

ANTONIO FERNANDO RIBEIRO JÚNIOR

Estudo de proteínas envolvidas na diferenciação tardia
do músculo esquelético e seu papel no processo
distrófico

Study of proteins involved in late differentiation of
skeletal muscle and their role in the dystrophic
process

São Paulo

2023

ANTONIO FERNANDO RIBEIRO JÚNIOR

Estudo de proteínas envolvidas na diferenciação tardia
do músculo esquelético e seu papel no processo
distrófico

Study of proteins involved in late differentiation of
skeletal muscle and their role in the dystrophic
process

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências, na Área de Genética.

Orientadora: Dra. Mariz Vainzof.

São Paulo

2023

Ficha Catalográfica

Ribeiro Júnior, Antonio Fernando
Estudo de proteínas envolvidas na
diferenciação tardia do músculo
esquelético e seu papel no processo
distrófico 84f.

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Fusão Celular 2. Distrofias Musculares
3. Regeneração Muscular
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biotecnologia. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedicatória

À minha amada esposa e meu filho.

Epígrafe

“However bad life may seem, there is always something you can do,
and succeed at. While there’s life, there’s hope.”

Stephen Hawking

Agradecimentos

Como não podia ser diferente, começo meus agradecimentos à quem sonhou, lutou e viveu esse projeto comigo, minha Princesa, meu amor e meu alicerce. Parece que foi ontem que começamos a viver isso, era 2018, só nós dois ficando por dias distantes. Tudo isso pra chegar até aqui, 2023, juntinhos todos os dias, nós três e muito amor! Lá se vão 18 anos juntos e cada dia que passa eu tenho mais certeza de que Deus tem um plano pra nós, ficarmos juntos todos os dias das nossas vidas. Esse agradecimento está mais pra uma declaração de amor, e é de fato, pois esse amor não acontece, ele é construído e dá trabalho. Então, obrigado por trabalhar e construir comigo esse amor! Tudo com você é maravilhoso! Te amo, Chris!

Agradeço ao meu filho, Henrique, que mesmo sem saber é o combustível diário da minha vida. Parece que você sempre esteve comigo, talvez você já vivesse no meu coração. Peço à Deus para poder viver e dividir tudo com você o maior tempo possível. Quando puder ler isso, saiba que todos os dias que você me recebe com um abraço e um sorriso, me faz sentir o melhor pai do mundo. Te amo, meu filho!

À minha mãe, que guiou meus passos, acreditou em mim e sempre me apoiou! Te devo muito mais que coisas que eu conquistei na vida, te devo minha gratidão pelo aconchego nos momentos difíceis, pelos conselhos e também pelas broncas que se fizeram necessárias (algumas vezes). Te amo, Dona Zélia! A senhora é a mãe mais carinhosa do mundo!

Ao meu Pai (*in memoriam*), que me ensinou a preservar tudo o que ele me deu, o meu nome. Esse, pai, é o ensinamento que eu tenho carregado comigo durante toda a minha vida e tem dado certo, viu? Gostaria que pudesse ver tudo o

que tem acontecido aqui, gostaria de ver seus olhos olhando pro Henrique, vendo todas as coisas (não materiais) que temos conquistado por aqui. Te amarei sempre!

Às minhas irmãs, afinal, como tudo isso poderia acontecer sem elas? Incentivadoras desde sempre, agradeço à Vi, com seus conselhos e o carinho que sempre teve comigo. À Lu, por todo do apoio nos estudos e pela eterna vigilância (que eu precisava). À Cris, pelo cuidado que sempre teve comigo e pelos sempre gostosos momentos de boas risadas. À Preta pelas conversas sempre sinceras e por sempre arregaçar as mangas quando precisei de você. À Josi, pela amizade e pelas intermináveis conversas, já ia me esquecendo, obrigado pelos livros (que me deu pra eu estudar pro mestrado). Agradeço à Deus por ter vocês na minha vida!

Agradeço também às pessoas sensacionais que sempre me fizeram sentir amado, e como mais um filho. Obrigado Sr. Henrique e Dona Vitória por todo o amor que têm dividido comigo todos esses anos. Como não me sentir amado perto de vocês? Impossível! Agradeço pelas orações e pelo acolhimento que sempre me ofereceram!

