STEPHANIE DE ALCÂNTARA FERNANDES

Análise da via autofágica no músculo distrófico

Analysis of the autophagic pathway in the dystrophic
muscle

São Paulo

2017

Resumo

DE ALCÂNTARA FERNANDES, Stephanie. **Análise da via autofágica no músculo distrófico**. 2017. 99f. Dissertação de Mestrado (Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O músculo esquelético é um tecido que tem a capacidade de se regenerar após lesão, seja ela patológica ou induzida. Para tanto, células musculares progenitoras, presentes no músculo adulto, atuam fundindo-se entre si, ou com as fibras musculares danificadas, para formar novas fibras. A via da macroautofagia, implicada na degradação e reciclagem de proteínas e organelas danificadas via lisossomo, é essencial para a manutenção da massa muscular, mas já foi também implicada na diferenciação e funcionamento de células progenitoras do músculo. Além disso, essa via está desregulada em diversas doenças neuromusculares, o que destaca seu papel nesse tecido. Nesse estudo, a regulação da autofagia foi investigada em diferentes situações de formação e degradação do músculo. Para estudar o processo de diferenciação muscular *in vitro* utilizamos um modelo de células musculares imortalizadas normais, e de paciente com miopatia ligada ao X com autofagia excessiva (XMEA). A análise dos genes e proteínas p62, *BNIP3*, *BECLIN1*, *VPS34*, *ATG12* e *LC3*, além de alvos de mTOR, mostrou um padrão similar de expressão em mioblastos indiferenciados emiotubos diferenciados a partir de células controle e nas derivadas de paciente XMEA. Estes resultados sugerem que a desregulação da via autofágica relacionada à doença provavelmente surge em estágios mais avançados, como se observa em doenças de acúmulo lisossomal. A investigação da diferenciação muscular nessas células mostrou um aumento na capacidade de fusão de mioblastos XMEA, que não foi relacionado a mudanças na expressão de genes envolvidos na miogênese. Isso indica que o defeito primário relacionado a XMEA, como a deficiência da ATPase vacuolar, pode interferir no processo de diferenciação muscular. Para estudar o músculo em condições patológicas, utilizamos modelos animais para distrofias musculares que possuem distintos graus de afecção do músculo, como o *DMD^{mdx}*, modelo para distrofia muscular de Duchenne, o *SJL/J*, modelo para distrofia muscular de cinturas tipo 2B e o *Large^{myd}*, modelo para distrofia muscular congênita 1D. Observamos que não há alterações globais na expressão de genes e proteínas da autofagia. Adicionalmente, cada modelo murino teve alterações pontuais, destacando a ausência de correlação entre o grau de degeneração do músculo e as alterações observadas na via autofágica. Por outro lado, quando uma lesão

muscular é induzida em músculo normal, houve uma diminuição da expressão de todos os genes estudados, *Bnip3*, *Beclin1*, *Vps34*, *Atg12*, *Lc3* e *Gabarapl1*, com possível acúmulo das proteínas autofágicas p62 e Beclin1. Com a recuperação do músculo, após cinco dias da lesão, a maior parte dos genes estudados teve sua expressão normalizada. Tais resultados indicam que a lesão aguda se relaciona a uma resposta drástica e recuperação rápida na via da autofagia. Em conjunto, nossos resultados mostram que a via da autofagia é diferencialmente afetada a depender do estímulo dado ao músculo, seja ele de regeneração e formação de novas células musculares ou de degeneração. Dessa forma, este estudo pode ter implicações para o desenvolvimento de terapias que tenham como alvo a via autofágica, já que indica que o momento da intervenção terapêutica pode ser importante, assim como o estímulo que levou a alterações no tecido muscular.

Palavras-chave: Autofagia; Degeneração muscular; Regeneração muscular; Distrofias musculares; Miopatia ligada ao X com autofagia excessiva.

Abstract

DE ALCÂNTARA FERNANDES, Stephanie. **Analysis of the autophagic pathway in the dystrophic muscle** 2017. 99f. M.S. Dissertation (Genetics) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The skeletal muscle is a tissue that has the ability to regenerate upon lesion, whether it occurs pathologically or induced. Therefore, progenitor muscle cells, present in the adult muscle, act by fusing with each other or with damaged fibers in order to recover the tissue. The macroautophagy pathway, related to degradation and recycling of proteins and damaged organelles via lysosome, is essential for the maintenance of muscle mass, and it was also implicated in the differentiation and functioning of muscle progenitor cells. Besides that, this pathway is deregulated in several neuromuscular disorders, highlighting its important role in this tissue. In this study, the autophagic regulation was investigated in distinct contexts of muscle formation and degradation. To study the muscle differentiation process in vitro, we used a model of immortalized muscle cells from both a normal control and a patient with X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA). The genes and proteins p62, *BNIP3*, *BECLIN1*, *VPS34*, *ATG12*, *LC3* and mTOR targets showed a similar pattern of expression in both undifferentiated myoblasts and differentiated myotubes, from both control cells and XMEA patient-derived cells. This fact suggests that autophagic deregulation might arise in later stages of the disease, in a pattern observed in disorders with protein accumulation. The investigation of muscle differentiation in the studied cells showed an enhancement of the myoblast fusion capacity in XMEA cells, which was not related to changes in the expression of myogenic genes. This observation indicates that the primary defect related to the XMEA pathology, as the deficiency of the vacuolar ATPase, might interfere in the process of muscle differentiation. In order to evaluate muscle in pathological conditions, we studied animal models for muscular dystrophies that have distinct patterns of muscle affection, such as the *DMD^{mdx}*, model for the Duchenne muscular dystrophy, the *SJL/J*, model for the limb-girdle muscle dystrophy type 2B and the *Large^{myd}*, model for the congenital muscular dystrophy type 1D. We did not find any global alterations in the expression of autophagic genes and proteins. Additionally, each animal model had discrete changes, highlighting the absence of correlation between the pattern of muscle degeneration and alterations in the autophagy pathway. On the other hand, when a lesion is induced in normal muscle, there is a decrease in

the expression of all studied genes, such as *Bnip3*, *Beclin1*, *Vps34*, *Atg12*, *Lc3* and *Gabarapl1*, with a possible accumulation of the autophagic proteins p62 and Beclin1. With muscle recovery, five days after lesion, most of the studied genes had their expression returning to normal levels. These results indicate that the acute lesion is related to a drastic response and rapid recovery of the autophagic pathway. Together, our results show that autophagy is differentially affected depending on the stimulus given to the muscle, either of regeneration and formation of new muscle cells or degeneration. In that sense, this study may have implications for the development of therapies that target autophagy, since it indicates that the time point of therapeutic interventions may be important, as well as the stimulus that led to alterations in the skeletal muscle tissue

Keywords: Autophagy; Muscle degeneration; Muscle regeneration; Muscular dystrophies; X-linked myopathy with excessive autophagy.

Capítulo 1. Introdução Geral

1.1 Tecido muscular esquelético

1.1.1 Formação do músculo esquelético

O tecido muscular esquelético é formado a partir de progenitores embrionários que se especificam e formam células tronco musculares, chamadas de células satélite. Tais células são capazes de se comprometer com a linhagem muscular, gerando mioblastos que se fundem formando fibras musculares multinucleadas imaturas, chamadas de miotubos (Bentzinger *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2016). O processo de miogênese é coordenado por diversos fatores (Figura 1), como os fatores de regulação miogênica MyoD (*Myoblast determination protein*), Myf5 (*Myogenic fator 5*) e Miogenina. Esses são fatores de transcrição expressos em momentos específicos da diferenciação muscular, e que se ligam a promotores de genes necessários para a formação do músculo esquelético (Brand-Saberi e Christ, 1999).

Figura 1 A miogênese começa com a especificação de células-tronco (células satélite) que se comprometem, formam células musculares únicas (mioblastos) que, por sua vez, se fundem gerando fibras musculares imaturas (miotubos). Cada etapa é coordenada por diversos fatores miogênicos, que têm sua expressão relacionada à formação de mioblastos ou miotubos. Adaptado de: Bentzinger *et al.*, 2012.

