RENATA ISHIBA

Degeneração e regeneração muscular em modelos murinos com deficiência de disferlina

Muscle degeneration and regeneration in dysferlin-deficient murine models

São Paulo

2017

RENATA ISHIBA

Degeneração e regeneração muscular em modelos murinos com deficiência de disferlina

Muscle degeneration and regeneration in dysferlin-deficient murine models

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Profa. Dra. Mariz Vainzof

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

Ishiba, Renata
Degeneração e regeneração muscular em modelos murinos com deficiência de disferlina / Renata Ishiba ; Orientadora Mariz Vainzof - São Paulo, 2017.
96 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Distrofias musculares. 2. Disferlina. 3. Regeneração muscular. 4. Diferenciação muscular.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Mariz Vainzof

Orientador(a)

Dedicatória

À minha avó Rita e aos meus pais

We never know what life has in store for us. However, it's more gratifying to fight than to surrender to fears and to unknown.

Randy Romain
(Autor do livro *Facing the challenge*. Deficiente físico devido a uma doença degenerativa progressiva de causa desconhecida.)

Agradecimentos

Agradeço à Profa Mariz Vainzof, pela orientação, disponibilidade e apoio durante toda a realização deste projeto. Muito obrigada pela oportunidade, pelo aprendizado e pela paciência e carinho com que trata a todos!

Ao Dr. Vincent Mouly e à Dra. Anne Bigot do Institut de Myologie (França), pela colaboração nos experimentos e elaboração do artigo com as células humanas imortalizadas.

Ao pessoal do laboratório: André, Aurea, Camila, Dani, Leo, Letícia, Lucas, Marina, Ster, Tonho e Yumi. Em especial ao Tonho e à Yumi, pelo companheirismo e amizade e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável e divertido. Ao André, pelas conversas e ajuda com os experimentos e procedimentos com os camundongos logo que cheguei ao laboratório. À Ster e à Aurea, pela simplicidade, por serem pessoas agregadoras, sempre atenciosas e dispostas a ajudar. À Dani, que junto com a Ster, prontamente me ajudou na fase final a revisar os artigos da dissertação. À Letícia, que me iniciou e auxiliou com as culturas de células. Também por ser uma pessoa sempre de bem com a vida, molecona e carinhosa. Ao Leo e ao Lucas, pela convivência divertida, e pelas pérolas e humor negro inacreditáveis. À Marina, pela amizade e conversas animadas.

À querida Lydinha, que quando cheguei ao laboratório já estava praticamente de saída, mas que mesmo assim se tornou alguém com quem sempre posso contar. Obrigada pelo carinho e amizade!

Um agradecimento especial ao Luiz Caires Júnior, pelos direcionamentos nos experimentos. Sua disponibilidade e ajuda clara e metódica, apesar de ter parecido simples, foi essencial na minha fase inicial de aprendizado prático de bancada. Obrigada também à Giu, pela ajuda com protocolos e dicas.

À profa Cláudia Madalena Cabrera Mori da FMVZ-USP, pela doação dos camundongos *Swiss*.

À Helô pelo apoio com o manejo dos animais do biotério, pela disponibilidade em ajudar sempre da melhor forma e pelo seu bom humor que sempre rendem boas risadas.

À Martinha por toda a ajuda e apoio técnico e por sempre me tratar com carinho e atenção.

Aos funcionários do Centro de Estudos do Genoma Humano: Wagner, Van, Marta, Daniel, Fernando, Lilian, Neide e tantos outros, por contribuírem direta ou indiretamente para a execução deste projeto.

Ao querido amigo Thiago pelo apoio, por verdadeiramente se importar e trazer mais leveza em várias fases da minha vida. Muito obrigada!

À minha amiga Larissa Shiozawa, pela consideração e carinho. Criamos laços de amizade e de consideração desde os tempos da faculdade, que mesmo com a distância, se mantêm firmes.

Aos amigos Izabel, Alex e Cida. Em especial à Izabel, pelo apoio. Minha admiração pelo seu esforço e postura positiva.

Aos meus pais, Roberto e Sônia, e ao meu irmão, Ishiba, por estarem sempre ao meu lado e não pouparem esforços para me apoiar e incentivar em todos os momentos da minha vida. Obrigada por tudo!

Ao meu sobrinho Rafael, por ter trazido alegrias e descontração para as nossas vidas.

À minha avó Rita (i.m.), pelo amor simples e sincero, pelos ensinamentos de vida, pela convivência doce e divertida, por tentar me fazer rir mesmo nos seus momentos mais difíceis. Obrigada por ter feito parte da minha vida!

Aos meus tios, Natália, Bidinho e Lia, pelo carinho e união de forças nos cuidados com a minha avó.

Ao meu namorado Victor, por estar ao meu lado e cuidar de mim. Por me incentivar e apoiar, tornando mais leve essa fase de conclusão de projetos. Pelo carinho sincero e por sempre me fazer rir. Espero compartilhar ainda muitos bons momentos com você!

À FAPESP-CEPID, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada!

ÍNDICE

Nota do autor 10

Resumo 11

Abstract 12

Capítulo 1 – Introdução geral 13

1.1.Músculo esquelético e regeneração 13

1.2.Distrofias musculares 17

Distrofias Musculares de Cinturas (LGMDs) 19

1.3.Distrofia Muscular de Cintura tipo 2B (LGMD2B) 21

1.3.1. Gene *DYSF* e mutações 21

1.3.2. Proteína disferlina 22

1.3.3. Reparo de membrana 23

1.3.4. Interações proteicas e o reparo de membrana 26

1.3.5. Miogênese e o tricomplexo DYSF-FAM65B-HDAC6 29

1.4.Modelos animais 31

II – Objetivos 33

Capítulo 2 – Metodologia geral 34

1.2. Camundongos 34

2.1.1. Obtenção dos animais 34

2.1.2. Indução de lesão muscular por eletroporação 34

2.1.3. Coleta, preparação e congelamento dos músculos 35

2.1.4. Cortes histológicos 35

2.1.5. Extração de RNA e qRT-PCR 37

2.1.6. Análise estatística 38

2.2. Cultura de células humanas 39

2.2.1. Obtenção das amostras e imortalização 39

2.2.2. Fusão de miotubos 39

2.2.3. Diâmetro de miotubos 40

2.2.4. Extração de RNA e qRT-PCR 40

2.2.5. Análise estatística 41

Capítulo 3

Time course of regeneration is altered in dysferlin-deficient mice 42

Abstract 43

Resumo 44

Introduction 45

Materials and methods 47

Results 50

Discussion 57

References 62

Capítulo 4

Defective myoblast differentiation in human dysferlin-deficient cells 67

Abstract 68

Resumo 69

Introduction 70

Materials and methods 71

Results 74

Discussion 78

References 82

Capítulo 5 - Discussão geral e conclusões 85

Referências bibliográficas 89

Nota do autor

Essa dissertação seguiu o formato de apresentação em capítulos, conforme as diretrizes estabelecidas pelo Instituto de Biociências (IB-USP). No primeiro capítulo é apresentada uma introdução geral, descrevendo aspectos gerais do músculo e da regeneração muscular, bem como reunindo as principais informações disponíveis sobre o papel da disferlina em eventos de degeneração e regeneração muscular. Ao final do capítulo são expostos os principais objetivos do estudo. O Capítulo 2 traz a metodologia geral compilada. Os Capítulos 3 e 4 contêm dois manuscritos de artigos científicos, redigidos em inglês, que serão submetidos à publicação em breve. Os demais capítulos foram escritos em português. No Capítulo 5 são apresentadas a discussão geral e as conclusões dos dois trabalhos.

As referências bibliográficas dos artigos estão listadas nos respectivos capítulos de cada manuscrito. Já as referências citadas na introdução geral, metodologia geral, discussão geral e conclusões estão relacionadas ao final da dissertação. Todas as referências foram redigidas seguindo as normas da ABNT.

Resumo

ISHIBA, Renata. **Degeneração e regeneração muscular em modelos murinos com deficiência de disferlina.** 2017. 96 f. Dissertação de Mestrado (Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A distrofia muscular de cintura 2B (LGMD2B) é uma doença neuromuscular causada pela redução ou ausência da proteína sarcolemal disferlina. A disferlina está envolvida no reparo de membrana por atuar no tráfego e fusão de vesículas após estresse mecânico e, quando deficiente, as alterações nesta via levam à degeneração progressiva e irreversível das fibras musculares. A disferlina também tem sido implicada na inflamação e na miogênese durante a degeneração e regeneração muscular. Recentemente, identificou-se um tricomplexo formado pela disferlina com duas proteínas citoplasmáticas, FAM65B e HDAC6, no início da diferenciação de mioblastos. Investigar a regulação destas interações é importante para avançar na compreensão das funções da disferlina e seu papel na função muscular. Neste estudo, a miogênese e o reparo muscular foram investigados *in vivo* e *in vitro* em modelos com deficiência de disferlina. Para estudar o processo regenerativo *in vivo*, utilizamos um modelo de eletroporação para induzir degeneração/regeneração no músculo distrófico levemente afetado do camundongo disferlina-deficiente *SJL/J*. A avaliação histopatológica e a expressão relativa dos genes *Pax7*, *Myf5*, *MyoD* e miogenina foram acompanhadas durante a recuperação muscular em diferentes tempos após a lesão. Além disso, investigamos os efeitos da deficiência de disferlina na expressão dos genes *Fam65b* e *Hdac6*. Observamos um curso de tempo alterado do processo de degeneração e regeneração, com notável capacidade regenerativa nos camundongos disferlina-deficientes, caracterizada por uma resposta mais rápida e eficaz nos primeiros dias após a lesão, em comparação com os camundongos normais. Além disso, *Fam65b* e *Hdac6* foram ativados nos estágios iniciais da regeneração muscular, também com expressão mais elevada de ambos os genes no camundongo *SJL/J*. Esses resultados podem estar relacionados à uma possível condição pré-ativada do processo regenerativo no músculo de camundongos distróficos jovens. Para os experimentos *in vitro*, utilizamos células musculares humanas de pacientes com LGMD2B, com deficiência total de disferlina. A diferenciação muscular induziu a formação de miotubos mais finos e com menor frequência de núcleos por miotubo, sugerindo uma progressão retardada da formação de miotubos em células com LGMD2B. A expressão de mRNA de *MYOD* e *FAM65B* não foi aparentemente afetada pela deficiência de disferlina durante a diferenciação, enquanto *HDAC6* apresentou um pico transitório após 24 horas, apenas nas células normais. Além disso, o pico da miogenina ocorreu mais cedo nas células normais. Portanto, sugerimos que a disferlina estaria menos envolvida nos eventos iniciais de formação de pequenos miotubos, mas poderia desempenhar um papel importante nos estágios posteriores de diferenciação, que envolvem crescimento e alongamento de miotubos. Estes resultados fornecem dados interessantes para investigações adicionais de como a deficiência de disferlina afeta os reguladores miogênicos durante a diferenciação. Em conjunto, nossos dados sugerem que a deficiência de disferlina provoca alterações temporais na progressão dos eventos de regeneração muscular e de miogênese. A identificação de uma possível regulação dos componentes do tricomplexo pela disferlina pode indicar novas direções para investigar esta via como um potencial alvo para terapias.

Palavras-chave: Distrofias musculares; Disferlina; Regeneração muscular; Diferenciação muscular.

