010;34(5):695-702.

Usas A, Huard J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials*. 2007;28(36):5401-6.

van Putten M, Hulsker M, Nadarajah VD, van Heiningen SH, van Huizen E, van Iterson M, et al. The effects of low levels of dystrophin on mouse muscle function and pathology. *PLoS One*. 2012;7(2):e31937.

Vaughan ATM, Betti CJ, Villalobos MJ. Surviving apoptosis. *Apoptosis* 2002; 7: 173–177.

Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Jazedje T, Secco M, Nunes VA, et al. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol Cell*. 2008;100(4):231-41.

Wang PY, Thissen H, Tsai WB. The roles of RGD and grooved topography in the adhesion, morphology, and differentiation of C2C12 skeletal myoblasts. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012; 109(8): 2104-15.

Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:125-56.

Widrick JJ, Jiang S, Choi SJ, Knuth ST, Morcos PA. An octaguanidine-morpholino oligo conjugate improves muscle function of mdx mice. *Muscle Nerve*. 2011;44(4):563-70.

Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010;12(9):814-22.

Ye YC, Yu L, Wang HJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. TNF α -induced necroptosis and autophagy via suppression of the p38-NF- κ B survival pathway in L929 cells. *J Pharmacol Sci*. 2011;117(3):160-9.

Zhuang WZ, Long LM, Ji WJ, Liang ZQ. Rapamycin induces differentiation of glioma stem/progenitor cells by activating autophagy. *Chin J Cancer*. 2011;30(10):712-20.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001