As fibras musculares imaturas passam por um processo de maturação, e formam células multinucleadas com núcleos periféricos que se encontram em feixes, gerando fibras maduras (Almeida *et al.*, 2016). Essa citoarquitetura é essencial para que o músculo esquelético exerça sua principal função, permitindo que o organismo tenha movimentos voluntários através de contrações musculares.

1.1.2 Proteínas musculares e a contração

Para que a contração muscular aconteça, as fibras musculares esqueléticas são organizadas internamente pela presença dominante de sarcômeros, que em conjunto formam as miofibrilas. Os sarcômeros são constituídos majoritariamente pelos filamentos grossos formados pela proteína miosina e pelos filamentos finos compostos pela proteína actina, que coordenadamente permitem que o músculo contraia. Quando o músculo se encontra no estado de relaxamento, tais filamentos se sobrepõem de forma parcial. Durante a contração, os filamentos deslizam uns sobre os outros, levando ao encurtamento dos sarcômeros. Os filamentos finos de actina se ligam também à matriz extracelular pela ação de diversas proteínas, que permitem a manutenção da estrutura muscular e transmissão de força durante a contração (Ervasti e Campbell, 1993). Parte destas proteínas forma o complexo distrofina-glicoproteínas associadas (DGA) (Figura 2).

No DGA destaca-se a proteína distrofina, que faz a ligação do citoesqueleto de actina à matriz extracelular (Way *et al.*, 1992; Nowak e Davies, 2004). A ligação com a matriz extracelular é mediada por diversas proteínas, como a sintrofina (Ahn e Kunkel, 1995), a α -distrobrevina (Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997) e a enzima óxido nítrico sintase (nNOS) (Brenman *et al.*, 1995), além das distroglicanas (Campbell e Kahl, 1989). As distroglicanas, α e β , são responsáveis pela ligação da distrofina à laminina, efetivamente fazendo a ligação entre os filamentos finos de actina e a matriz extracelular (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992). Modificações pós-traducionais são essenciais para a correta função das distroglicanas e, dessa forma, a interação da α -distroglicana à laminina acontece pela ligação e fosforilação de açúcares (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2010), enquanto a β -distroglicana se liga à proteína distrofina pela fosforilação de um de seus aminoácidos (Ilsley *et al.*, 2001).

Outras proteínas musculares de membrana também tem papel essencial no funcionamento do músculo, como a proteína disferlina, que permite o reparo de membrana em situações de injúria (Bansal *et al.*, 2003).

Figura 2 Complexo distrofina-glicoproteínas associadas. Fonte: Davies e Nowak, 2006.

1.1.3 Organização e importância do músculo esquelético

A organização do tecido muscular esquelético é distinta de todos os outros tecidos do organismo, fazendo com que organelas tenham limitação em seus movimentos, consequentemente interferindo também na dinâmica vesicular. Duas organelas celulares se destacam no funcionamento do tecido muscular esquelético: o retículo sarcoplasmático e as mitocôndrias (Figura 3). O retículo sarcoplasmático envolve as miofibrilas e tem a função de armazenar e regular a liberação de íons de cálcio. Quando o músculo se encontra relaxado, os níveis de íons de cálcio estão reduzidos no sarcoplasma e após estímulo nervoso para contração, o retículo sarcoplasmático os libera para que a contração aconteça. Todo o processo de contração muscular está relacionado a um grande consumo energético, tanto para o deslizamento dos filamentos do sarcômero, como para manutenção dos níveis de íons de cálcio no sarcoplasma. Dessa forma, as mitocôndrias estão também presentes em grande número no tecido muscular esquelético para suprir a demanda energética da contração.

Figura 3 Organização interna do músculo esquelético em miofibrilas constituídas por filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina. Pode-se observar também o retículo sarcoplasmático e mitocôndrias.

Fonte: www.napavalley.edu/people/briddell/Documents/BIO%20218/09_LectureOutline.pdf

O tecido muscular esquelético é o tecido mais abundante no corpo humano – 40% da massa corpórea. Por ser responsável pela contração, que é um processo que tem alta demanda bioenergética, ele é um importante local de atividade metabólica. Além disso, sua citoarquitetura abundante em miofibrilas faz com que ele seja o maior reservatório proteico, servindo como fonte de aminoácidos para produção de energia durante períodos de catabolismo. Nesse caso, proteínas do tecido são mobilizadas, há o remodelamento da rede mitocondrial e de retículo sarcoplasmático, além de perda de mionúcleos. Adicionalmente, a própria contração pode alterar ou danificar proteínas ou organelas, o que indica a necessidade de um processo de reciclagem ativo (Sandri, 2010).

1.1.4 Células satélite e regeneração muscular

O músculo adulto abriga ainda uma população de células satélite, que atuam como progenitores quiescentes que se localizam abaixo da lâmina basal das miofibras. Tais células são parcialmente indiferenciadas e mononucleadas. Elas são importantes por serem capazes de se adaptar a diversas demandas, como crescimento e injúria, quando são estimuladas. Após o estímulo inicial, essas células são ativadas, e parte delas se divide e são capazes de repor o *pool* de células indiferenciadas, enquanto outras proliferam-se e começam a expressar marcadores miogênicos. É a presença de células satélite que permite com que o músculo adulto tenha a capacidade de se regenerar. As células satélite ativadas e que começam a expressar marcadores musculares são levadas por quimiotaxia à fibra que sofreu injúria e podem, então, se fundir a elas ou fundirem-se para formação de novas fibras. Este processo permite que o músculo se recupere de traumas, como contração diária, exercício físico ou doenças associadas a tal tecido (Figura 4) (Hawke e Garry, 2001; Almeida *et al.*, 2016).

Figura 4 O processo de regeneração muscular pela ação de células satélite, através de sua ativação e fusão com fibras danificadas ou entre si. Fonte: Hawke e Garry, 2001.

Apesar da capacidade regenerativa do músculo, ainda há situações em que a perda de massa muscular ocorre. A primeira dessas situações é a atrofia muscular, que acontece em situações como denervação, inatividade, microgravidade ou como consequência de doenças. Nesse caso há perda de tamanho, força e mobilidade muscular, causada pela degradação de proteínas que acaba por exceder a síntese proteica (Sandri, 2008). Outra situação é o envelhecimento, que leva à uma condição chamada de sarcopenia, onde também há perda excessiva de massa muscular e acontece pela atrofia das fibras (Sakuma *et al.*, 2014). Por fim, uma outra forma de perda de massa muscular é a degeneração, como ocorre em distrofias, onde a degeneração de fibras musculares supera a capacidade de regeneração do músculo (Sakuma *et al.*, 2014).

1.2 Doenças neuromusculares

1.2.1 Distrofias musculares progressivas

Distrofias musculares progressivas são causadas por mutações em genes que codificam proteínas musculares, cuja deficiência ou falta de função leva à incapacidade motora. A fraqueza progressiva é causada pela degeneração de fibras musculares, geralmente acompanhada por tentativas de regeneração.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é causada por mutações no gene da distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X (Hoffman *et al.*, 1987). As mutações consistem em deleções grandes em cerca de 70% dos casos, além de duplicações ou mutações de ponto. A incidência da DMD é de 1:5000 nascimentos do sexo masculino (Yiu e Kornberg, 2015). Clinicamente, os pacientes apresentam dificuldade para andar, fraqueza progressiva, quedas frequentes e hipertrofia das panturrilhas. Por volta dos 12 anos de idade perdem a capacidade de andar e, geralmente, morrem antes dos 25 anos por deficiência respiratória ou cardíaca (Vainzof e Zatz, 2003).

As distrofias do tipo cinturas (Limb-Girdle muscular dystrophies - LGMD) são um grupo de doenças neuromusculares que se caracterizam pela fraqueza proximal dos membros (cintura pélvica e escapular) e do tronco, sem que ocorra comprometimento dos músculos faciais ou da inteligência. Essas formas de distrofia são um exemplo de heterogeneidade genética de locus, em que mutações em genes diferentes geram fenótipo semelhante. Uma forma de distrofia do tipo cinturas é a LGMD2B – distrofia muscular de cinturas tipo 2B, de herança autossômica recessiva, em que a proteína afetada é a disferlina, localizada na membrana plasmática muscular (Bashir *et al.*, 1998).