Abstract

ISHIBA, Renata. **Muscle degeneration and regeneration in dysferlin-deficient murine models.** 2017. 96 f. M.S. Dissertation (Genetics) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Limb girdle muscular dystrophy 2B (LGMD2B) is a neuromuscular disease caused by reduction or absence of the sarcolemmal protein dysferlin. Dysferlin is involved in membrane repair by acting on vesicular traffic and fusion after mechanical stress and, when deficient, changes in this pathway lead to progressive and irreversible degeneration of muscle fibers. Dysferlin has also been implicated in inflammation and myogenesis during muscle degeneration and regeneration. Recently, a tricomplex formed by dysferlin with two cytoplasmic proteins, FAM65B and HDAC6, was identified at the earlier stages of myoblast differentiation. Investigating the regulation of these interactions is important to advance in the understanding of the functions of dysferlin and its role in muscle function. In this study, myogenesis and muscle repair were investigated *in vivo* and *in vitro* in models with dysferlin deficiency. To study this effect in the regenerative process of muscle *in vivo*, we used a model of electroporation inducing muscle degeneration/regeneration in the mildly affected dystrophic muscle of dysferlin-deficient *SJL/J* mouse. The histopathological evaluation and the relative expression of the genes *Pax7*, *Myf5, MyoD* and myogenin were accompanied during muscle recovery at different time points after injury. In addition, we investigated the effects of dysferlin deficiency in the expression of genes *Fam65b* and *Hdac6*. We observed an altered time course of the degeneration and regeneration process, with remarkable regenerative capacity in dysferlin-deficient mice, characterized by a faster and effective response in the first days after injury, as compared to normal mice. Moreover, *Fam65b* and *Hdac6* were activated at the early stages of muscle regeneration, also with higher expression of both genes in the *SJL/J* mouse. These results may have been due to a possible pre-activated condition of the regenerative process in the muscle of young dystrophic mice. For the *in vitro* experiments, we used human muscle cells from patients with LGMD2B, with total deficiency of dysferlin. The muscular differentiation induced the formation of thinner myotubes and reduced frequency of myonuclei per myotube, suggesting a delayed progression of myotube formation in LGMD2B cells. mRNA expression of *MYOD* and *FAM65B* was not apparently affected by dysferlin deficiency during differentiation, while *HDAC6* exhibited a transient peak, only in healthy cells, after 24 hours. In addition, the myogenin peak occurred earlier in healthy cells. Thus, we suggested that dysferlin would be less involved in the first events of formation of early small myotubes, but could play an important role in the later stages of differentiation, which involves myotube growth and elongation. These results provide interesting data for further investigation of how dysferlin deficiency affects myogenic regulators during differentiation. Taken together, our data suggest that dysferlin deficiency causes temporal changes in the progression of the muscle regeneration and myogenesis events. The identification of possible regulation of tricomplex components by dysferlin may indicate new directions for investigating this pathway as a potential target for therapies.

Keywords: Muscular dystrophies; Dysferlin; Muscle regeneration; Muscle differentiation.

CAPÍTULO 1

I – Introdução geral

1.1. Músculo esquelético e regeneração

O músculo estriado esquelético representa cerca de 40% da massa corporal e desempenha importante papel na movimentação voluntária, na respiração e sustentação corporal. Condições genéticas patológicas que levam à progressiva degeneração e fraqueza muscular abrangem um campo de estudos complexo e importante, dado o comprometimento sobre a qualidade de vida dos pacientes. No entanto, até o momento não existem terapias eficazes para o tratamento das doenças neuromusculares, apenas técnicas paliativas para atrasar o curso das manifestações e melhorar as condições de vida do paciente. Por isso, o entendimento dos mecanismos das doenças abre caminhos para potenciais terapias.

Estruturalmente, o músculo é constituído por feixes de fibras musculares alongadas, com formato e tamanho uniformes e múltiplos núcleos de localização periférica. No citoplasma, miofibrilas compostas principalmente por filamentos de actina e miosina conferem as estriações transversais características das unidades contráteis do músculo, denominadas sarcômeros (Clark et al., 2002). Como um tecido mecanicamente ativo, o músculo retém a capacidade de se adaptar a diversos estímulos e se recuperar diante da demanda gerada por atividades como exercícios físicos intensos, crescimento e lesões.

Após dano muscular, eventos dependentes do grau da lesão são desencadeados para restabelecer a homeostase celular. Dois mecanismos de reparo podem ser destacados (Wallace & McNally, 2009). Em lesões que não comprometem a viabilidade celular, há reparo de membrana, mecanismo que envolve formação, tráfego e fusão de vesículas à região lesionada, requerendo de segundos a poucos minutos para ocorrer (Corrotte et al., 2015). Diante da impossibilidade de recuperar a integridade do sarcolema, o que ocorre em danos severos ou diante estágios crônicos de doenças neuromusculares, há degeneração e necrose das fibras musculares. O reparo muscular é então mediado pela ativação de uma população de células mononucleares denominadas células satélite, em um processo que demanda dias para o restabelecimento muscular (Sambasivan & Tajbakhsh, 2007; Bentzinger et al., 2012). As células-satélite são assim

denominadas por se posicionarem entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras musculares (Mauro, 1961). Elas constituem de 2-7% dos núcleos associados a cada fibra muscular (Rudnicki et al., 2008) e atuam como células-tronco musculares, importantes no processo regenerativo na vida adulta. Outros tipos celulares têm também sido implicados em funções miogênicas. Apesar disso, a capacidade regenerativa é essencialmente dependente das células satélite (Sambasivan et al., 2011; Relaix & Zammit, 2012).

O reparo do tecido muscular na vida adulta é um processo coordenado que recapitula eventos da formação muscular durante o desenvolvimento embrionário, com a expressão de vários determinantes da miogênese em comum (Yan et al., 2003; Bentzinger et al., 2012). Em geral, as células satélite encontram-se quiescentes, sendo ativadas em resposta à lesão. Elas podem ser identificadas pela expressão de Pax7, tanto em seu estado quiescente como ativado. Uma vez ativadas, ocorrem divisões assimétricas, em que a sinalização celular permite que uma parte da população de células satélite seja mantida em estado quiescente para garantir a manutenção do pool de células tronco musculares, enquanto outra parte torna-se comprometida com a diferenciação muscular (Hawke & Garry, 2001; Charge & Rudnicki, 2004, Relaix et al., 2006). Elas proliferam e dão origem a células precursoras miogênicas, os mioblastos, que expressam um grupo de fatores de transcrição conhecidos como Fatores Musculares Regulatórios (MRFs). Os MRFs pertencem à superfamília de fatores de transcrição bHLH (basic helix-loop-helix), que inclui MyoD, Myf5, MRF4 e miogenina. Pouco tempo após a ativação e início da proliferação, ainda há expressão de Pax7 e dois fatores regulatórios primários entram em cena, MyoD e Myf5, que agem na ativação e proliferação dos precursores miogênicos. Myf5 promove a autorrenovação de células satélite (Charge & Rudnicki, 2004), enquanto MyoD promove a progressão das células satélite para a diferenciação terminal, sendo um bom marcador para células satélite ativadas (Megeney et al., 1996). Após a fase de proliferação, Pax7 e Myf5 são reduzidos, os mioblastos se diferenciam em miócitos e se fundem, formando miotubos multinucleados. Em estágios mais avançados da diferenciação, inicia-se a expressão de miogenina e MRF4. Ocorre então a fusão de miotubos a fibras pré-existentes ou a formação de novas fibras por fusão homotípica de mioblastos (Sabourin & Rudnicki, 2000; Rudnicki et al., 2008) **(Fig. 1)**.

Não há patologias associadas a mutações dos fatores de transcrição miogênicos, no entanto, experimentos de inativação contribuem para a compreensão de suas funções

no desenvolvimento muscular. Mutações no gene *Pax7* conduzem à ausência de células satélite, por sua atuação como fator de especificação da linhagem miogênica (Seale et al., 2004). Com a inativação do gene *MyoD*, o desenvolvimento muscular é aparentemente normal, mas os níveis de expressão de *Myf5* aumentam (Rudnicki et al., 1992). Similarmente, mutações em *Myf5* não resultam em alterações na morfologia normal do músculo esquelético, no entanto os camundongos morrem por incapacidade respiratória logo após o nascimento (Braun et al., 1992). Surpreendentemente, em animais duplo-nocaute *MyoD*/*Myf5* não há formação de músculo esquelético devido à falta de fatores para a determinação miogênica, resultando em morte prematura dos camundongos (Rudnicki et al., 1993). Da mesma forma, mutações no gene da miogenina, causam morte devido à grande redução de massa muscular pela incapacidade de formar fibras secundárias (Venuti et al., 1995).

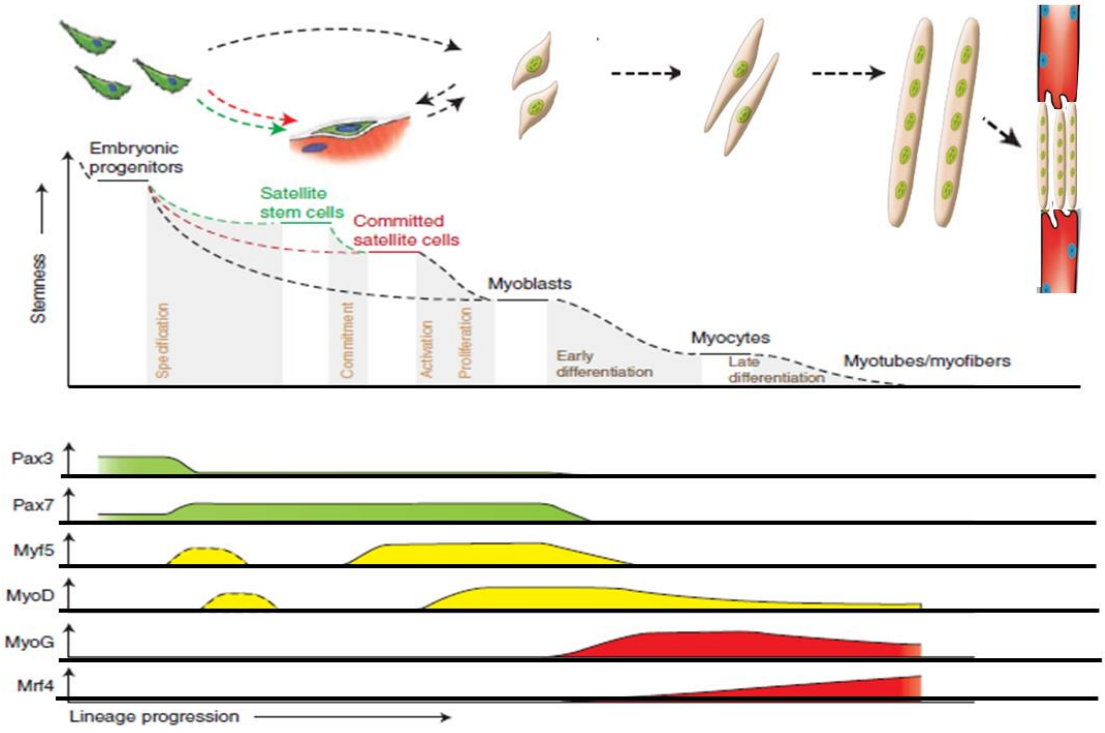

Figura 1: Representação esquemática dos fatores miogênicos envolvidos na ativação, proliferação e diferenciação de células-satélite durante a regeneração muscular. Modificado de Bentzinger et al. (2012).