Agradeço à Ane e João, que nunca mediram esforços pra me ajudar, sempre me acolheram e me aconselharam. Sou muito grato por poder participar dessa família linda que é a família de vocês dois. Admiro vocês como pais, filhos e irmãos.

Aos meus cunhados e cunhadas, Marcelo e Lu, Ico e Cida, Tonhão e Michele e Marília e Everton, que sempre me acolheram e me fizeram sentir como mais um da família.

Aos meus sobrinhos, que hoje já são 20. Amo todos vocês e estarei sempre aqui pra quando precisarem!

Aos meus amigos Binho, Mário e Key, pelo companheirismo desde o início dessa trajetória, lá no começo do mestrado. Foram incontáveis momentos de descontração, aconselhamento e muitas risadas. Em momentos difíceis em São Paulo eu pude ter vocês, um privilégio.

Ao meu padrinho e amigo Marcos, com quem pude dividir minhas decepções e conquistas. Um cara que sei posso sempre contar!

Como não agradecer a principal incentivadora disso tudo? Na verdade, você foi a primeira a acreditar em mim, lembra? Você me dizia: “você leva jeito pra dar aulas, quando você entrar no mestrado vou te trazer pra dar aulas aqui”. E minha professora virou minha companheira de trabalho, minha amiga e minha madrinha. Obrigado por acreditar em mim, antes que eu mesmo acreditasse. Você sempre teve esse olhar que via lá na frente. Como já te disse algumas vezes, você é um dos anjos que Deus colocou na minha vida. Obrigado, Vivian!

Agradeço aos amigos que conquistei num lugar que mudou a maneira como eu me vejo profissionalmente. Obrigado aos amigos da Lizarbio, Marcos, Diogo e Estela pelo maravilhoso convívio e ensinamentos. Especialmente, quero agradecer aqui pessoas maravilhosas que tive o privilégio de conviver e de me tornar amigo. Agradeço à Sir, minha “guru” dos trabalhos, você é demais. Você é o motivo de muitas coisas boas acontecerem na minha vida! À Ju, você é simplesmente um coração em forma de gente. Você não tem ideia do quanto me ajudou. Foi muito bom ter aprendido com você todo esse tempo. Agradeço ao Rafa, pela amizade e mentoria gratuita. Já te disse e que não me canso de dizer, obrigado, obrigado e obrigado! Você, com certeza, é um cara em que eu me espelho, espero que nossa parceria possa durar por muitos anos!

Obrigado aos meus colegas de laboratório, Lucas, Felipe e Brandow. Foi maravilhoso poder conviver com vocês todos esses anos. Espero que possamos nos manter conectados sempre.

À minha amiga Letícia, que nesses 10 (DEZ) anos de laboratório, já me conhece mais que minha mãe! Que me atura, me aconselha e me dá suporte sempre que eu preciso!

À Tati, pelo suporte durante o curto período em que pudemos conviver. Agradeço seu empenho e por acreditar em mim num momento difícil.

À Elisa, que apesar do pouco tempo de convívio sempre se mostrou pronta a ajudar.

Gostaria de agradecer à professora Mariz Vainzof, que sem ela nada disso seria possível. Agradeço pela orientação, ensinamento, apoio profissional e pessoal e pela paciência. Obrigado por compartilhar seu conhecimento, seu tempo, por ter me acolhido neste laboratório e acreditado em mim.

Gostaria de encerrar agradecendo imensamente à Deus. Quantos no mundo têm a chance de agradecer à tantas pessoas maravilhosas? São tantos anjos que o Senhor colocou no meu caminho. Sou abençoado por ter convivido com tantos anjos e espero que essa seja só mais uma etapa.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado (Código de Financiamento processo nº 88882377419/2019-01). Agradeço às agências FAPESP e CNPq pelo suporte fornecido através do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco – IB - USP.