Distrofias congênitas (CMD) são aquelas em que a fraqueza muscular aparece já nos primeiros meses de vida. Muitas delas são causadas por defeitos em proteínas glicosiltransferases, responsáveis pela glicosilação da proteína α -dystroglicana. Consequentemente, ocorre a hipoglicosilação desta proteína e diminuição em sua função de receptor para outras proteínas, como a laminina 2, comprometendo a conexão final do DGA com a matriz extracelular. Na CMD1D – distrofia muscular congênita 1D – a glicosiltransferase large encontra-se mutada (Longman *et al.*, 2003).

1.2.2 Miopatia ligada ao X com autofagia excessiva (XMEA)

A miopatia ligada ao X com autofagia excessiva (XMEA) decorre de mutações no gene *VMA21*, levando a redução dos níveis de RNA mensageiro que codifica a proteína

VMA21. Essa proteína é uma chaperona que atua na correta montagem do complexo responsável por acidificar o lisossomo (*vacuolar ATPase* - v-ATPase), e permitir o funcionamento das enzimas responsáveis por digerir o conteúdo lisossômico. XMEA é caracterizada por afetar apenas meninos e apresentar sintomas iniciais na infância, com fraqueza dos músculos proximais das extremidades inferiores, progredindo para outros músculos até a perda da capacidade de andar aproximadamente aos 50 anos. Em biópsias musculares de pacientes há a formação de grandes vacúolos de conteúdo não digerido (Ramachandran *et al.*, 2013).

1.2.3 Modelos animais

Para o estudo das formas citadas de distrofias existem modelos animais naturais ou criados em laboratório que mimetizam molecularmente as distrofias humanas.

O camundongo *DMD^{mdx}* é o modelo para a distrofia muscular de Duchenne (Ryder-Cook *et al.*, 1988). Ele possui uma substituição de base no éxon 23 do gene da distrofina, resultando em um códon de parada prematuro e consequente ausência da proteína no músculo (Sicinski *et al.*, 1989). Entretanto, apesar de ser um bom modelo molecular, não é um bom modelo clínico por possuir significativa regeneração de suas fibras. Histologicamente, observa-se calibre normal das fibras e núcleos centrais (Vainzof *et al.*, 2008).

A distrofia muscular de cinturas 2B tem como modelo murino o camundongo *SJL/J*, que possui uma deleção no gene que codifica a proteína disferlina, levando a redução para aproximadamente 15% dos níveis dessa proteína no músculo dos animais afetados (Bittner *et al.*, 1999). Clinicamente, o camundongo *SJL/J* apresenta perda progressiva de massa muscular e força. Histologicamente, há discretas alterações e pouco comprometimento muscular, com progressiva piora a partir de seis meses de idade (Weller *et al.*, 1997).

Para a distrofia muscular congênita 1D identificou-se o modelo natural *Large^{myd}*, que possui uma deleção dos éxons 4-6 do gene que codifica a glicosiltransferase large. Clinicamente esses animais possuem fraqueza muscular progressiva, tamanho e expectativa de vida reduzidos, postura anormal dos membros pélvicos e estrutura óssea anormal. Histologicamente, observa-se degeneração significativa das fibras musculares, com áreas de necrose aguda, variação do calibre das fibras e presença de núcleos centrais (Barresi *et al.*, 2004; Browning *et al.*, 2005; Vainzof *et al.*, 2008).

Para estudar a via de degeneração e regeneração do músculo normal, criamos recentemente em nosso laboratório um protocolo onde utilizamos a eletroporação como causa de lesão grave do músculo. A eletroporação induz áreas de degeneração, seguidas por

tentativas de regeneração, que são reconhecidas pela presença de fibras centronucleadas (Roche *et al.*, 2011). O estudo prévio feito em nosso laboratório mostrou que três dias após a eletroporação, o animal possui muitas áreas com focos de degeneração. Cinco dias pós-lesão, observam-se áreas de regeneração que podem ser visualizadas pela marcação das fibras recém-formadas pela miosina de desenvolvimento, o que indica regeneração ativa.

1.3 Autofagia

A homeostase celular é essencial para manutenção de um organismo, e ela se baseia principalmente no balanço entre os processos de biossíntese e reciclagem. É dentro do conceito de reciclagem que se encontram os processos para degradação de proteínas na célula: o sistema ubiquitina-proteassomo e a autofagia. O primeiro tem como característica a marcação de proteínas para degradação por moléculas de ubiquitina e o direcionamento dessas para o proteassomo, que, por sua vez, faz a efetiva degradação das proteínas marcadas (Lilienbaum, 2013). A autofagia, por outro lado, está relacionada ao sistema lisossômico e está envolvida na reciclagem de organelas e proteínas (Choi *et al.*, 2013).

A ocorrência de stress como dano celular, invasão por patógenos, privação de nutrientes ou hipóxia são exemplos de sinais que podem ativar a via da autofagia. A atuação da via da autofagia provê benefícios como a remoção de organelas danificadas, limitação de infecções, além de permitir o fornecimento de substratos metabólicos para síntese proteica e para suprir demandas bioenergéticas (Lum *et al.*, 2005).

Proteínas importantes fazem parte da via da autofagia e foram primeiramente identificadas em levedura, onde são codificadas por *Autophagy Related Genes (Atg)*. Posteriormente, essas proteínas foram também identificadas em eucariotos superiores, o que mostra que tal processo é conservado durante a evolução (Nakatogawa *et al.*, 2009).

O processo da autofagia também está associado ao desenvolvimento. Ao nascimento, os níveis autofágicos se encontram aumentados para que o organismo possa sobreviver as primeiras horas de jejum (Kuma *et al.*, 2004). Em adultos, a autofagia se encontra em níveis basais e com o envelhecimento tais níveis diminuem (Rubinsztein *et al.*, 2011). A importância da regulação correta desse processo é destacada quando se observa que seu mau funcionamento está relacionado à patogênese de doenças, mostrando que o estado normal da via autofágica é essencial para sobrevivência e correto funcionamento celular (Levine e Kroemer, 2008).

A autofagia é um processo que é caracterizado por ocorrer de três formas distintas: a autofagia mediada por chaperona, em que proteínas que serão degradadas são reconhecidas por chaperonas e direcionadas ao lisossomo pela ligação ao receptor lisossomal LAMP2A (Cuervo e Wong, 2014); a microautofagia, que se dá pela invaginação direta da membrana lisossomal, capturando componentes citosólicos (Mijaljica *et al.*, 2011) e a macroautofagia, em que estruturas especializadas de dupla membrana são formadas ao redor dos alvos a serem degradados, gerando autofagossomos que se fundem ao lisossomo para permitir a degradação do conteúdo em questão (Figura 5) (Yang e Klionsky, 2010).

A macroautofagia é o mecanismo catabólico mais estudado e que tem o papel de degradar a maior parte das proteínas de longa duração e organelas. É o mecanismo que iremos abordar nesta dissertação e passaremos a nos referir a ele somente como autofagia.

Figura 5 A via da macroautofagia inicia-se com a formação de uma vesícula de dupla membrana ao redor da carga a ser degradada, formando uma estrutura chamada de autofagossomo. Tal estrutura se funde ao lisossomo, promovendo a degradação de seu conteúdo. Adaptado de: Füllgrabe *et al.*, 2014.

1.3.1 Seletividade

A autofagia também é caracterizada pela ausência ou não de seletividade. A autofagia não seletiva está relacionada à resposta a jejum ou privação de nutrientes, em que partes aleatórias do citosol são degradadas para obtenção de substratos metabólicos. Já a autofagia seletiva acontece na degradação de organelas ou agregados proteicos, que acontece mesmo em situações de abundância de nutrientes. Para tanto, a célula deve ser capaz de distinguir entre substratos para degradação e seus homólogos funcionais. Tal distinção acontece pela ação de receptores e adaptadores, que são capazes de interagir com a carga e também com a maquinaria autofágica (Reggiori *et al.*, 2012).

Os receptores que estão envolvidos na seletividade podem ser subdivididos em duas categorias. Primeiramente temos os receptores que interagem com cargas ubiquitinadas, como acontece na degradação de agregados proteicos. A proteína p62 (*sequestosome1/SQSTM1*) é

capaz de reconhecer cargas ubiquitinadas e o conjunto p62 e carga se oligomeriza, formando um agregado que é reconhecido pela proteína ALFY (*Autophagy-linked FYVE*). Essa proteína direciona o complexo ao sítio de formação do autofagossomo, onde a proteína p62 interage com moléculas da via autofágica, culminando com a degradação do conjunto (Lamark *et al.*, 2009).