Após lesão, o reparo muscular mediado por células satélite pode ser dividido em 3 fases (Huard et al., 2002; Charge & Rudnicki, 2004; Turner & Badylak, 2012): fase de degeneração, fase de regeneração e fase de remodelamento **(Fig. 2)**.

a. Fase de degeneração: após lesão, ocorre ruptura e necrose das fibras pela ativação de proteases cálcio-dependentes. A resposta inflamatória inicia-se nas primeiras horas após lesão, com infiltração de neutrófilos e macrófagos.
b. Fase de regeneração: ocorre fagocitose do tecido lesionado para remoção dos debris celulares. As células-satélite, antes em estado quiescente, são ativadas, proliferam e se diferenciam em mioblastos que sofrem fusão para formar miotubos. Estes se unem a miofibras pré-existentes, causando aumento da massa muscular (hipertrofia) ou formando novas fibras (hiperplasia). Nessa fase observam-se fibras de calibre menor e com núcleo central. Há formação de tecido cicatricial e revascularização.
c. Fase de remodelamento: em continuidade com a fase anterior, ocorre maturação e reorganização das fibras musculares. As miofibras atingem o tamanho normal e o núcleo se move para a periferia da fibra. Há remodelamento do tecido cicatricial e recuperação da capacidade funcional do músculo.

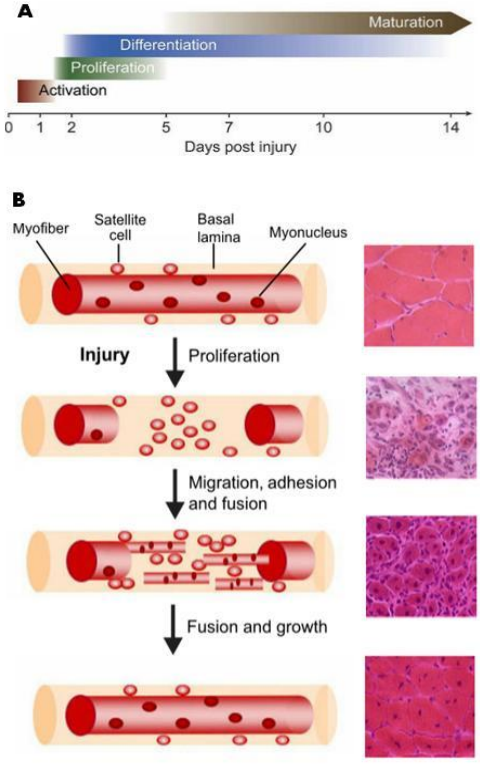

Figura 2: A –Estágios da regeneração muscular ao longo do tempo após lesão. Retirado de Shi & Garry (2006). B – Durante a recuperação muscular, há ativação e proliferação de células-satélite que migram para a região de lesão. Elas se diferenciam e formam novos miotubos, com núcleos centrais, ou se fundem a miofibras pré-existentes, contribuindo para o restabelecimento da citoarquitetura muscular. Retirado de Abmayr & Pavlath (2012).

1.2. Distrofias musculares

As distrofias musculares (DMs) compreendem um grupo de doenças genéticas que causam degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética. A fraqueza muscular ocorre pelo desequilíbrio entre os ciclos de degeneração e regeneração, em eventos que envolvem perda de fibras musculares sem que haja subsequente reposição (Onofre-Oliveira et al., 2012). O aspecto muscular é alterado para fibras com calibre variável e núcleo centralizado, áreas de necrose e infiltração de células inflamatórias. Fatores como a citocina inflamatória TGF-β1 (Transforming growth fator β1), apresentam expressão aumentada (Gosselin et al., 2004). TGF-β1 afeta a regeneração muscular por inibir a proliferação de células satélite e a fusão de miofibras (Allen & Boxhorn, 1987). Na matriz extracelular, atua na síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos (Overall et al., 1991). O processo crônico de degeneração no músculo distrófico limita a regeneração eficiente, resultando em deposição de tecido conjuntivo e adiposo (Wallace & McNally, 2009).

A grande heterogeneidade das DMs se revela nas mais de 40 formas com genes já descritos, variando quanto ao padrão de herança, grupos musculares afetados, severidade, velocidade de progressão e início das manifestações clínicas (Mercuri & Muntoni, 2013). De acordo com o padrão de distribuição de fraqueza muscular predominante, as DMs podem ser divididas em subgrupos que incluem Duchenne e Becker, Emery-Dreifuss, cinturas, fácio-escápulo-umeral, distal e oculofaríngea (Emery, 2002) **(Fig. 3)**.

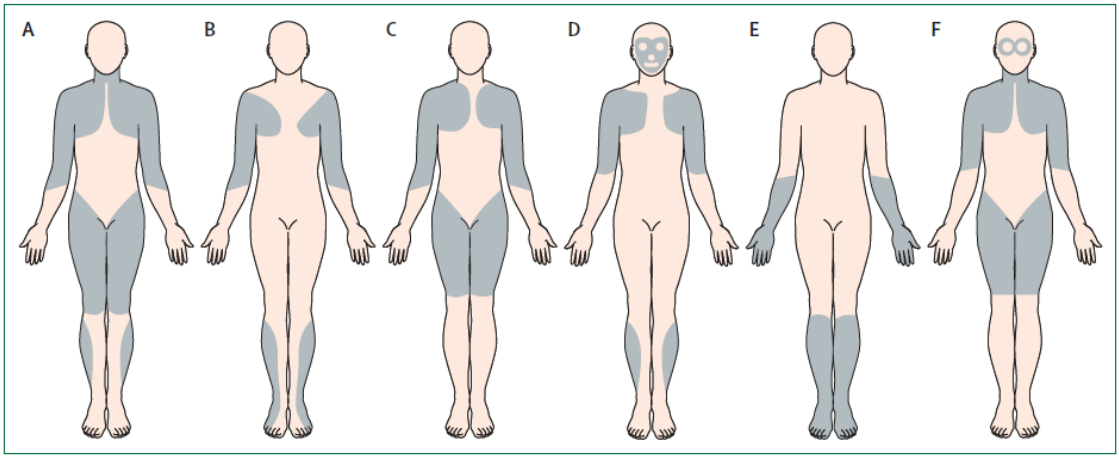

Figura 3: Padrões de distribuição de fraqueza muscular predominante nas distrofias musculares (A) Duchenne e Becker; (B) Emery-Dreifuss; (C) Cinturas; (D) Fácio-escápulo-umeral; (E) Distal; (F) Oculofaríngea. Modificado de Emery (1998).

As DMs ocorrem devido a mutações que geram deficiência parcial ou total de proteínas musculares presentes em diversos compartimentos, incluindo sarcolema, citoesqueleto, membrana nuclear e matriz extracelular. Como consequência, há comprometimento da estabilidade estrutural do músculo esquelético devido a alterações de influxo de cálcio e ao estresse oxidativo (Shin et al., 2013). Algumas distrofias envolvem disfunções de proteínas integrais e associadas à membrana que fazem parte do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Cohn & Campbell, 2000). Uma dessas proteínas, a distrofina se liga a proteínas sarcolemais e aos filamentos de actina no citoplasma, conectando o citoesqueleto miofibrilar à matriz extracelular. A deficiência de distrofina causa a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), o tipo mais comum e grave de distrofia muscular, com incidência de 1:3500 meninos. Mutações em proteínas pertencentes ao subcomplexo sarcoglicano do CDG (α-, β-, γ-, δ- e ε-SG), e em uma proteína sarcolemal denominada disferlina, estão envolvidas em um grupo grande e heterogêneo de miopatias denominadas Distrofias Musculares de Cinturas (LGMD, do inglês *Limb-Girdle Muscular Dystrophy*) (Nigro & Piluso, 2015) **(Fig. 4)**.

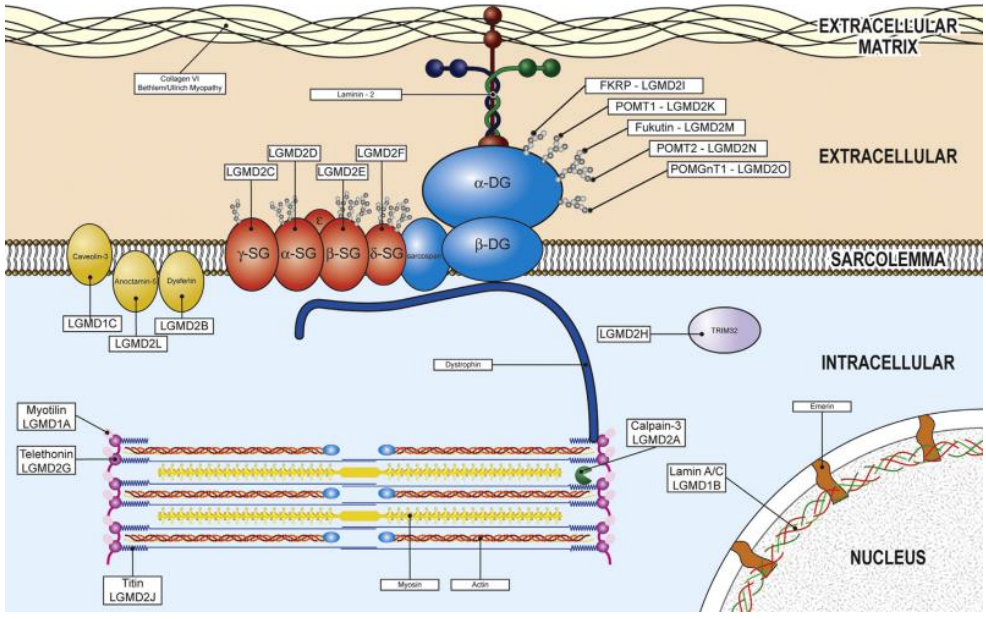

Figura 4: Organização de proteínas associadas às Distrofias Musculares de Cinturas (LGMDs). Retirado de Wicklund & Kissel (2014).

Distrofias Musculares de Cinturas (LGMDs)

As LGMDs apresentam grande heterogeneidade de lócus, com muitos genes diferentes causando quadro clínico semelhante. Há graus variáveis de comprometimento da musculatura, principalmente afetando os músculos proximais (Vainzof & Zatz, 2003).

Elas são classificadas de acordo com a herança em tipo 1 (LGMD1) para as autossômicas dominantes e tipo 2 (LGMD2) para as autossômicas recessivas. As diferentes miopatias dentro de cada tipo são indicadas por letras, seguindo a ordem em que foram descritas. Oito formas autossômicas dominantes (LGMD1 A-H) **(Tabela 1)** e vinte e quatro autossômicas recessivas (LGMD2 A-X) **(Tabela 2)** já foram descritas até o momento, envolvidas em funções estruturais e regulatórias, na estabilização do CDG, na glicosilação, no reparo de membrana, entre outras (Bushby, 1999; Laval & Bushby, 2004). As formas recessivas são as mais comuns, representando ~90% de todas as LGMDs, com uma incidência de 1:15000 (Nigro, 2003). Dentre elas, a LGMD2B, causada pela deficiência de disferlina, é a segunda forma recessiva mais frequente em muitos países, atrás apenas da LGMD2A, causada pela deficiência de calpaína (Nigro & Savarese, 2014).

Tabela 1: Distrofias Musculares de Cinturas (LGMDs) – Formas autossômicas dominantes. Adaptado de (Nigro & Savarese, 2014; Wicklund & Kissel, 2014; http://neuromuscular.wustl.edu/syncm.html).

LGMD	GENE	LOCUS	PROTEINA	FUNÇAO	LOCALIZAÇAO	INICIO	PROGRESSAO
1A	TTID	5q31.2	miotilina	estrutural	linha Z	20-40	lenta
1B	LMNA	1q22	lamina A/C	estrutural	membrana nuclear	4-38	lenta
1C	CAV3	3p25.3	caveolina 3	endocitose/ pinocitose	sarcolema	5-25	lenta/ moderada
1D	DNAJB6	7q36	DnaJB6	chaperona	citoplasma/ linha Z	25-50	lenta
1E	DES	2q35	desmina	estrutural	filamento intermediário	15-50	lenta
1F	TNPO3	7q32	transportina 3	importina	citoplasma-núcleo	1-58	lenta/ moderada
1G	HNRPDL	4q21	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	processamento de RNA	núcleo	13-53	lenta
1H	?	3p23-p25	?	?	?	10-50	lenta

Tabela 2: Distrofias Musculares de Cinturas (LGMDs) – Formas autossômicas recessivas. Adaptado de (Nigro & Savarese, 2014; Wicklund & Kissel, 2014; http://neuromuscular.wustl.edu/syncm.html).