Nota do autor

Esta tese 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, da regeneração muscular, bem como informações sobre o processo de formação do miotubo/miofibrila. Ao final do capítulo são expostos os principais objetivos do estudo. O Capítulo 2 contém um manuscrito de artigo científico, redigido em inglês, que será submetido para publicação em breve. Os demais capítulos foram escritos em português. No Capítulo 3 são apresentadas a discussão geral e as conclusões do trabalho.

As referências bibliográficas do artigo estão listadas no respectivo capítulo. 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.

Sumário

Capítulo 1 - Introdução.....	12
1.1. Tecido muscular esquelético: funções e estrutura.....	12
1.2. Fases do desenvolvimento muscular e regulação molecular da miogênese	16
1.3. Principais etapas celulares da regeneração muscular.....	20
1.4. Controle molecular da fusão celular durante o processo de regeneração muscular ..	23
1.5. Síndromes associadas à deficiência do processo de fusão celular no tecido muscular	26
1.6. Distrofias musculares: definições e aspectos epidemiológicos	28
1.7. Relevância da regeneração muscular nas distrofias musculares	29
1.8. Objetivos.....	30
1.8.1. Objetivo Geral.....	30
1.8.2. Objetivos específicos	31
1.9. Material e métodos	31
1.9.1. Cultura de células	31
1.9.2. Análise de RNA.....	32
1.9.3. Análise de proteínas	33
1.9.4. Detecção de proteínas por imunocitoquímica e reação de imunofluorescência.....	34
1.9.5. Análise morfométrica: Índice de fusão e área do miotubo	35
1.9.6. Ensaio de migração transwell	36
1.9.7. Análise estatística	36
Capítulo 2	37
Capítulo 3 - Discussão Geral e Conclusões.....	71
Resumo	74
<i>Abstract</i>	76
Referências Bibliográficas.....	78

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Tecido muscular esquelético: funções e estrutura

O tecido muscular esquelético é um tecido amplamente distribuído pelo corpo humano e responsável por uma série de funções, tanto bioquímicas quanto mecânicas. Do ponto de vista bioquímico o músculo esquelético é fonte de energia, sendo um reservatório de glicogênio e aminoácidos para o uso no próprio tecido e por outros. Em termos mecânicos, o músculo esquelético é responsável por transformar energia química em energia mecânica, o que permite a execução de movimentos voluntários do corpo humano e a consequente execução de atividades como a movimentação, prática de exercícios físicos e interação social (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Representando aproximadamente de 35% a 45% da massa corpórea total, o músculo esquelético é muito bem compartimentalizado e organizado com subdivisões independentes unidas por tecido conjuntivo. Hierarquicamente, as menores estruturas compartimentalizadas são as fibras musculares, cada uma delas envolta por uma camada de tecido conjuntivo denominado endomísio. Num segundo nível hierárquico estão os feixes de fibras musculares que são unidos por uma segunda camada de tecido conjuntivo chamada de perimísio e, por último, estes feixes de fibras musculares são unidos por uma última camada de tecido conjuntivo denominado epimísio, formando assim uma macro unidade contrátil (fig.1) (DUMONT; WANG; RUDNICKI, 2015a; MAHDY, 2019).