O segundo tipo de receptor é aquele que interage diretamente com a carga a ser degradada, como acontece em alguns subtipos de mitofagia, que trata da degradação de mitocôndrias. Um exemplo é a proteína BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*), que se encontra na membrana de mitocôndrias em condições de hipóxia e fragmentação da organela. Esse receptor então interage diretamente com uma proteína da via autofágica, levando ao sequestro da mitocôndria danificada e direcionamento para degradação (Hamacher-Brady e Brady, 2016).

A mitofagia é um claro exemplo da seletividade que pode ocorrer no processo autofágico, já que esse é o processo responsável especificamente pela degradação de mitocôndrias danificadas via autofagia. A mitocôndria é uma organela essencial para o funcionamento celular, já que é a responsável pela produção de energia. Por outro lado, tal organela é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), que em níveis basais podem ser importantes para sinalização celular, mas em níveis aumentados podem causar danos pela oxidação de proteínas, lipídeos ou do próprio DNA. A autofagia entra então como um controle de qualidade que permite a manutenção de mitocôndrias saudáveis, e previne que mitocôndrias danificadas possam liberar ROS em níveis danosos para a célula (Ding e Yin, 2012). A mitofagia pode acontecer na presença de estímulos diversos, como a despolarização da membrana da organela, sua fragmentação, ou situações de hipóxia celular. Cada estímulo está relacionado à ativação de receptores específicos, mas que levam todos à etapa final que é a degradação da organela.

Assim que a carga é selecionada, ou diretamente no caso da autofagia não seletiva, a via autofágica é ativada.

1.3.2 Mecanismo da via autofágica

1.3.2.1 Indução da autofagia

Em mamíferos, a indução do processo autofágico depende primariamente de eventos de fosforilação, e pode ser subdividida em duas etapas. A primeira delas está relacionada ao reconhecimento de sinais do ambiente celular, como por exemplo, privação de nutrientes,

dano ao DNA ou hipóxia. A segunda etapa, por sua vez, acontece pela ativação de proteínas efetoras que sinalizam para a formação do autofagossomo. Diversas proteínas estão envolvidas na etapa inicial do processo autofágico (Figura 6).

Em condições celulares normais, a via se encontra inibida pela ação de duas principais proteínas, a forma fosforilada da Akt (*Protein Kinase B*) e mTOR (*Mechanistic Target of Rapamycin*), que é a proteína que recebe todos os sinais que provém de pistas ambientais. A proteína mTOR pode se encontrar na célula em dois complexos, o C1 e C2. O complexo mTORC1 é o que se encontra associado à inativação da autofagia. A existência de dois complexos dificulta o estudo direto de mTOR. Para transpor esse problema, geralmente são estudados efetores de mTORC1, como a proteína 4E-BP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*) e a proteína S6 (*Ribosomal protein S6*), que em suas formas fosforiladas indicam a inativação da via autofágica. A segunda etapa é mantida inativa por mTOR, que fosforila e inativa proteínas importantes para a indução, como ULK1 (*Serine/threonine-protein kinase ULK1*) e ATG13 (*Autophagy-related protein 13*). Estímulos ambientais, como a falta de nutrientes, sinalizam para a ativação da via e a inibição de mTORC1, levando à mudança no status de fosforilação das proteínas ULK1, ATG13 e FIP200 (*RBI-inducible coiled-coil protein 1*). Tal fato leva ao estímulo da atividade de ULK1, revertendo o processo inibitório, e permitindo que as proteínas da segunda etapa atuem induzindo a formação do autofagossomo (Laplante e Sabatini, 2009; Yang e Klionsky, 2010; Lilienbaum, 2013). Já foi descrito também um mecanismo de indução independente de mTORC1, em que a transcrição de genes da via autofágica se dá pela ação do fator de transcrição FoxO3 (*Forkhead box protein O3*), ativando-a (Mammucari *et al.*, 2007; Mammucari *et al.*, 2008).

Figura 6 Regulação da indução da via autofágica por fatores ambientais que sinalizam para o complexo mTORC1, ativando ou inativando a autofagia. Fonte: Lilienbaum, 2013.

1.3.2.2 Nucleação da vesícula

Após a indução, a etapa seguinte é chamada de nucleação da vesícula, em que há a formação do complexo PtdIns3k (*Phosphatidylinositol 3-kinases*), que desencadeia a formação do autofagossomo através da geração de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P). PI3P é gerado pela ação de um importante componente, a proteína VPS34 (*Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34*). A ativação de VPS34, por sua vez, depende da formação de um complexo de proteínas, que incluem PIK3R4 (*Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4*), BECLIN1, AMBRA1 (*Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1*), ATG14 (*Beclin 1-associated autophagy-related key regulator*) ou UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*) e BIF1 (*Endophilin-B1*). A proteína BECLIN1 é o alvo para inibição da via, e pela atuação de BCL-2 (*Apoptosis regulator Bcl-2*) é deslocada do complexo, inibindo a geração de PI3P. Quando a via é ativada, BH3-only (*BCL-2 homology 3*) desloca BCL-2 e permite a ativação do complexo (Füllgrabe *et al.*, 2014).

1.3.2.3 Formação e elongação do autofagossomo

A formação e elongação do autofagossomo depende de componentes-chave para o correto funcionamento da via (Figura 7). Primeiramente ATG7 (*Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7*) ativa ATG12 (*Ubiquitin-like protein ATG12*) que é posteriormente transferido para o ATG5 (*Autophagy protein 5*) com auxílio de ATG10 (*Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10*). O complexo ATG12-ATG5 é então complexado ao ATG16L (*Autophagy-related protein 16-1*), formando o complexo ATG12-5-16L, que por sua vez age no recrutamento e integração de LC3-II à vesícula (Glick *et al.*, 2010). A proteína MAP1LC3B (*Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*), chamada normalmente de LC3, é expressa no citoplasma da maioria dos tipos celulares. Em situações de ativação da via, ela é clivada pela ATG4 (*Cysteine protease ATG4*) para gerar LC3-I. LC3-I é ativado também pela proteína ATG7 e transferida para ATG3 (*Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3*), levando à sua conjugação à fosfatidiletanolamina (PE) e formação de LC3-II (Glick *et al.*, 2010). A forma lipídica de LC3 atua na formação da membrana do autofagossomo, além de ser importante na interação com alvos marcados para degradação seletiva (Kabeya *et al.*, 2000; Füllgrabe *et al.*, 2014). A síntese e processamento da proteína LC3 se correlaciona com os níveis de ativação da via autofágica, e por isso sua análise é considerada essencial para detecção dos níveis de autofagia. Proteínas da subfamília GABARAP, como GABARAPL1 (*Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1*), são também importantes nessa etapa, atuando em fases mais tardias (Chakrama *et al.*, 2010; Weidberg *et al.*, 2010).

Figura 7 Regulação da elongação da vesícula com a formação do complexo Atg12-5-16L e da forma lipídica da proteína LC3. Adaptado de: Füllgrabe *et al.*, 2014.

Enquanto a elongação está em andamento, um segundo processo ocorre de forma concomitante, é a reaquisição. Nesse ponto, o complexo ATG9 (*Autophagy-related protein 9*) - ATG2 (*Autophagy-related protein 2*) - WIP1 (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1*) e/ou WIP2 (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2*) atua capturando membranas em sítios doadores, levando-as ao autofagossomo em formação. A proteína ATG9 é capaz de ciclar entre esses dois sítios, permitindo a reciclagem de membranas (Füllgrabe *et al.*, 2014).

1.3.2.4 Finalização da vesícula e fusão com lisossomo

A etapa seguinte trata da finalização da vesícula, em que a carga se encontra totalmente encapsulada no interior do autofagossomo. A regulação dessa etapa é pouco conhecida, mas sabe-se que nesse ponto há a liberação de proteínas que participaram da formação do autofagossomo para o citosol para que possam ser reutilizadas. Uma exceção é a proteína LC3-II, que é degradada no lúmen do autolisossomo (Tanida *et al.*, 2008). A vesícula finalizada funde-se então ao lisossomo, e tal processo é coordenado pela ação de diversas proteínas, como por exemplo, as proteínas lisossomais LAMP (*Lysosome-associated membrane glycoprotein*) (Huynh *et al.*, 2007) e a GTPase Rab7 (*Ras-related protein Rab7*) (Gutierrez *et al.*, 2004).