LGMD	GENE	LOCUS	PROTEINA	FUNÇAO	LOCALIZAÇAO	INICIO	PROGRESSAO
2A	CAPN3	15q15	calpaína 3	remodelamento do citoesqueleto/ reparo de membrana/ controle do fluxo de Ca2+	citosol	5-25	moderada/ rápida
2B	DYSF	2p13.2	disferlina	fusão e tráfego de vesículas/ reparo de membrana/ miogênese/inflamação	sarcolema/ vesículas citoplasmáticas/ túbulos T	10-30	lenta
2C	SGCG	13q12	γ-sarcoglicana	estrutural	sarcolema	3-20	rápida
2D	SGCA	17q21.33	α-sarcoglicana	estrutural	sarcolema	3-20	rápida
2E	SGCB	4q12	β-sarcoglicana	estrutural	sarcolema	3-20	rápida
2F	SGCD	5q33	δ-sarcoglicana	estrutural	sarcolema	3-20	rápida
2G	TCAP	17q12	teletonina	estrutural	sarcômero	2-15	lenta
2H	TRIM32	9q33.1	tripartite motif containing32	ubiquitinação	citosol	5-30	lenta
2I	FKRP	19q13.3	fukutin related protein	glicosilação	Golgi	1-40	moderada
2J	TTN	2q24.3	titina	estrutural	sarcômero	5-20	severa
2K	POMT1	9q34.1	protein-O-mannosyl transferase 1	glicosilação	retículo endoplasmático	<5	lenta
2L	ANO5	11p13-p12	anoctamina 5	miogênese	sarcolema	20-50	lenta
2M	FKTN	9q31	fukutina	glicosilação	Golgi	<5	moderada
2N	POMT2	14q24	protein-O-mannosyl transferase 2	glicosilação	retículo endoplasmático	<2	lenta
2O	POMGnT1	1p34.1	protein O-linked mannose beta1,2-Nacetylglucosaminyl transferase	glicosilação	Golgi	12	moderada
2P	DAG1	3p21	distroglicana	estrutural	sarcolema	3	moderada
2Q	PLEC1	8q24	plectina	dinâmica do citoesqueleto	citosol	<5	lenta
2R	DES	2q35	desmina	estrutural	filamento intermediário	1-25	-
2S	TRAPPC11	4q35	transport protein particle complex 1	tráfego de vesículas	citosol	5-10	lenta
2T	GMPPB	3p21	GDP-mannose pyrophosphorylase B	glicosilação	citosol	<5	lenta
2U	ISPD	7p21	Isoprenoid synthase domain containing	glicosilação	-	<1	rápida/ moderada
2V	GAA	17q25.3	Alpha-1,4-glucosidase	conversão de enzima lisossomal	lisossomo	Variável	variável(rápida a lenta)
2W	LIMS2	2q14	Lim and senescent cell antigen-like domains 2	Modula o crescimento e migração celular	Citosol	Infância	-
2X	POPDC1/ BVES	6q21	Popdc1	Tráfego de membrana	sarcolema, túbulos-T, membrana nuclear	30-50	Lenta

1.3. Distrofia Muscular de Cintura tipo 2B (LGMD2B)

A Distrofia Muscular de Cintura tipo 2B (LGMD2B) (Bashir et al., 1998) faz parte de um grupo de miopatias, coletivamente chamadas de disferlinopatias. Além da LGMD2B, outros fenótipos são relatados como a Miopatia de Miyoshi (Liu et al., 1998) e a Miopatia Distal com início no tibial anterior (Illa et al., 2001). Elas se distinguem por apresentarem diferenças no comprometimento muscular primário, iniciando nos músculos proximais na LGMD2B e nos músculos distais gastrocnêmio e tibial anterior nas miopatias de Miyoshi e Distal, respectivamente (Urtizberea et al., 2008). As disferlinopatias são causadas por mutações no gene que codifica a disferlina, uma proteína sarcolemal de distribuição ubíqua, com expressão predominante no músculo esquelético e no coração (Anderson et al., 1999). A deficiência dessa proteína provoca fraqueza muscular, inflamação e elevada concentração plasmática da proteína muscular creatina quinase (Bashir et al., 1994).

A LGMD2B manifesta os primeiros sintomas comumente entre 15 e 25 anos de idade. Antes disso, os indivíduos não apresentam comprometimento muscular, sendo frequentemente ativos em esportes (Angelini et al., 2011). A progressão é lenta, em geral, levando a dependência de cadeiras de rodas entre 10 a 20 anos após o início dos sintomas (Wicklund & Kissel, 2014). O diagnóstico pode ser baseado na detecção de redução ou ausência de disferlina por western blotting ou por imunohistoquímica de biópsias musculares. Uma investigação mais precisa é obtida por sequenciamento de DNA (Kesper et al., 2009; Lo et al., 2008; Wicklund & Kissel, 2014).

1.3.1. Gene *DYSF* e mutações

O gene responsável pela LGMD2B foi mapeado no cromossomo 2p13, composto por 55 exons em sua forma canônica. Cerca de 266 mutações afetando diferentes regiões da proteína já foram descritas, sem indícios de *hotspots*, tornando a análise mais trabalhosa. A maioria das mutações é de ponto (51,1%), das quais 64,8% são *missense* e 35,2% *nonsense*. O restante corresponde a deleções e inserções (31,6%), além de mutações intrônicas (17,3%) (Blandin et al., 2012).

Há relevante variedade entre os pacientes quanto à severidade das manifestações clínicas. A heterogeneidade clínica ocorre mesmo entre pacientes da mesma família, com

a mesma mutação causando LGMD2B ou Miopatia de Miyoshi. Por isso, uma relação genótipo-fenótipo é difícil de ser definida (Weiler et al., 1999). Possíveis causas podem estar relacionadas ao efeito de genes modificadores, interferência de fatores ambientais, modulação por interações entre proteínas e ação de microRNAs. Embora, ainda não bem compreendido, os avanços nesses segmentos podem trazer respostas para a complexa interpretação da relação genótipo-fenótipo (Carter et al., 2013).

Alguns exemplos podem ser citados para esses casos. Em estudos com camundongos *mdx*, deficientes para a proteína distrofina, a regulação positiva de mioferlina sugere sua possível função como gene modificador em distrofias musculares. Uma vez que a mioferlina partilha alto grau de homologia com a disferlina, ela poderia atuar compensando sua deficiência (Weiler et al., 1999; Davis et al., 2000). Publicações nos últimos anos também têm evidenciado a importância de intrincadas interações proteicas no entendimento de mecanismos patológicos (Hao et al., 2014). Adicionalmente, fatores externos podem contribuir para as divergências encontradas. Um estudo que investigou a influência de atividades precedentes ao início dos sintomas no curso e progressão das disferlinopatias em pacientes mostrou que indivíduos muito ativos em esportes têm uma evolução mais rápida da doença após os primeiros anos do início dos sintomas (Angelini et al., 2011). Outros fatores como a ação de microRNAs na regulação da expressão gênica revelam um campo promissor a ser aprofundado (Ge & Chen, 2011). Eisenberg et al., 2007 relatou considerável número de microRNAs regulados positivamente em diferentes distrofias, comparados ao músculo normal e sugeriu que nas disferlinopatias, o padrão distinto de microRNAs encontrado entre a LGMD2B e a Miopatia de Miyoshi pode ser um indício de um mecanismo regulatório secundário modulando os diferentes fenótipos.

1.3.2. Proteína disferlina

O transcrito do gene da disferlina codifica uma proteína transmembrana de 237 kDa. O nome disferlina foi dado devido à sua homologia com o fator *fer-1* do nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Esse fator está associado à fusão de vesículas durante a espermatogênese e faz parte da família ferlina de proteínas que também inclui a otoferlina (Yasunaga et al., 1999) e a mioferlina (Davis et al., 2000), homólogas à disferlina. Membros dessa família apresentam domínios C2, encontrados nas sinaptotagminas. Eles

funcionam como sensores de cálcio e interagem com proteínas SNARE, proporcionando o tráfego e a fusão de membranas (Bansal & Campbell, 2004; Glover & Brown, 2007).

A disferlina está localizada preferencialmente nos túbulos-T do músculo maduro. Os túbulos T são invaginações do sarcolema em estreita proximidade com retículo sarcoplasmático. Essas regiões encontram-se associadas à canais de cálcio do tipo L, desempenhando funções na manutenção da homeostase de cálcio durante estresse mecânico (Kerr et al., 2014). Estruturalmente, a disferlina é formada por sete domínios C2 e dois domínios Dysf, ancorada ao sarcolema por seu domínio C-terminal (Sula et al., 2014). A extremidade amino-terminal com o domínio C2A é a mais bem caracterizada por ligar-se a fosfolipídeos de forma cálcio-dependente. Os demais domínios, embora não bem definidos funcionalmente, têm afinidade variável por cálcio e fosfolipídeos (Davis et al., 2002).

Diversos trabalhos buscando investigar a função da disferlina foram publicados nos últimos anos, apontando para o seu papel no reparo de membrana (Bansal et al., 2003; Cenacchi et al., 2005), inflamação (Han, 2011) e miogênese (De Luna et al., 2006; Roche et al., 2008; Chiu et al., 2009, Roche et al., 2010; Cohen et al., 2012).

1.3.3. Reparo de membrana

As células são capazes de reparar o sarcolema em segundos a poucos minutos após estresse mecânico. A resposta a danos sarcolemais é potencializada pelo influxo de cálcio que desencadeia uma cascata de interações proteicas culminando em rápido reparo de membrana (Davenport et al., 2016).

Os mecanismos de reparo variam dependendo da extensão da lesão e alguns deles podem coexistir. Lesões mecânicas maiores que 100 nm promovem exocitose de agregados vesiculares no chamado *patch model*, enquanto em lesões formadoras de poros menores que 100 nm, como as produzidas por toxinas bacterianas, há exocitose de lisossomos. Esses mecanismos podem coexistir (Cooper & McNeil, 2015).

O *patch model*, a hipótese mais largamente aceita para lesões de alto calibre, descreve a remoção de danos pela selagem do sarcolema por exocitose. Nesse modelo, vesículas intracelulares sofrem fusão homotípica vesícula-vesícula na região subsarcolemal adjacente ao local lesionado. Em seguida, ocorre exocitose por fusão

heterotípica dos agregados vesiculares com o sarcolema, selando a região danificada (Davenport et al., 2016). O trecho de membrana exocitado, chamado de *patch*, expõe o lado interno das vesículas intracelulares, rico em fosfatidilserina, para o meio extracelular. A disferlina exerce um papel importante para o acúmulo desse lipídio de membrana no local de lesão, se ligando a ele de forma cálcio dependente. Em um trabalho recente, a remoção da lesão foi associada ao reconhecimento de fosfatidilserina por macrófagos que fagocitam partes do *patch*, restabelecendo a integridade de membrana (Middel et al., 2016).

A origem das vesículas intracelulares ainda não está bem elucidada. Um autor propõe que após dano, actina cortical recruta sarcolema adjacente, contendo naturalmente disferlina transmembrana em sua composição para o local lesionado, comprimindo o tamanho da lesão. Nesse recrutamento, criam-se regiões ricas em disferlina próximas à lesão. Simultaneamente, porções distais do sarcolema sofrem endocitose formando as vesículas intracelulares. As vesículas sofrem fusão entre si e com lisossomos para formar vesículas maiores que reparam a lesão via interações com a zona rica em disferlina, anteriormente formada. O tráfego e fusão de vesículas requer microtúbulos e a cinesina KIF5B. O rompimento da ligação vesículas-microtúbulos ou a deficiência de disferlina levaria a defeitos no reparo de membrana por redução da exocitose e acúmulo citoplasmático de pequenas vesículas contendo disferlina na região subsarcolemal (McDade & Michele, 2014) **(Fig. 5)**.