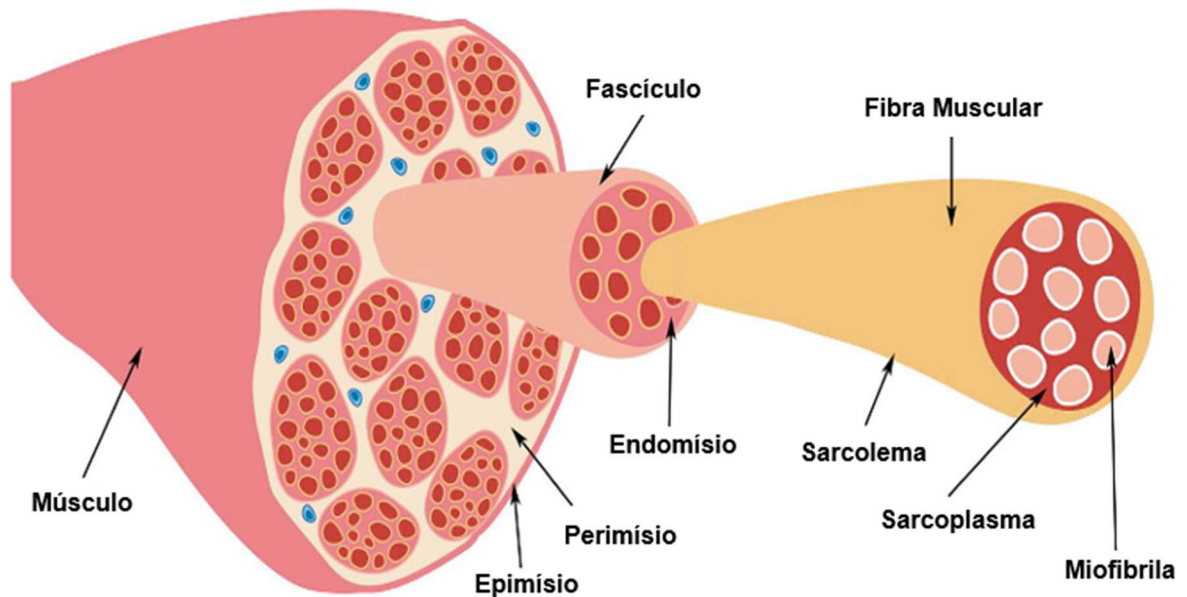


Figura 1: Esquema da macroestrutura do músculo esquelético. O tecido conjuntivo é responsável pela integração das fibras musculares no músculo esquelético, formando uma macro unidade contrátil. Adaptado de FERNÁNDEZ-COSTA *et al.*, 2021.

As fibras musculares possuem características únicas em termos de organização celular. Cerca de 80% do sarcoplasma das fibras musculares é preenchido por miofibrilas que, por sua vez, são formadas pelo conjunto seriado de sarcômeros. Os sarcômeros consistem principalmente de filamentos de actina (filamentos finos) e filamentos de miosina (filamentos grossos) que conferem as estriações transversais características das unidades contráteis do músculo esquelético (fig. 2) (FRONTERA; OCHALA, 2015).

Cada miofibrila está em contato direto com o retículo sarcoplasmático, que é responsável pelo armazenamento e liberação de íons de cálcio durante a contração muscular. O estímulo para contração muscular se dá através de um potencial de ação que se propaga dos neurônios motores ao sarcolema até chegarem ao retículo sarcoplasmático, que ao receber o potencial de ação libera no sarcoplasma íons Ca^{2+} armazenados (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020).