1.3.2.5 Degradação

Após a fusão, a etapa que se segue é a de degradação. Ela acontece pela ação de catepsinas lisossomais, que são capazes de degradar o alvo (proteínas, mitocôndrias, organelas) e a membrana interna do autofagossomo. As moléculas resultantes desse processo

são então transportadas para o citosol para reuso, através de proteínas na membrana do lisossomo (Eskelinen *et al.*, 2003; Levine e Kroemer, 2008; Rong *et al.*, 2011).

1.3.2.6 Regulação da via autofágica

A regulação dos genes e proteínas envolvidos na via autofágica pode ser afetada transcricionalmente ou de forma epigenética. Diversos fatores de transcrição são responsáveis por ativar ou inibir a transcrição de genes da autofagia, como por exemplo FoxO3, que pode atuar inibindo ou ativando a via. MicroRNAs também conhecidamente atuam regulando a expressão de RNAs envolvidos nos processos de indução, nucleação, alongação e reaquisição. Epigeneticamente, marcas em histonas também se encontram associadas a menor ou maior expressão de certos genes, dependendo da modificação (acetilação, metilação) e da histona envolvida (Füllgrabe *et al.*, 2014).

Atualmente, já são conhecidas drogas que podem atuar na modulação da via, o que se torna interessante em contextos terapêuticos. A rapamicina é uma droga que atua inativando a proteína mTOR, e leva, por consequência, à ativação da autofagia. No contexto de inibição autofágica, temos a 3-metiladenina, que atua bloqueando a nucleação da vesícula e a Cloroquina e Bafilomicina A1, que exercem sua função ao impedir a fusão do autofagossomo ao lisossomo (Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2015). Adicionalmente, diversos RNAs de interferência já foram desenvolvidos para inibir genes essenciais para o funcionamento correto da via (Palmisano e Meléndez, 2016).

1.3.3 Autofagia no tecido muscular esquelético

A organização do tecido muscular e sua dependência de organelas como mitocôndrias e retículo sarcoplasmático, mostra que esse é um tecido em que a autofagia é extremamente necessária para que haja a correta reciclagem de proteínas e organelas danificadas por processos como a contração muscular.

Experimentos que visavam estudar a autofagia no músculo foram realizados para melhor compreender os efeitos dessa via no tecido muscular. A deleção específica no músculo esquelético do gene essencial à via, o *Atg7*, levou ao acúmulo de mitocôndrias anormais, distensão do retículo sarcoplasmático e desorganização do sarcômero no tecido muscular esquelético de camundongos knockout. Por consequência, houve atrofia do músculo e declínio de força dependente da idade, e a perda de massa muscular que acontece em situações de denervação e jejum foi exacerbada com a inibição do processo autofágico (Masiero *et al.*, 2009). Por outro lado, experimentos foram feitos analisando a perda de massa

muscular que ocorre durante o processo de atrofia. Já era conhecida a atuação do sistema ubiquitina-proteassomo nesse contexto, ativado pelo fator de transcrição FoxO3 (Sandri *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* e *in vivo* descreveram a atuação desse fator de transcrição no processo de autofagia, indicando que a ativação dessa via também é responsável pela perda de massa ao remover porções do citoplasma, proteínas e organelas (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Experimentos adicionais em que foram feitas deleções de genes que codificam proteínas moduladoras da via autofágica, específicas para o músculo esquelético, como as histonas deacetilases 1 e 2 (HDAC1 e HDAC2), levaram a anormalidades mitocondriais e desorganização dos sarcômeros no tecido muscular de camundongos modificados. Tais animais desenvolvem uma miopatia caracterizada por ciclos de degeneração e regeneração, devido ao bloqueio da via autofágica decorrente da ausência das HDAC 1 e 2 (Moresi *et al.*, 2012). Todos esses estudos mostraram como a autofagia é um processo importante para preservar a massa muscular e manter a integridade da fibra.

A autofagia também já foi relacionada à perda de massa muscular, como visto nas condições já citadas, atrofia, envelhecimento e degeneração. Na atrofia muscular, em que há a degradação de proteínas que excede a síntese proteica, a autofagia está aumentada. Nesse processo temos a ação de dois sistemas de degradação que são o ubiquitina-proteassomo, que está relacionado à degradação de proteínas miofibrilares (Sandri *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2006), e a autofagia, que degrada mitocôndrias e membranas do retículo sarcoplasmático. Ambos os processos estão sob a regulação do mesmo fator de transcrição, FoxO3, porém, são controlados de forma independente, o que permite o estudo isolado do processo de autofagia. Nesse caso, as moléculas efetoras são BNIP3, que tem relação também com a indução autofágica, e LC3, que em níveis aumentados é capaz de manter o processo ativo (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007).

Estudos da diferenciação de mioblastos imortalizados de camundongo (células C2C12) mostraram que a autofagia tem seus níveis aumentados durante a formação de miotubos, e que sua ativação protege tais células de morte celular por apoptose (McMillan e Quadrilatero, 2014). Sin *et al.*, 2016 indicaram que na diferenciação do mesmo tipo celular, o processo autofágico é necessário para degradar mitocôndrias presentes em mioblastos e permitir a formação de novas mitocôndrias que possuem o tipo de metabolismo necessário para o funcionamento de miotubos. Confirmando os achados anteriores, Fortini *et al.*, 2016, utilizando mioblastos derivados de células tronco musculares (células satélite) de camundongo, mostraram que a autofagia é necessária para a formação correta de miotubos.

O processo de autofagia também já foi caracterizado como de grande importância em células satélite, em que foi comprovado que esse processo é necessário para suprir a demanda energética requerida para ativação dessas células. Nesse caso, a inibição da via autofágica impede o aumento dos níveis de ATP na célula e atrasa a ativação desse tipo celular (Tang e Rando, 2014).

A relação das células satélite no envelhecimento e a via autofágica foi demonstrada recentemente. Foi observado que a autofagia basal é necessária para manter a quiescência de tais células, e que quando a autofagia diminui com o envelhecimento, processo que ocorre fisiologicamente, há acúmulo de agregados proteicos e mitocôndrias danificadas. Tal fato leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por ação epigenética ativa genes de senescência. É importante notar que a indução da via autofágica leva a recuperação da quiescência, indicando que a modulação da via pode ser benéfica para regeneração muscular (Sousa-Victor *et al.*, 2014; García-Prat *et al.*, 2016). Na sarcopenia, por sua vez, há indícios de diminuição dos níveis autofágicos, entretanto, mais estudos ainda são necessários para determinar o papel exato da autofagia na perda de massa muscular com o envelhecimento (Jiao e Demontis, 2017).

1.3.4 Autofagia em doenças neuromusculares

O primeiro estudo de autofagia em doenças neuromusculares foi feito por um grupo que estuda doenças relacionadas à deficiência de colágeno 6: a distrofia muscular congênita de Ullrich ou miopatia de Bethlem. Nesse contexto, observou-se um declínio na expressão de BECLIN1 e BNIP3, que leva ao bloqueio da autofagia, culminando no acúmulo de mitocôndrias danificadas, atrofia e necrose. Utilizando ativadores de autofagia em camundongos Col6a1^{-/-}, como dieta com baixa concentração de proteínas ou rapamicina, a via era recuperada e os músculos restaurados (Grumati *et al.*, 2010). Um experimento clínico piloto em pacientes com mutações no gene do colágeno 6 foi realizado em 2016. Tais pacientes possuem níveis autofágicos diminuídos, e a ativação da via autofágica por uma dieta pobre em proteínas levou à melhora funcional (Castagnaro *et al.*, 2016), com os níveis de autofagia retornando ao normal. Com a via autofágica normalizada, a homeostase do tecido muscular foi também recuperada.