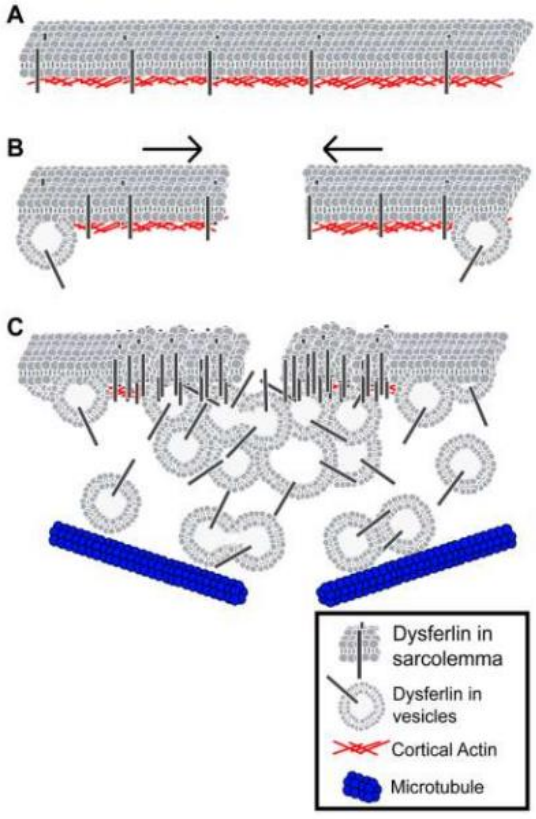

Figura 5: Modelo de reparo de membrana: *patch model*. A: No músculo intacto, a disferlina encontra-se no sarcolema. B: Diante de lesão, a actina cortical contribui para que regiões de membrana com disferlina adjacentes se desloquem para o local da lesão. Regiões sarcolemais distais ao local da lesão são endocitadas, formando vesículas contendo disferlina em suas membranas. C: Essas vesículas agregam-se homotipicamente, formando vesículas maiores que se fundem ao sarcolema para selar o local lesionado. Retirado de McDade - PhD Thesis (2014).

Em lesões menores, formadoras de poros, o influxo de cálcio provoca exocitose de lisossomos que se fundem individualmente à membrana, liberando o ácido esfingomielinase no meio extracelular. Essa enzima é importante para desencadear a endocitose das regiões de lesões. Na endocitose, o ácido esfingomielinase liberado converte um lipídio de membrana, a esfingomielina, em ceramida na região externa da membrana. O resultado é a formação de um microdomínio que é invaginado na região de lesão, permitindo a remoção dos danos (Tam et al., 2010). A deficiência de disferlina leva à redução da exocitose de lisossomos, diminuindo o reparo (Defour et al., 2014) **(Fig. 6)**.

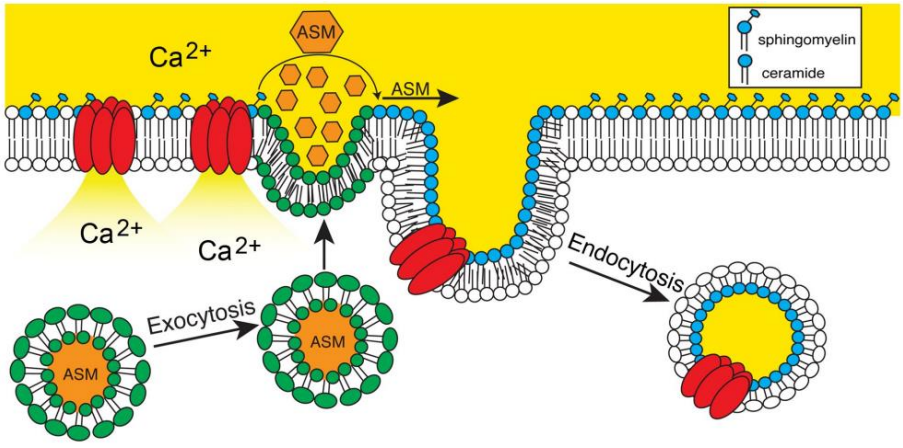

Figura 6: Modelo de reparo de membrana: exocitose de lisossomos. Há influxo de cálcio extracelular através de poros (em vermelho) formados por lesões sarcolemais, tais como causados por alguns tipos de bactérias. A resposta celular é de exocitose de lisossomos que ao ser fundirem ao sarcolema liberam seu conteúdo de ácido esfingomielinase. Essa enzima age sobre lipídios da superfície sarcolemal, convertendo esfingomielina em ceramidas. Nessas regiões criam-se microdomínios que são endocitados, internalizando e removendo as regiões lesionadas. Retirado de Tam et al. (2010).

1.3.4. Interações proteicas e o reparo de membrana

A disferlina encontra-se em estreita proximidade com canais de cálcio do tipo L (também referidos como DHPR - *dihydropyridine receptor*) nos túbulos-T (Ampong et al., 2005), consistente com sua função dependente de sinalização por cálcio. Diante de estresse mecânico, o influxo de cálcio devido a danos ao sarcolema funciona como sensor para a ativação de uma cascata de interações proteicas com a disferlina, desencadeando o reparo de membrana (Bansal et al., 2003). Nesse processo, há agregação e translocação de vesículas intracelulares, contendo disferlina em suas membranas, para a região da lesão por meio de cinesinas motoras. As vesículas se acumulam na região subsarcolemal adjacentes à lesão e fundem entre si e, por fim, com a região danificada por exocitose, restabelecendo a homeostase celular (McDade & Michele, 2014). Nas disferlinopatias, o estresse mecânico provoca o desbalanço de cálcio por falhas no reparo de membrana. A proteólise e exposição prolongada ao ambiente extracelular oxidativo conduz à necrose e inflamação (Kerr et al., 2014).

Para exercer sua função, a disferlina interage com várias proteínas musculares, entre elas a caveolina-3 (Matsuda et al., 2001), as anexinas A1, A2 e A6 (Lennon et al., 2003; Roostalu & Strähle, 2012), a calpaína-3 (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008), a AHNAK (Huang et al., 2007) e a mitsugumina 53 (MG53) (Cai et al., 2009) **(Fig. 7)**.

No músculo normal, intacto, a caveolina-3 (cav-3) está colocalizada com a disferlina no sarcolema. A cav-3 contribui para a formação de cavéolos, invaginações do sarcolema com função de endocitose, e para a formação de túbulos-T (Parton et al., 1997; Waddel et al., 2011). Ela mantém um pool de disferlina no sarcolema por inibir sua endocitose (Hernandez-Deviez et al., 2008). Sua deficiência causa a LGMD1C e resulta em redução secundária de disferlina no sarcolema pela agregação e retenção de ambas no complexo de Golgi, o que sugere um possível papel da cav-3 no transporte pós-Golgi de disferlina para o sarcolema (Matsuda et al., 2001, Waddel et al., 2011).

A mitsugumina 53 (MG53), também chamada de TRIM72 (*tripartite motif* 72), interage com a disferlina e a caveolina 3, participando dos eventos iniciais do reparo de membrana. Ela se acumula na região de lesão antes da disferlina e facilita o deslocamento de vesículas para o local da lesão. A MG53 se liga à fosfatidilserina, presente na membrana das vesículas e na superfície interna do sarcolema, auxiliando na translocação de vesículas ao local da lesão. Esse processo funciona de uma maneira dependente de exposição ao meio extracelular oxidativo, o que ocorre diante de lesões sarcolemais (Cai et al., 2009). A ação antagonista da cav-3 controla a reciclagem de membranas através do equilíbrio entre exocitose e endocitose (Cai et al., 2009).

As anexinas, acionadas pelo influxo de cálcio, atuam agregando vesículas para o local da lesão. As anexinas A1, A2 e A6 são depositadas de forma ordenada na região lesionada. A adição de cada uma é dependente da correta deposição da antecedente. Inicialmente, membranas de vesículas ricas em disferlina e anexina A6 citoplasmática acumulam-se no local da lesão, de forma independente. Em seguida, a anexina A2 é depositada e, alguns minutos depois, a anexina A1 (Roostalu & Strähle, 2012). As anexinas A1 e A2 interagem com a disferlina na região do sarcolema e também estão presentes no citoplasma, onde a anexina A1 e A2 ligam-se a proteínas da família S100, conhecidas por atuar na reorganização de actina em eventos de endocitose e exocitose. A calpaína 3, uma protease não lisossomal, atua na clivagem das anexinas A1 e A2, aumentando a afinidade dessas proteínas por fosfolipídeos, o que possibilita a agregação e fusão de vesículas próximo à região de lesão (Lennon et al., 2003).

A calpaína 3 contribui para o remodelamento do citoesqueleto cortical, removendo a barreira física para os eventos de fusão. Além disso, estimula o domínio C2A da disferlina a recrutar vesículas intracelulares para a exocitose através da

modulação da interação da disferlina com determinadas proteínas. A deficiência de calpaína 3 causa a LGMD2A e, em pacientes com LGMD2B, é relatada uma redução secundária dos níveis dessa proteína (Huang et al., 2008).

A AHNAK interage com a disferlina em seu domínio C2A e sugere-se que proporcione a rápida exocitose de agregados de vesículas para o sarcolema. A calpaína 3 modula essa interação, utilizando AHNAK como substrato. Nas disferlinopatias, a deficiência de disferlina é acompanhada por uma redução secundária de AHNAK. No músculo normal em regeneração, ambas as proteínas se deslocam para o citoplasma, consistente com a direta interação entre elas (Huang et al., 2007; Huang et al., 2008).

Em muitas distrofias musculares, a expressão de disferlina está reduzida (Matsuda et al., 2001; Huang et al., 2008) ou alterada para um acúmulo em vesículas citoplasmáticas. Ainda não foi elucidado o que provoca essa distribuição diferencial (Piccolo et al., 2000; Bansal & Campbell, 2004).

Apesar dos avanços, mais estudos são necessários para entender o papel da disferlina, bem como suas interações com outras proteínas.

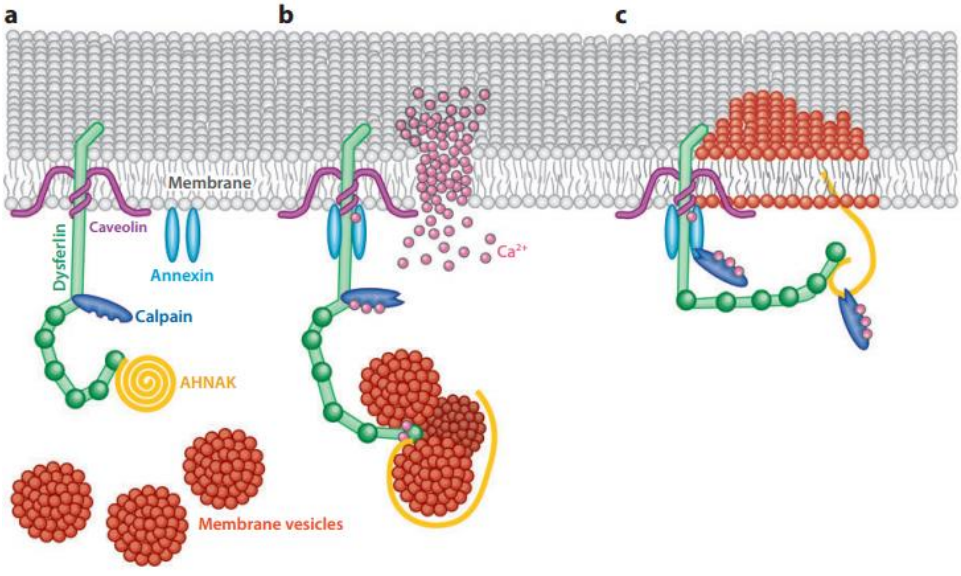

Figura 7: Sequência de eventos após lesão sarcolemal e proteínas envolvidas no reparo de membrana. a: A disferlina, localizada no sarcolema e túbulos T, interage com a caveolina, anexinas, calpaína e AHNAK. b: Diante de lesão, o influxo de cálcio promove ativação e modificações na conformação de proteínas. Informações mais detalhadas estão descritas no texto. C: Ao final, vesículas celulares agregadas se fundem à membrana, selando a região lesionada. Modificado de Wallace & McNally (2009).