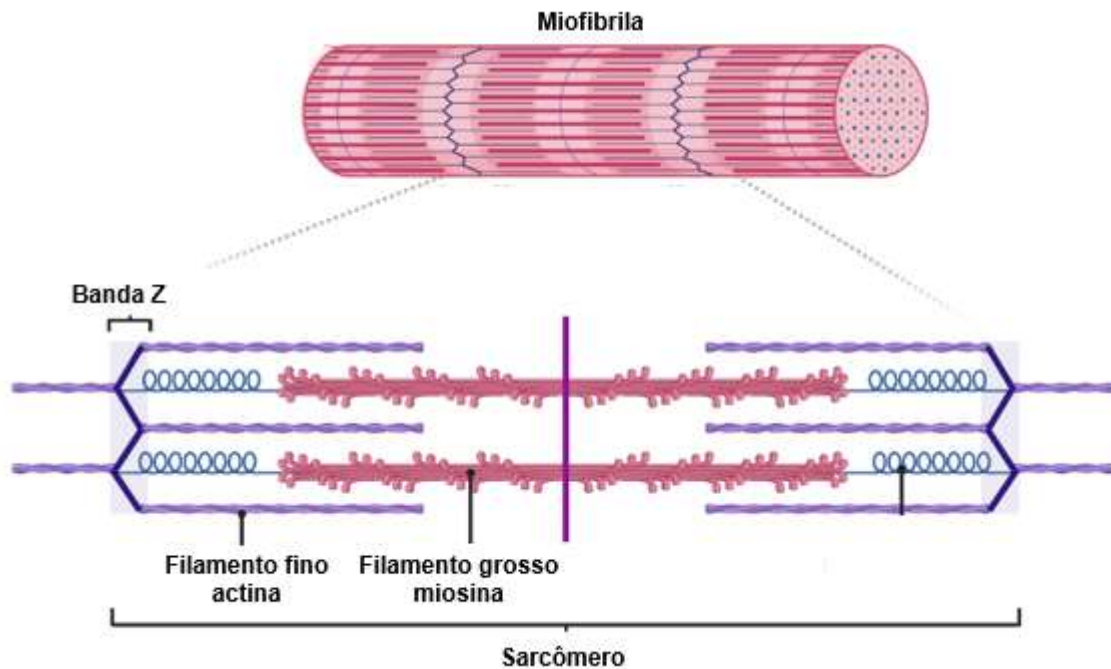


Figura 2: Organização estrutural da miofibrila. A Miofibrila é composta por um conjunto de sarcômeros organizados em série. Os sarcômeros são compostos principalmente por filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina. Adaptado de “Myofibril Structure”, por Biorender.com (2022) disponível em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

A transferência do potencial de ação do sarcolema à membrana do retículo sarcoplasmático é otimizada graças a estruturas denominadas túbulos T, que são invaginações transversais da membrana plasmática que atravessam as fibras e estão em contato direto com a membrana do retículo sarcoplasmático. Essa estrutura é denominada tríade (fig. 3) (FRONTERA; OCHALA, 2015).

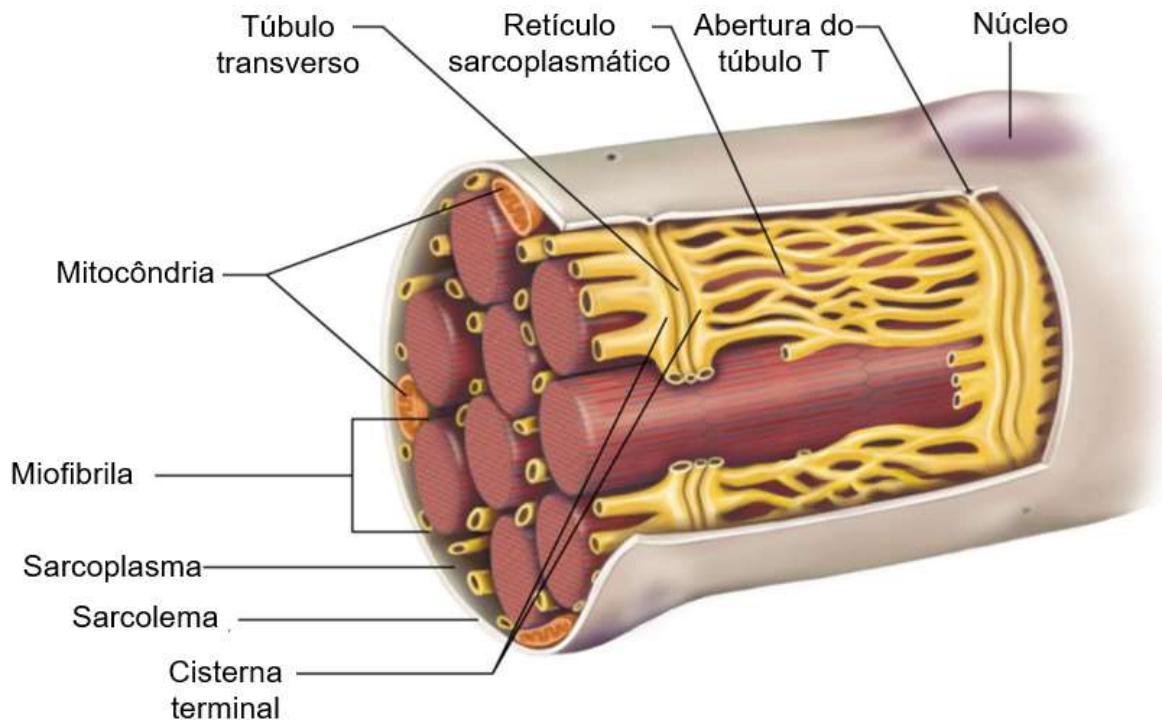


Figura 3: Componentes mecânicos da fibra muscular. Nota-se a membrana sarcoplasmática bem próxima ao retículo sarcoplasmático, facilitando a transferência do potencial de ação entre as membranas. Os túbulos T juntamente com as cisternas terminais do retículo sarcoplasmático formam a tríade, que otimiza a transferência do potencial de ação e garante que as miofibrilas se contraíam de maneira homogênea. Modificado de FRONTERA; OCHALA, 2015.