Posteriormente, estudos foram feitos no modelo para distrofia muscular de Duchenne e evidências foram encontradas de que a via autofágica estava inibida em diversos músculos, com menor expressão de Lc3-II e evidência de ativação da via de mTOR, e que sua reativação era benéfica (De Palma *et al.*, 2012; Spitali *et al.*, 2013). A ativação farmacológica específica

da via da mitofagia também gerou benefícios funcionais (Pauly *et al.*, 2012). Recentemente, experimentos com células satélite de *DMD^{mdx}*, mostraram que no início do processo distrófico, quando a regeneração ainda ocorre, a autofagia ainda está ativa. Quando a regeneração cessa, os níveis autofágicos são reduzidos, coincidente com a redução do número de células satélite (Fiacco *et al.*, 2016). Ainda no modelo de DMD, viu-se que o stress oxidativo que é recorrente no músculo distrófico, levaria a ativação das proteínas NOX2 e SRC, que por sua vez são capazes de atuar inibindo a autofagia e diminuindo a biogênese de lisossomos (Pal *et al.*, 2014). Tal estudo propõe um mecanismo pelo qual a degeneração muscular ocorre, destacando o papel essencial dos níveis normais de autofagia no músculo.

Diferentemente, estudos no modelo murino para distrofia congênita 1A mostraram que há um aumento dos níveis de autofagia e acúmulo de autofagossomos no músculo desse modelo. Tal músculo pôde ser recuperado com o uso da 3-metiladenina, que diminui os níveis autofágicos (Carmignac *et al.*, 2011).

A miopatia ligada ao X com autofagia excessiva também foi associada ao processo de autofagia, como o nome indica. Mutações no gene que codifica a proteína VMA21 levam à ausência parcial da v-ATPase e consequente aumento no pH dos lisossomos, levando a menor disponibilidade de nutrientes no citoplasma, já que as cargas não são degradadas. A menor disponibilidade de nutrientes atua inativando mTOR e ativando o processo de autofagia, iniciando um processo de feedback positivo. Neste caso, a autofagia aumenta, leva a proliferação de autolisossomos que não conseguem passar pela etapa de degradação, culminando na vacuolização das células (Hirano e Dimauro, 2009; Ramachandran *et al.*, 2013). O mecanismo está ilustrado na figura 8.

Figura 8 O mecanismo patológico da miopatia ligada ao X com autofagia excessiva (XMEA). Fonte: Hirano e Dimauro, 2009.

Todos esses estudos mostraram que o padrão da autofagia não é afetado da mesma forma nas doenças musculares. Quando se observa o cenário de distrofias, vê-se que a autofagia excessiva ou insuficiente leva a um músculo distrófico, e que níveis normais são necessários para a existência de um músculo saudável. Importante notar que a modulação desse processo nos experimentos citados levou a normalização da via, com melhora funcional significativa. Tal fato destaca a importância terapêutica proveniente do melhor entendimento das possíveis alterações na via autofágica em diferentes contextos de degeneração e regeneração musculares.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

Dado o contexto apresentado, o objetivo do presente estudo é analisar como a via da autofagia é afetada pela degradação ou formação/regeneração do músculo, visando identificar alvos para abordagens terapêuticas.

1.4.2 Objetivos específicos

Analisar a expressão de genes e proteínas relacionadas à via da autofagia em diferentes contextos de degeneração e regeneração muscular:

- Na miogênese: em modelo celular in vitro normal e derivado de paciente com miopatia com envolvimento autofágico.
- Na patologia muscular: em modelos murinos para distrofias musculares.
- No músculo normal: em modelo com lesão muscular induzida.

Capítulo 5. Discussão Geral e conclusões

O presente trabalho visou estudar a regulação da via autofágica durante o processo de degeneração e regeneração muscular. A via da autofagia já foi associada ao correto funcionamento do músculo, sendo necessária para manutenção de sua estrutura (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Masiero *et al.*, 2009). Além disso, recentemente, trabalhos mostram que essa via é também essencial para o correto funcionamento de células satélite (Tang e Rando, 2014; Fiacco *et al.*, 2016; García-Prat *et al.*, 2016) e diferenciação de células musculares (McMillan e Quadrilatero, 2014; Fortini *et al.*, 2016; Sin *et al.*, 2016), além de estar já associada a aspectos específicos da regeneração do músculo, como remodelamento mitocondrial (Nichenko *et al.*, 2016; Call *et al.*, 2017) e tem sido relacionada à recuperação muscular em zebrafish (Saera-Vila *et al.*, 2016). Adicionalmente, a via da autofagia também já foi amplamente estudada em diversos tipos de doenças neuromusculares, mostrando alterações em seu processo de ativação (Grumati *et al.*, 2010; Carmignac *et al.*, 2011; De Palma *et al.*, 2012; Pauly *et al.*, 2012; Ramachandran *et al.*, 2013; Spitali *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2014; Fiacco *et al.*, 2016).

Todos os estudos anteriores foram essenciais para demonstrar que a autofagia é uma via de extrema importância para o tecido muscular esquelético. Entretanto, não há uma relação bem estabelecida entre os estímulos para degeneração ou mau funcionamento do músculo, ou a regeneração e a formação de novas fibras musculares com a autofagia. Por vezes, trabalhos descrevem níveis aumentados de ativação autofágica em músculos degenerados, como na distrofia muscular congênita 1A (Carmignac *et al.*, 2011), assim como em situações de regeneração muscular, como observado nos estágios iniciais da distrofia muscular de Duchenne, no modelo murino DMD^{mdx} (Fiacco *et al.*, 2016).

Nesse contexto, buscamos compreender a importância da via autofágica na formação de novas fibras musculares em um modelo celular cujo defeito genético está relacionado à própria via. Além disso, avaliamos estímulos distintos para degeneração muscular, como o processo patológico decorrente de diferentes mutações causadoras de distintas distrofias musculares, e também em um modelo de lesão muscular induzida no músculo normal, visando compreender se havia a geração de respostas similares na via autofágica.

O estudo realizado em células musculares, tanto de paciente com miopatia ligada ao X com autofagia excessiva como nas células controle, mostrou que há a tendência de ativação da via autofágica na formação de miotubos. Isto foi observado tanto pela expressão aumentada dos genes estudados, bem como no fluxo autofágico em células diferenciadas. Entretanto, não pudemos observar mudanças na expressão de genes e proteínas da autofagia com a patologia XMEA, indicando que as alterações na via autofágica características da doença podem aparecer em estados mais avançados de formação do músculo. Apesar da ausência de alterações na via da autofagia, vimos que mioblastos do paciente XMEA possuem maior capacidade de fusão para formação de miotubos multinucleados, indicando que a patologia pode interferir na miogênese ainda que não esteja afetando a via autofágica.

Este trabalho também sugeriu que não há relação direta entre o grau de degeneração muscular gerado por distintas patologias musculares e alterações na via autofágica. O modelo animal *DMD^{mdx}*, que tem o músculo gastrocnêmio com discretas alterações, mostrou níveis semelhantes ao normal quanto à expressão da maior parte dos genes e proteínas da autofagia. Já o camundongo *SJL/J*, modelo para distrofia muscular de cinturas tipo 2B, cujo músculo é bastante preservado, mostrou alterações nos genes *Beclin1* e *Gabrarpl1*, indicando que pode haver alterações pontuais na via. Por fim, no modelo para distrofia muscular congênita 1D, *Large^{myd}*, cujo músculo mostra grande degeneração, observamos alterações na expressão dos mesmos genes que o observado no *SJL/J*, além de diminuição na expressão de *Vps34*. Todos esses resultados indicam que não há uma relação direta entre grau de degeneração do músculo e mudanças na via autofágica, já que músculos preservados, como observado no *SJL/J*, podem ter alterações similares a músculos mais afetados, como visto no modelo *Large^{myd}*. Adicionalmente, não identificamos alterações globais na via autofágica em nenhum dos cenários distróficos estudados, indicando que as mudanças já descritas em distrofias podem estar relacionadas também ao estágio de progressão da doença a ao músculo estudado.

Em músculos com lesão induzida, notamos que a degeneração muscular é aguda e se relaciona com diminuição da expressão de todos os genes estudados da via autofágica e possível acúmulo das proteínas p62 e Beclin1. Quando o tecido muscular começa a se recuperar, com novas fibras sendo formadas, observamos também uma normalização da via. Nesse sentido, mostramos que um estímulo agudo e não patológico para degeneração do músculo desencadeia uma resposta drástica na via da autofagia.