1.3.5. Miogênese e o tricomplexo DYSF-FAM65B-HDAC6

Na impossibilidade de reparar a membrana, como em lesões que comprometem a viabilidade celular, as fibras musculares sofrem necrose e são repostas pela proliferação e diferenciação de células satélite (Middel et al., 2016).

As complexas interações com a disfelina não se restringem à função de reparo de membrana. Outras proteínas têm sido descobertas por atuarem conjuntamente com a disferlina durante a miogênese.

A expressão de disferlina aumenta durante a diferenciação muscular o que sugere sua função na regeneração muscular. Apesar disso, o modo como a disferlina interfere na formação de miotubos ainda se encontra pouco compreendido. Azakir et al., 2010 relatou que a disferlina interage, através de seus domínios C2A e C2B, com a forma polimerizada da α-tubulina, um componente dos microtúbulos, tanto em mioblastos como em miotubos, de uma forma independente de cálcio. A forma acetilada da α-tubulina está associada à estabilidade dos microtúbulos, necessária para a elongação do miotubos (Asthana et al., 2013).

Acetiltransferases e desacetilases atuam no controle dinâmico do estado de polimerização de tubulinas dos microtúbulos, particularmente a HDAC6 (*histone deacetylase 6*) é bem caracterizada por sua função como desacetilase, catalisando a remoção de grupos acetil. Além disso, participa de múltiplas funções atuando sobre a motilidade celular, sobrevivência celular, inflamação, degradação de proteínas, sinalização celular e transcrição. Dessa forma, HDAC6 é um promissor alvo terapêutico, dado o seu envolvimento com diversos processos biológicos. Essa enzima tem localização predominantemente citoplasmática e atua sobre substratos não histônicos como Hsp90 (*heat shock protein-90*), cortactina e α-tubulina acetilada (Hubbert et al., 2002; Di Fulvio et al., 2011; Li et al., 2013; Asthana et al., 2013). No músculo, a presença de HDAC6 livre permite a desacetilação, provocando a despolimerização dos microtúbulos. A disferlina interage com HDAC6 e aumenta a acetilação de α-tubulina por ligar-se a HDAC6 através de seu domínio C2D e inibir fisicamente sua ação enzimática. A modulação da acetilação é importante durante a diferenciação miogênica. A hiperacetilação de α-tubulina no início da miogênese compromete a diferenciação, mas em estágios posteriores é importante para a elongação dos miotubos. Esse controle dinâmico do estado de acetilação é condizente com a expressão temporal de disferlina.

No início da diferenciação, com os níveis reduzidos de disferlina, HDAC6 livre pode atuar na desacetilação, impedindo uma hiperacetilação nessa fase que prejudicaria a formação de miotubos. No entanto, o aumento da acetilação de α-tubulina no decorrer da diferenciação, associado ao aumento da expressão de disferlina e menos HDAC6 livre, é importante para que haja a elongação dos miotubos (Di Fulvio et al., 2011) **(Fig. 8)**.

Adicionalmente, no início da diferenciação, outra proteína citoplasmática, a FAM65B foi relatada recentemente por ligar-se transientemente à disferlina. A FAM65B apresenta múltiplas isoformas, com funções na migração de mioblastos e rearranjo do citoesqueleto. No músculo está presente sob a isoforma 2, que fica ativada quando em associação com HDAC6 e disferlina, formando um tricomplexo que atua na fase inicial da diferenciação de mioblastos (Balasubramanian et al., 2014). A inibição de *Fam65b* causa diminuição expressiva de miogenina, afetando a fusão e diferenciação de mioblastos, enquanto a sua superexpressão induz a formação de protrusões celulares (Yoon et al., 2007; Hirayama & Kim, 2007; Diaz-Horta et al., 2014). O efeito da deficiência de disferlina na expressão dos componentes do tricomplexo é desconhecido (Balasubramanian et al., 2014).

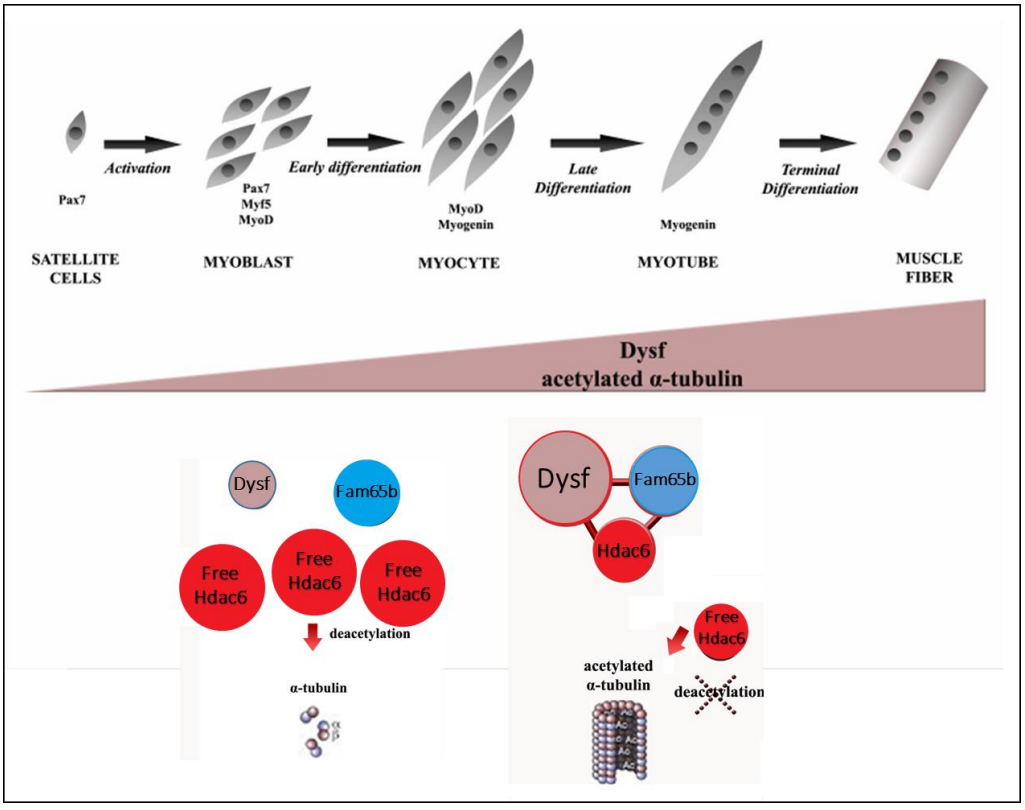

Figura 8: Expressão de fatores miogênicos e do tricomplexo FAM65B-HDAC6-DYSF durante a diferenciação muscular.

1.4. Modelos animais

Diversos modelos animais, com fenótipos de doenças neuromusculares, encontrados na natureza ou produzidos em laboratório, podem ser utilizados para estudos histopatológicos, fisiológicos, genéticos e clínicos. Tais modelos geralmente apresentam alterações semelhantes às encontradas em humanos e podem, dessa forma, ser utilizados para a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos, assim como ferramenta para o estudo e viabilização de terapias (Vainzof et al., 2008). Apresentando deficiência de disferlina, o *SJL/J* é utilizado como modelo natural no estudo da Distrofia Muscular de Cintura tipo 2B (LGMD2B). Os camundongos apresentam redução na quantidade de disferlina para aproximadamente 15% do encontrado em animais normais. Isso se deve a uma mutação em um sítio de *splicing* do gene que codifica a disferlina, levando a uma deleção de 171pb (exon 45), com remoção de 57 aminoácidos no domínio C2E. As alterações histológicas são discretas e há pouco comprometimento muscular, que pode se intensificar com a idade (Bittner et al., 1999). O fenótipo brando dificulta o estudo da regeneração, o que pode ser contornado por indução de lesão muscular, método rápido que permite avaliar *in vivo* o grau de comprometimento em diferentes linhagens distróficas.

Não há no momento cura para as distrofias musculares. O tratamento é apenas paliativo através de corticoesteróides, fisioterapia e intervenções cirúrgicas. Dessa forma, é essencial compreender os mecanismos de doenças neuromusculares para obter potenciais alvos terapêuticos.

Vários modelos de lesão muscular têm sido utilizados para o estudo da regeneração muscular, incluindo danos induzidos por vias químicas e mecânicas. Nos métodos químicos que utilizam toxinas, apesar da fácil aplicação e reprodutibilidade, nem todos tem os efeitos biológicos são totalmente conhecidos (Chargé & Rudnicki, 2004). Dessa forma, foi utilizado nesse estudo um modelo de lesão mecânica, implantando previamente no laboratório, através da indução de danos por eletroporação. Esse método mostrou-se rápido e eficaz para o estudo do processo de degeneração/regeneração.

Com base nessas premissas, foi traçado um padrão dos processos de degeneração e regeneração no modelo murinho distrófico *SJL/L* após indução de lesão muscular e

correlacionada a deficiência de disferlina com o grau de comprometimento no reparo tecidual por análises das alterações moleculares e histológicas. Adicionalmente foram caracterizadas as alterações da expressão dos componentes do tricomplexo DYSF-FAM65B-HDAC6 no decorrer da recuperação muscular. Os resultados sugerem que não há comprometimento da regeneração em camundongos com deficiência de disferlina. No entanto, o padrão de regeneração é alterado, iniciando precocemente nos primeiros dias após a lesão, enquanto uma expressão tardia dos fatores miogênicos é observada no controle normal. *Fam65b* e *Hdac6*, assim como os fatores miogênicos, aumentaram durante a regeneração muscular. No entanto, os níveis de expressão gênica em *SJL/J* foram significativamente maiores, indicando que a deficiência de disferlina também afeta a expressão desses componentes. Adicionalmente, analisamos a expressão de fatores miogênicos e dos componentes do tricomplexo em experimentos de diferenciação muscular *in vitro*, utilizando células de paciente com LGMD2B. Observamos atraso do desenvolvimento de miotubos, com maior frequência de miotubos com menor diâmetro e poucos núcleos nas culturas de células disferlina-deficientes. *FAM65B* apresentou expressão inalterada durante a diferenciação de células normais e disferlina-deficientes. No entanto, o pico de expressão de miogenina ocorreu antes nas células normais. Além disso, a expressão de *DYSF* aumentou durante a diferenciação e os níveis de *HDAC6* tiveram um aumento transiente após 24h da diferenciação muscular apenas nas células normais, enquanto expressão inalterada desses genes foram detectadas nas células com ausência de disferlina. Esses resultados, em conjunto, indicam que a deficiência de disferlina afeta a progressão da diferenciação muscular, prejudicando a formação de miotubos, mas não parece comprometer os estágios iniciais de fusão de mioblastos, uma vez que pequenos miotubos são encontrados com grande frequência nessas culturas.