Por fim, com este estudo, podemos concluir que a via autofágica é diferencialmente afetada a depender do estímulo dado ao tecido muscular. A formação de novas fibras se relaciona a aumento dos níveis autofágicos, e mudanças na autofagia esperadas com a patologia de XMEA não ocorrem em estágios precoces de formação do músculo. A degeneração muscular, por sua vez, quando progressiva, se relaciona a alterações pontuais na via autofágica, enquanto a degeneração aguda gera uma resposta intensa.

Referências Bibliográficas

AHN, A. H.; KUNKEL, L. M. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. **J Cell Biol**, v. 128, n. 3, p. 363-71, 1995.

ALMEIDA, C. F. et al. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 1078686, 2016.

BANSAL, D. et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 168-72, 2003.

BARRESI, R. et al. LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. **Nat Med**, v. 10, n. 7, p. 696-703, 2004.

BASHIR, R. et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. **Nat Genet**, v. 20, n. 1, p. 37-42, 1998.

BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 2, 2012

BITTNER, R. E. et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. **Nat Genet**, v. 23, n. 2, p. 141-2, 1999.

BRAND-SABERI, B.; CHRIST, B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. **Cell Tissue Res**, v. 296, n. 1, p. 199-212, 1999.

BRENNAN, J. E. et al. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 82, n. 5, p. 743-52, 1995.

BROWNING, C. A. et al. A rapid PCR method for genotyping the Large(myd) mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v. 15, n. 5, p. 331-5, 2005.

CALL, J. A. et al. Ulk1-mediated autophagy plays an essential role in mitochondrial remodeling and functional regeneration of skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, p. ajpccell.00348.2016, 2017.

CAMPBELL, K. P.; KAHL, S. D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 259-62, 1989.

CARMIGNAC, V. et al. Autophagy is increased in laminin $\alpha 2$ chain-deficient muscle and its inhibition improves muscle morphology in a mouse model of MDC1A. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 24, p. 4891-902, 2011.

CARON, N. J. et al. Increased myogenic potential and fusion of matrilysin-expressing myoblasts transplanted in mice. **Cell Transplant**, v. 8, n. 5, p. 465-76, 1999.

CASTAGNARO, S. et al. Autophagy activation in COL6 myopathic patients by a low-protein-diet pilot trial. **Autophagy**, v. 12, n. 12, p. 2484-2495, 2016.

CHABROL, B. et al. X-linked myopathy with excessive autophagy: a clinicopathological study of five new families. **Neuromuscul Disord**, v. 11, n. 4, p. 376-88, 2001.

CHAKRAMA, F. Z. et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. **Autophagy**, v. 6, n. 4, p. 495-505, 2010.

CHOI, A. M.; RYTER, S. W.; LEVINE, B. Autophagy in human health and disease. **N Engl J Med**, v. 368, n. 19, p. 1845-6, 2013.

CHOW, G. et al. Case of X-linked myopathy with excessive autophagy. **J Child Neurol**, v. 21, n. 5, p. 431-3, 2006.

CROCKETT, C. D. et al. Late adult-onset of X-linked myopathy with excessive autophagy. **Muscle Nerve**, v. 50, n. 1, p. 138-44, 2014.

CUERVO, A. M.; WONG, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. **Cell Res**, v. 24, n. 1, p. 92-104, 2014.

DAVIES, K. E.; NOWAK, K. J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 10, p. 762-73, 2006.

DE PALMA, C. et al. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. **Cell Death Dis**, v. 3, p. e418, 2012.

DING, W. X.; YIN, X. M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. **Biol Chem**, v. 393, n. 7, p. 547-64, 2012.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 809-23, 1993.

ESKELINEN, E. L.; TANAKA, Y.; SAFTIG, P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. **Trends Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 137-45, 2003.

FANIN, M.; NASCIMBENI, A. C.; ANGELINI, C. Muscle atrophy, ubiquitin-proteasome, and autophagic pathways in dysferlinopathy. **Muscle Nerve**, v. 50, n. 3, p. 340-7, 2014.

FIACCO, E. et al. Autophagy regulates satellite cell ability to regenerate normal and dystrophic muscles. **Cell Death Differ**, v. 23, n. 11, p. 1839-1849, 2016.

FORGAC, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 11, p. 917-29, 2007.

FORTINI, P. et al. The fine tuning of metabolism, autophagy and differentiation during in vitro myogenesis. **Cell Death Dis**, v. 7, p. e2168, 2016.

FUJITA, E. et al. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 6, p. 618-29, 2007.

FÜLLGRABE, J.; KLIONSKY, D. J.; JOSEPH, B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 65-74, 2014.

GARCÍA-PRAT, L. et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 37-42, 2016.

GE, Y. et al. mTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 297, n. 6, p. C1434-44, 2009.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, v. 221, n. 1, p. 3-12, 2010.

GRUMATI, P. et al. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1313-20, 2010.

_____. Autophagy induction rescues muscular dystrophy. **Autophagy**, v. 7, n. 4, p. 426-8, 2011.

GUTIERREZ, M. G. et al. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 13, p. 2687-97, 2004.

HAMACHER-BRADY, A.; BRADY, N. R. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 4, p. 775-95, 2016.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol** (1985), v. 91, n. 2, p. 534-51, 2001.

HERZBERG, N. H. et al. Differentiation and proliferation of respiration-deficient human myoblasts. **Biochim Biophys Acta**, v. 1181, n. 1, p. 63-7, 1993.

HIRANO, M.; DIMAURO, S. VMA21 deficiency: a case of myocyte indigestion. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 213-5, 2009.

HOFFMAN, E. P.; BROWN, R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 919-28, 1987.

HUYNH, K. K. et al. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. **EMBO J**, v. 26, n. 2, p. 313-24, 2007.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O. et al. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature**, v. 355, n. 6362, p. 696-702, 1992.

ILSLEY, J. L.; SUDOL, M.; WINDER, S. J. The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. **Cell Signal**, v. 13, n. 9, p. 625-32, 2001.

ITAKURA, E. et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 12, p. 5360-72, 2008.

JIANG, B. H. et al. Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 5, p. 2077-81, 1999.

JIAO, J.; DEMONTIS, F. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. **Curr Opin Pharmacol**, v. 34, p. 1-6, 2017.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J**, v. 19, n. 21, p. 5720-8, 2000.

KALIMO, H. et al. X-linked myopathy with excessive autophagy: a new hereditary muscle disease. **Ann Neurol**, v. 23, n. 3, p. 258-65, 1988.

KIMURA, H. et al. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. **JCI Insight**, v. 2, n. 1, p. e89462, 2017.

KONTANI, K.; MOSKOWITZ, I. P.; ROTHMAN, J. H. Repression of cell-cell fusion by components of the *C. elegans* vacuolar ATPase complex. **Dev Cell**, v. 8, n. 5, p. 787-94, 2005.

KOROHODA, W.; PIETRZKOWSKI, Z.; REISS, K. Chloramphenicol, an inhibitor of mitochondrial protein synthesis, inhibits myoblast fusion and myotube differentiation. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 31, n. 1, p. 9-13, 1993.

KUMA, A. et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**, v. 432, n. 7020, p. 1032-6, 2004.

KURASHIGE, T. et al. Elevated urinary $\beta 2$ microglobulin in the first identified Japanese family afflicted by X-linked myopathy with excessive autophagy. **Neuromuscul Disord**, v. 23, n. 11, p. 911-6, 2013.

LAMARK, T. et al. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. **Cell Cycle**, v. 8, n. 13, p. 1986-90, 2009.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 20, p. 3589-94, 2009.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.

LILIENBAUM, A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. **Int J Biochem Mol Biol**, v. 4, n. 1, p. 1-26, 2013.

LONGMAN, C. et al. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 21, p. 2853-61, 2003.

LUM, J. J.; DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 6, p. 439-48, 2005.

MAMCHAOU, K. et al. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. **Skelet Muscle**, v. 1, p. 34, 2011.

MAMMUCARI, C. et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. **Cell Metab**, v. 6, n. 6, p. 458-71, 2007.