A identificação da disferlina como possível reguladora da expressão dos componentes do tricomplexo e dos fatores miogênicos pode indicar novos direcionamentos para avançarmos na compreensão dos mecanismos de ação da disferlina, bem como investigar potenciais alvos para terapias.

II - Objetivos

Objetivo geral

Estudar os efeitos da deficiência de disferlina na miogênese e regeneração muscular *in vivo* e *in vitro*.

Objetivos específicos

1) Em um modelo de degeneração/regeneração *in vivo*, por indução de lesão mecânica do camundongo disferlina-deficiente *SJL/J*, avaliar, ao longo do tempo de recuperação muscular, os seguintes parâmetros:

a) Alterações histológicas, através da análise de infiltração de tecido conjuntivo, de áreas de fagocitose ativa e da presença de fibras em regeneração e centronucleadas;

b) Expressão gênica de fatores envolvidos nas vias de degeneração: *Tgf-β1* e *CD11b*, e de regeneração: *Pax7*, *Myf5*, *MyoD* e miogenina;

d) Expressão dos componentes do tricomplexo *Fam65b* e *Hdac6* diante da deficiência de disferlina;

e) Comparar as alterações moleculares com as observações histológicas.

2) Em cultura de mioblastos humanos de paciente com ausência de disferlina, avaliar durante a diferenciação em miotubos:

a) A expressão dos fatores miogênicos *MYF5*, *MYOD* e miogenina;

b) A expressão gênica dos componentes do tricomplexo *DYSF*, *FAM65B* e *HDAC6*;

c) A eficiência da fusão de membranas e formação de miotubos, pelo índice de fusão de mioblastos e diâmetro dos miotubos.

CAPÍTULO 5

Discussão geral e conclusões

Nesse estudo, tivemos como objetivo expandir o conhecimento sobre a função da disferlina durante a miogênese em camundongos e humanos com distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B). Desde a descoberta de que mutações no gene da disferlina causam LGMD2B e outras variantes clínicas (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998), diversos estudos têm sido realizados para determinar de que forma a deficiência da disferlina afeta a integridade muscular, aumentando a suscetibilidade ao estresse mecânico e lesão. A disferlina é relatada por exercer funções ligadas à fusão e ao tráfego intracelular de vesículas (Posey et al., 2011), reparo de membrana (Bansal et al., 2003) e inflamação (Rawat et al., 2010). Dados conflitantes também relacionam a função da disferlina à miogênese pela regulação da fusão de membranas durante a diferenciação muscular. Alguns autores sugerem que a deficiência de disferlina causa defeitos na miogênese (De Luna et al., 2006; Demonbreun et al., 2011; Cohen et al., 2012), enquanto outros não observaram alterações neste processo (Chiu et al., 2009; Humphrey et al., 2012; Defour et al., 2014).

A mioferlina, uma proteína da família das ferlinas homóloga à disferlina, é proposta por agir de forma coordenada com a disferlina. A mioferlina é expressa nos mioblastos nos estágios iniciais de sua fusão, diminuindo nos miotubos maduros, enquanto a disferlina aumenta durante a diferenciação, com maior expressão em miotubos (Davis et al., 2002). Além disso, alguns trabalhos vêm descobrindo funções da disferlina dependentes da interação com outras proteínas (Lennon et al., 2003; Cai et al., 2009; Azakir et al., 2010). A identificação de genes que apresentam expressão alterada diante da deficiência de disferlina, permite avanços na compreensão dos mecanismos de ação associados às disferlinopatias, contribuindo para a descoberta de potenciais alvos para a aplicação de terapias. O envolvimento de outras proteínas nos eventos de fusão e formação de miotubos necessitam ser melhor investigados. Um recente estudo descreveu a formação transiente de um tricomplexo no início da diferenciação, composto por FAM65B, HDAC6 e disferlina, que participa da regulação da progressão da miogênese pelo controle dinâmico da polimerização de microtúbulos (Balasubramanian et al., 2014). Baseado nesse estudo, buscamos investigar o efeito da deficiência de disferlina sobre a

expressão de *Fam65b* e *Hdac6*, assim como de fatores miogênicos durante a diferenciação muscular.

Na primeira parte do trabalho (Capítulo 3), em experimentos *in vivo* com a linhagem murina *SJL/L*, modelo animal para a LGMD2B, foram analisados os efeitos da deficiência de disferlina na recuperação muscular após lesão mecânica induzida por eletroporação. Nossos resultados mostraram que a deficiência de disferlina não comprometeu a recuperação muscular em *SJL/J*, mas alterou temporalmente os eventos de degeneração e regeneração após lesão. Apesar dos níveis elevados de expressão de fatores de inflamação e fibrose, as análises histológicas mostraram que a miogênese não é comprometida e o músculo é capaz de restabelecer sua citoarquitetura. O aumento da fagocitose parece contribuir para a eficiente remoção de necrose causada pela degeneração muscular, seguida por rápida resposta regenerativa, evidenciada pelo pico de ativação de fatores miogênicos ocorrendo antes em *SJL/J*, comparado ao controle normal. O padrão de regulação de *Fam65b* e de *Hdac6* revelou expressão aumentada desses componentes do tricomplexo durante os primeiros dias de recuperação muscular, tanto na linhagem disferlina-deficiente quanto no controle normal, indicando a atuação desses componentes na regeneração muscular. No entanto, a expressão também foi maior em *SJL/L*, o que sugere uma possível regulação de *Fam65b* e *Hdac6* pela disferlina. Investigações adicionais sobre a influência da deficiência de disferlina na expressão desses componentes do tricomplexo e seus efeitos na diferenciação miogênica são necessárias.

Eficiente regeneração muscular nos camundongos *SJL/J* foi observada em estudos anteriores (Grounds et al., 1989; Mitchell et al., 1992; Maley et al., 1994). Uma possível explicação seria de que um estado pré-ativado de estímulo à regeneração ocorre no músculo distrófico de camundongos jovens e poderia contribuir para a rápida resposta regenerativa após lesão (Maley et al., 1994; Sorokin, 2000), enquanto músculos normais requerem um primeiro estímulo para a ativação e recrutamento de células satélite para a recuperação muscular. Eventualmente, esse quadro mudaria, com a idade e o estabelecimento de um estado crônico da doença (Weller et al., 1997). Contrapondo-se aos nossos resultados, outros trabalhos relataram recuperação muscular comprometida em animais disferlina-deficiente (Roche et al., 2008; Chiu et al., 2009; Cohen et al., 2012). As divergências entre os dados da literatura podem estar relacionadas às diferentes

condições experimentais, como linhagens murinas utilizadas e tipos de lesões musculares induzidas (Cohen et al., 2015). Essas variações apontam para a necessidade da difícil tarefa de aplicação de experimentos e formas de análise de resultados padronizados que unifiquem a produção de dados, tornando-os passíveis de comparação (Hornsey et al., 2013).

Adicionalmente, neste trabalho, realizamos experimentos *in vitro* (Capítulo 4), utilizando células musculares humanas de paciente com deficiência total de disferlina. A expressão dos genes *MYF5*, *MYOD* e miogenina e do tricomplexo *DYSF*, *HDAC6* e *FAM65B* foi analisada durante a diferenciação muscular. Nossos resultados revelaram que células disferlina-deficientes apresentam formação de miotubos comprometida. Observamos uma significante frequência de miotubos com poucos núcleos e com diâmetro reduzido, indicando que a deficiência de disferlina não afeta a fusão de mioblastos nos estágios iniciais da diferenciação muscular, mas pode atuar nos estágios posteriores, provocando comprometimento do crescimento e alongamento de miotubos. Nas análises de expressão gênica, *FAM65B* seguiu um padrão similar entre as células disferlina-deficiente e as normais. No entanto, o pico de expressão de miogenina ocorreu mais cedo nas células normais, sugerindo alterações na cinética de expressão desse fator em células disferlina-deficientes. Além disso, nas células disferlina-deficientes, os níveis de *DYSF* e *HDAC6* permaneceram inalterados, enquanto nas células normais, *HDAC6* teve uma elevação transiente no início diferenciação e *DYSF* aumentou com a progressão da diferenciação. A elevação de *DYSF* nas células normais é esperado, já que em condições normais a disferlina aumenta durante a diferenciação miogênica (De Luna et al., 2006). O perfil de expressão gênica de *HDAC6* durante a diferenciação, por outro lado, não tinha sido relatada anteriormente em células humanas com deficiência de disferlina. Em conjunto, as alterações de expressão de fatores miogênicos e de *HDAC6* diante da deficiência de disferlina podem indicar novos direcionamentos para estudos dos mecanismos fisiopatológicos que comprometem a progressão da diferenciação muscular nas disferlinopatias.

Dadas as diferenças ao se comparar experimentos *in vivo* x *in vitro* e linhagens murinas x humanas (Bareja et al., 2014), observamos nos dois trabalhos que a deficiência de disferlina altera temporalmente a miogênese, seja por comprometer a progressão do crescimento e alongamento de miotubos durante a diferenciação muscular *in vivo* de

células humanas ou por alterar eventos da regeneração muscular em experimentos *in vivo* com linhagens murinas. Estudos futuros serão necessários para melhor esclarecer as implicações dos padrões de expressão dos componentes do tricomplexo nas funções celulares.

Referências bibliográficas

ABMAYR, S. M.; PAVLATH, G. K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. **Development (Cambridge, England)**, v. 139, n. 4, p. 641–656, 2012.

ALLEN, R. E.; BOXHORN, L. K. Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. **J. Cell Physiol.**, v. 133, p. 567-572, 1987.

AMPONG, B. N. et al. Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. **Acta Myol.**, v. 24, p. 134–144, 2005.

ANDERSON, L. V. B. et al. Dysferlin is a Plasma Membrane Protein and is Expressed Early in Human Development. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 5, p. 855–861, 1999.

ANGELINI, C. et al. Dysferlinopathy course and sportive activity: clues for possible treatment. **Acta Myol.**, v. 30, p. 127–132, 2011.

ARANDA. P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach Gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, v. 33, n. 2, p. 366-369, 2012.

ASTHANA, J. et al. Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 31, p. 22516–22526, 2013.

AZAKIR, B. A. et al. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10122, 2010.

BALASUBRAMANIAN, A. et al. Fam65b is important for formation of the HDAC6-dysferlin protein complex during myogenic cell differentiation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 28, n. 7, p. 2955–2969, 2014.

BANSAL, D. et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. **Nature**, v. 423, p. 168-172, 2003.

BANSAL, D.; CAMPBELL, K. P. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 4, p. 206–213, 2004.

BAREJA, A. et al. Human and mouse skeletal muscle stem cells: convergent and divergent mechanisms of myogenesis. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e90398, 2014.

BASHIR, R. et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. **Human Molecular Genetics**, v. 3, p. 455–7, 1994.

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, p. 37–42, 1998.

BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 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, p. 141–142, 1999.

BLANDIN, G. et al. UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. **Human mutation**, v. 33, n. 3, p. E2317-31, 2012.

BRAUN et al. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death. **Cell**, v. 71, p. 369-382, 1992.

BUSHBY, K. M. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. **Brain**, v. 122, p. 1403–20, 1999.

CAI, C. et al. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15894–15902, 2009.

CARTER, H.; HOFREE, M.; IDEKER, T. Genotype to phenotype via network analysis. **Current opinion in genetics & development**, v. 23, n. 6, p. 611–621, 2013.

CENACCHI, G. et al. Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. **Journal of clinical pathology**, v. 58, n. 2, p. 190–195, 2005.

CHARGE, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 209–238, 2004.

CHECHI, K. et al. Validation of reference genes for the relative quantification of gene expression in human epicardial adipose tissue. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e32365, 2012.

CHIU, Y. et al. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 11, p. 1976–1989, 2009.