MAMMUCARI, C.; SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M. Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. **Autophagy**, v. 4, n. 4, p. 524-6, 2008.

MASIERO, E. et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. **Cell Metab**, v. 10, n. 6, p. 507-15, 2009.

MASILAMANI, T. J.; LOISELLE, J. J.; SUTHERLAND, L. C. Assessment of reference genes for real-time quantitative PCR gene expression normalization during C2C12 and H9c2 skeletal muscle differentiation. **Mol Biotechnol**, v. 56, n. 4, p. 329-39, 2014.

MCMILLAN, E. M.; QUADRILATERO, J. Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation. **Biochem J**, v. 462, n. 2, p. 267-77, 2014.

MERKULOVA, M. et al. Mapping the H(+) (V)-ATPase interactome: identification of proteins involved in trafficking, folding, assembly and phosphorylation. **Sci Rep**, v. 5, p. 14827, 2015.

MIJALJICA, D.; PRESCOTT, M.; DEVENISH, R. J. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. **Autophagy**, v. 7, n. 7, p. 673-82, 2011.

MIYABARA, E. H. et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 is involved in differentiation of regenerating myofibers in vivo. **Muscle Nerve**, v. 42, n. 5, p. 778-87, 2010.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728-41, 2011.

MORESI, V. et al. Histone deacetylases 1 and 2 regulate autophagy flux and skeletal muscle homeostasis in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 5, p. 1649-54, 2012.

MUNTEANU, I. et al. Cardiac autophagic vacuolation in severe X-linked myopathy with excessive autophagy. **Neuromuscul Disord**, v. 27, n. 2, p. 185-187, 2017.

NAKATOGAWA, H. et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 7, p. 458-67, 2009.

NICHENKO, A. S. et al. Mitochondrial maintenance via autophagy contributes to functional skeletal muscle regeneration and remodeling. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 311, n. 2, p. C190-200, 2016.

NOWAK, K. J.; DAVIES, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. **EMBO Rep**, v. 5, n. 9, p. 872-6, 2004.

PAL, R. et al. Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Nat Commun**, v. 5, p. 4425, 2014.

PALMISANO, N. J.; MELÉNDEZ, A. RNAi-Mediated Inactivation of Autophagy Genes in *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2016, n. 2, p. pdb.prot086520, 2016.

PARK, S. et al. Autophagy induction in the skeletal myogenic differentiation of human tonsil-derived mesenchymal stem cells. **Int J Mol Med**, v. 39, n. 4, p. 831-840, 2017.

PARK, S. Y. et al. Stabilin-2 modulates the efficiency of myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle regeneration. **Nat Commun**, v. 7, p. 10871, 2016.

PARKER, M. H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 7, p. 497-507, 2003.

PAULY, M. et al. AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. **Am J Pathol**, v. 181, n. 2, p. 583-92, 2012.

RAMACHANDRAN, N. et al. VMA21 deficiency prevents vacuolar ATPase assembly and causes autophagic vacuolar myopathy. **Acta Neuropathol**, v. 125, n. 3, p. 439-57, 2013.

REGGIORI, F. et al. Selective types of autophagy. **Int J Cell Biol**, v. 2012, p. 156272, 2012.

ROCHE, J. A. et al. Physiological and histological changes in skeletal muscle following in vivo gene transfer by electroporation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, n. 5, p. C1239-50, 2011.

RONG, Y. et al. Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 19, p. 7826-31, 2011.

ROTHER, K. et al. The core autophagy protein ATG4B is a potential biomarker and therapeutic target in CML stem/progenitor cells. **Blood**, v. 123, n. 23, p. 3622-34, 2014.

RUBINSZTEIN, D. C.; MARÍN, G.; KROEMER, G. Autophagy and aging. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 682-95, 2011.

RUGGIERI, A. et al. Non-coding VMA21 deletions cause X-linked myopathy with excessive autophagy. **Neuromuscul Disord**, v. 25, n. 3, p. 207-11, 2015.

RYDER-COOK, A. S. et al. Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. **EMBO J**, v. 7, n. 10, p. 3017-21, 1988.

SADOULET-PUCCIO, H. M.; RAJALA, M.; KUNKEL, L. M. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 23, p. 12413-8, 1997.

SAERA-VILA, A. et al. Autophagy regulates cytoplasmic remodeling during cell reprogramming in a zebrafish model of muscle regeneration. **Autophagy**, v. 12, n. 10, p. 1864-1875, 2016.

SAKUMA, K.; AOI, W.; YAMAGUCHI, A. The intriguing regulators of muscle mass in sarcopenia and muscular dystrophy. **Front Aging Neurosci**, v. 6, p. 230, 2014.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda)**, v. 23, p. 160-70, 2008.

_____. Autophagy in skeletal muscle. **FEBS Lett**, v. 584, n. 7, p. 1411-6, 2010.

SANDRI, M. et al. PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 44, p. 16260-5, 2006.

_____. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399-412, 2004.

SARASTE, A. et al. No cardiomyopathy in X-linked myopathy with excessive autophagy. **Neuromuscul Disord**, v. 25, n. 6, p. 485-7, 2015.

SICINSKI, P. et al. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. **Science**, v. 244, n. 4912, p. 1578-80, 1989.

SIMIONESCU-BANKSTON, A. et al. Creatine kinase B is necessary to limit myoblast fusion during myogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 308, n. 11, p. C919-31, 2015.

SIN, J. et al. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. **Autophagy**, v. 12, n. 2, p. 369-80, 2016.

SOUSA-VICTOR, P. et al. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. **Nature**, v. 506, n. 7488, p. 316-21, 2014.

SPITALI, P. et al. Autophagy is Impaired in the Tibialis Anterior of Dystrophin Null Mice. **PLoS Curr**, v. 5, 2013.

TANG, A. H.; RANDO, T. A. Induction of autophagy supports the bioenergetic demands of quiescent muscle stem cell activation. **EMBO J**, v. 33, n. 23, p. 2782-97, 2014.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 and Autophagy. **Methods Mol Biol**, v. 445, p. 77-88, 2008.

VAINZOF, M. et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **J Mol Neurosci**, v. 34, n. 3, p. 241-8, 2008.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 5, p. 543-55, 2003.

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; XIA, H.; YUAN, J. Pharmacologic agents targeting autophagy. In: (Ed.). **J Clin Invest**, v.125, p.5-13, 2015.

VILLANOVA, M. et al. X-linked vacuolated myopathy: complement membrane attack complex on surface membrane of injured muscle fibers. **Ann Neurol**, v. 37, n. 5, p. 637-45, 1995.

VILLARD, L. et al. Linkage of X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA) to Xq28. **Eur J Hum Genet**, v. 8, n. 2, p. 125-9, 2000.

WAGATSUMA, A.; SAKUMA, K. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 593267, 2013.

WANG, M. et al. Identification of Map4k4 as a novel suppressor of skeletal muscle differentiation. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 4, p. 678-87, 2013.

WAY, M. et al. Expression of the N-terminal domain of dystrophin in E. coli and demonstration of binding to F-actin. **FEBS Lett**, v. 301, n. 3, p. 243-5, 1992.

WEIDBERG, H. et al. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. **EMBO J**, v. 29, n. 11, p. 1792-802, 2010.

WELLER, A. H. et al. Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss. **Muscle Nerve**, v. 20, n. 1, p. 72-82, 1997.

YAN, C. et al. A new congenital form of X-linked autophagic vacuolar myopathy. **Neurology**, v. 65, n. 7, p. 1132-4, 2005.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 814-22, 2010.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. **J Paediatr Child Health**, v. 51, n. 8, p. 759-64, 2015.

YOSHIDA-MORIGUCHI, T. et al. O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 88-92, 2010.

ZENG, X.; KINSELLA, T. J. BNIP3 is essential for mediating 6-thioguanine- and 5-fluorouracil-induced autophagy following DNA mismatch repair processing. **Cell Res**, v. 20, n. 6, p. 665-75, 2010.

ZHANG, P. et al. mTOR is necessary for proper satellite cell activity and skeletal muscle regeneration. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 463, n. 1-2, p. 102-8, 2015.

ZHAO, J. et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. **Cell Metab**, v. 6, n. 6, p. 472-83, 2007.