CLARK, K. A. et al. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 18, p. 637–706, 2002.

COHEN, T. V.; COHEN, J. E.; PARTRIDGE, T. A. Myogenesis in dysferlin-deficient myoblasts is inhibited by an intrinsic inflammatory response. **Neuromuscular disorders : NMD**, v. 22, n. 7, p. 648–658, 2012.

COHEN, T. V. et al. Upregulated IL-1beta in dysferlin-deficient muscle attenuates regeneration by blunting the response to pro-inflammatory macrophages. **Skeletal muscle**, v. 5, p. 24, 2015.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. The molecular basis of muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 23, p. 1456-1471, 2000.

COOPER, S. T.; MCNEIL, P. L. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 95, n. 4, p. 1205–1240, 2015.

CORROTTE, M. et al. Approaches for plasma membrane wounding and assessment of lysosome-mediated repair responses. **Methods in cell biology**, v. 126, p. 139–158, 2015.

DAVENPORT, N. R. et al. Membrane dynamics during cellular wound repair. **Molecular biology of the cell**, v. 27, n. 14, p. 2272–2285, 2016.

DAVIS, D. B. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2000.

DAVIS, D. B. et al. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 25, p. 22883–22888, 2002.

DE LUNA, N. et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "*in vitro*". **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17092–17098, 2006.

DEFOUR, A. et al. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1306, 2014.

DEMONBREUN, A. R. et al. et al. Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 4, p. 779–789, 2011.

DI FULVIO, S. et al. Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28563, 2011.

DI FULVIO, S. **Characterization of the dysferlin protein and its binding partners reveals rational design for therapeutic strategies for the treatment of dysferlinopathies.** 2013. 168 f. Tese (Doutorado em Filosofia) – Naturwissenschaftlichen Fakultät – Universität Basel, Basel, Suíça, 2013.

DIAZ-HORTA, O. et al. FAM65B is a membrane-associated protein of hair cell stereocilia required for hearing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 27, p. 9864–9868, 2014.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **BMJ**, v. 317, p. 991-995, 1998.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **The Lancet**, v. 359, n. 9307, p. 687–695, 2002.

GE, Y.; CHEN, J. MicroRNAs in skeletal myogenesis. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 10, n. 3, p. 441–448, 2011.

GLOVER, L.; BROWN, R. H., JR. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 8, n. 7, p. 785–794, 2007.

GOSSELIN, L. E. et al. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. **Muscle & nerve**, v. 30, n. 5, p. 645–653, 2004.

GROUNDS, M. D.; MCGEACHIE, J. K. A comparison of muscle precursor replication in crush-injured skeletal muscle of *Swiss* and BALBc mice. **Cell Tissue Res.**, v. 255, n. 2, p. 385-391, 1989.

HAN, R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. **Skeletal muscle**, v. 1, n. 1, p. 10, 2011.

HAO, D. et al. Network-based analysis of genotype-phenotype correlations between different inheritance modes. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 22, p. 3223–3231, 2014.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, p. 534–551, 2001.

HERNANDEZ-DEVIEZ, D. J. et al. Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 10, p. 6476–6488, 2008.

HIRAYAMA, E.; KIM, J. Identification and characterization of a novel neural cell adhesion molecule (NCAM)-associated protein from quail myoblasts: relationship to myotube formation and induction of neurite-like protrusions. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 3, p. 253–266, 2008.

HUANG, Y. et al. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 13, n. 6, p. 721–730, 2005.

HUANG, Y. et al. AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 3, p. 732–742, 2007.

HUANG, Y. et al. Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 12, p. 1855–1866, 2008.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. H. Muscle Injuries and Repair Current Trends in Research. **The journal of bone and joint surgery**, v. 84-A, n. 5, p. 822-832, 2002.

HUBBERT, C. et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 455–458, 2002.

HUMPHREY, G. W. et al. GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line. **Experimental cell research**, v. 318, n. 2, p. 127–135, 2012.

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

ILLA, I. et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. **Ann. Neurol.**, v. 49, p. 130–4, 2001.

KERR, J. P.; WARD, C. W.; BLOCH, R. J. Dysferlin at transverse tubules regulates Ca(2+) homeostasis in skeletal muscle. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 89, 2014.

KESPER, K. et al. Pattern of skeletal muscle involvement in primary dysferlinopathies: a whole-body 3.0-T magnetic resonance imaging study. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 120, n. 2, p. 111–118, 2009.

LAVAL, S. H.; BUSHBY, K. M. D. Limb-girdle muscular dystrophies--from genetics to molecular pathology. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 30, n. 2, p. 91–105, 2004.

LENNON, N. J. et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50466–50473, 2003.

LI, Y.; SHIN, D.; KWON, S. H.. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. **The FEBS journal**, v. 280, n. 3, p. 775–793, 2013.

LIU, J. et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. **Nat. Genet.**, v. 20, p. 31–6, 1998.

LO, Harriet P. et al. Limb-girdle muscular dystrophy: diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. **Neuromuscular disorders: NMD**, v. 18, n. 1, p. 34–44, 2008.

MALEY, M. A. L. et al. Intrinsic differences in MyoD and myogenin expression between primary cultures of *SJL/J* and *Balb/c* skeletal muscle. **Exp. Cell Res.**, v. 211, p. 99–107, 1994.

MATSUDA, C. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 17, p. 1761–1766, 2001.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 9, p. 493–495, 1961.

MCDADE, J. R. **Contribution of dysferlin-containing membranes to membrane repair in skeletal muscle.** 2014. 143 f. Tese (Doutorado em Filosofia – Fisiologia Molecular e Integrativa) –University of Michigan, Ann Arbor, MI, 2014.

MCDADE, J. R.; MICHELE, D. E. Membrane damage-induced vesicle-vesicle fusion of dysferlin-containing vesicles in muscle cells requires microtubules and kinesin. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 7, p. 1677–1686, 2014.

MEGENEY, L. A. et al. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. **Genes & Dev.**, v. 10, p. 1173–1183, 1996.

MERCURI, E.; MUNTONI, F. Muscular dystrophies. **The Lancet**, v. 381, n. 9869, p. 845–860, 2013.

MITCHELL, C. A.; MCGEACHIE, J. K.; GROUNDS, M. D. Cellular differences in regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in *SJL/J* and *Balb/c* mice. **Cell Tissue Res.**, v. 269, p. 159–166, 1992.

MIDDEL, V. et al. Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair. **Nature communications**, v. 7, p. 12875, 2016.

NEVES, J. C. et al. Neuraminidase-1 mediates skeletal muscle regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, p. 1755-1764, 2015.

NIGRO V. Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. **Acta Myol.**, v. 22, p. 35–42, 2003.

NIGRO, V.; PILUSO, G. Spectrum of muscular dystrophies associated with sarcolemmal-protein genetic defects. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1852, n. 4, p. 585–593, 2015.

NIGRO, V.; SAVARESE, M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. **Acta Myol.**, v. 33, p. 1–12, 2014.

ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G. et al. Differential expression of genes involved in the degeneration and regeneration pathways in mouse models for muscular dystrophies. **Neuromolecular medicine**, v. 14, n. 1, p. 74–83, 2012.

OVERALL, C. M.; WRANA, J. L.; SODEK, J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-β1 in human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 21, p. 14064-14071, 1991.

PARTON, R. G. et al. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. **J. Cell Biol.**, v. 136, p. 137-154, 1997.

PICCOLO, F. et al. Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb–girdle muscular dystrophies. **Annals of Neurology**, v. 48, n. 6, p. 902–912, 2000.

POSEY, A. D., JR; DEMONBREUN, A.; MCNALLY, E. M. Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth. **Current topics in developmental biology**, v. 96, p. 203–230, 2011.

RATTI, F. et al. Histone deacetylase 6 is a FoxO transcription factor dependent effector in skeletal muscle atrophy. **The Journak of Biological Chemistry**, v. 290, n. 7, p. 4215-4224, 2015.

RAWAT, R. et al. Kanneboyina. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. **The American journal of pathology**, v. 176, n. 6, p. 2891–2900, 2010.

RELAIX, F. Skeletal muscle progenitor cells: from embryo to adult. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 63, n. 11, p. 1221–1225, 2006.

RELAIX, F.; ZAMMIT, P. S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. **Development (Cambridge, England)**, v. 139, n. 16, p. 2845–2856, 2012.

ROCHE, J. A.; LOVERING, R. M.; BLOCH, R. J. Impaired recovery of dysferlin-null skeletal muscle after contraction-induced injury *in vivo*. **NeuroReport**, v. 19, n. 16, p. 1579–1584, 2008.

ROCHE, J. A. et al. Extensive mononuclear infiltration and myogenesis characterize recovery of dysferlin-null skeletal muscle from contraction-induced injuries. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 298, n. 2, p. C298-312, 2010.

ROOSTALU, U.; STRAHLE, U. *In vivo* imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. **Developmental cell**, v. 22, n. 3, p. 515–529, 2012.

RUDNICKI, M. A. et al. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *Myf-5* and results in apparently normal muscle development. **Cell**, v. 71, p. 383-390, 1992.

RUDNICKI, M. A. et al. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1351–1359, 1993.

RUDNICKI, M. A. et al. The molecular regulation of muscle stem cell function. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 73, p. 323–331, 2008.

SABOURIN, L. A.; RUDNICKI, M. A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical Genetics**, v. 57, p. 16–25, 2000.

SAMBASIVAN, R.; TAJBAKHSH, S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 6, p. 870–882, 2007.

SAMBASIVAN, R. et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. **Development**, v. 138, n. 19, p. 4333, 2011.

SEALE, P. et al. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45+:Sca1+ stem cells from injured muscle. **PLoS biology**, v. 2, n. 5, p. E130, 2004.

SHI, X.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & development**, v. 20, n. 13, p. 1692–1708, 2006.

SHIN, J. et al. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 10, p. 2266–2279, 2013.

SOROKIN, L. M. et al. Laminin alpha4 and integrin alpha6 are upregulated in regenerating dy/dy skeletal muscle: comparative expression of laminin and integrin isoforms in muscles regenerating after crush injury. **Experimental cell research**, v. 256, n. 2, p. 500–514, 2000.

SULA, A. et al. Crystal structures of the human Dysferlin inner DysF domain. **BMC structural biology**, v. 14, p. 3, 2014.

TAM, C. et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **The Journal of cell biology**, v. 189, n. 6, p. 1027–1038, 2010.

TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. Regeneration of skeletal muscle. **Cell and tissue research**, v. 347, n. 3, p. 759–774, 2012.

URTIZBEREA, J. A. et al. Dysferlinopathies. **Neurology India**, v. 56, n. 3, p. 289-297, 2008.

VAINZOF, M. et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 34, n. 3, p. 241–248, 2008.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, 2003.

VENUTI, J. M. et al. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. **J. Cell Biol.**, v. 128, p. 563-576, 1995.

WADDELL, L. B. et al. Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 70, n. 4, p. 302–313, 2011.

WALLACE, G. Q.; MCNALLY, E. M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. **Annual review of physiology**, v. 71, p. 37–57, 2009.

WEILER, T. et al. Identical Mutation in Patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2B Or Miyoshi Myopathy Suggests a Role for Modifier Gene(s). **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 5, p. 871–877, 1999.

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

WICKLUND, M. P.; KISSEL, J. T. The limb-girdle muscular dystrophies. **Neurologic clinics**, v. 32, n. 3, p. 729-49, ix, 2014.

YAN, Z. et al. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8826–8836, 2003.

YANG, Y. et al. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p. 1745-1752, 2005.

YOON, S. et al. C6ORF32 is upregulated during muscle cell differentiation and induces the formation of cellular filopodia. **Developmental biology**, v. 301, n. 1, p. 70–81, 2007.