Uma vez liberado, o cálcio atua nos sítios de ligação à actina permitindo que a miosina se ligue à actina e execute seu movimento de deslizamento, utilizando a hidrólise de ATP como fonte de energia, promovendo o encurtamento do sarcômero, e a aproximação das bandas Z. Os sarcômeros estão adequadamente ancorados ao sarcolema e este à matriz extracelular para que ocorra uma contração de toda estrutura da fibra muscular. Para que este processo ocorra é necessário a atuação de uma série de proteínas que fazem a ligação entre o sarcômero, o sarcolema e a matriz extracelular (MUKUND; SUBRAMANIAM, 2020). Este complexo proteico tem o nome de Complexo Distrofina Glicoproteínas (CDG) e é formado por proteínas como a Distrofina, α -dystroglicanla, β -dystroglicana, dentre outras (CAMPBELL; KAHL, 1989; ERVASTI *et al.*, 1990).

1.2.Fases do desenvolvimento muscular e regulação molecular da miogênese

O desenvolvimento muscular passa por diversas fases, incluindo a miogênese embrionária, miogênese fetal e miogênese neonatal. Na fase inicial da miogênese embrionária, células progenitoras musculares dão origem aos mioblastos embrionários que se diferenciam em miócitos, que se fundem para gerar as fibras musculares primárias. Estas servirão como molde para o desenvolvimento muscular durante a miogênese fetal. Nesta fase, miócitos podem fundir-se às fibras primárias ou fundir-se entre si a fim de gerar fibras secundárias adicionais. Na miogênese neonatal ocorre uma rápida proliferação e fusão dos mioblastos neonatais, que são responsáveis por um intenso crescimento muscular. Durante a fusão dos mioblastos e a formação das fibras musculares, seus núcleos ficam localizados no centro da fibra muscular, o que é uma característica marcante da fibra muscular imatura. No decorrer da síntese de miofibrilas o núcleo migra gradualmente para a periferia da fibra, adquirindo uma posição subsarcolemal. No músculo esquelético adulto, observamos a citoarquitetura das fibras musculares com diâmetro homogêneo e fibras com núcleos localizados na sua periferia (ABMAYR; PAVLATH, 2012; BENTZINGER; WANG; RUDNICKI, 2012; PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003).

Alguns músculos do corpo são gerados a partir de estruturas diferentes durante a fase embrionária, como acontece com os músculos da cabeça e pescoço que se originam do mesoderma craniano não segmentado (compreendendo o mesoderma craniano paraxial e pré-cordal). Por outro lado, a musculatura do tronco e dos membros deriva do dermomiótomo, uma região mais amadurecida dos somitos. No entanto, a regulação do processo de formação do músculo a partir das células progenitoras embrionárias segue o mesmo padrão em todos os músculos (BUCKINGHAM, 2001; ZAMMIT, 2017).

O desenvolvimento muscular, processo extremamente complexo, demanda rígido controle molecular e tem como principais orquestradores um conjunto de proteínas específicas do músculo (e.g. MYF5, MYF6, MYOD e MYOG), chamados de Fatores de Regulação Miogênica (MRFs, do inglês *Myogenic Regulatory Factors*). Estes atuam em vários pontos da miogênese, para estabelecer o fenótipo do músculo esquelético através da regulação da proliferação, saída irreversível do ciclo celular de células precursoras, (ou o repovoamento da linhagem de mioblastos), e a ativação regulada de genes de proteínas sarcoméricas e específicas do músculo, o que facilita a diferenciação e a montagem do sarcômero (fig. 4) (OTT *et al.*, 1991; TAJBAKHSI *et al.*, 1998).

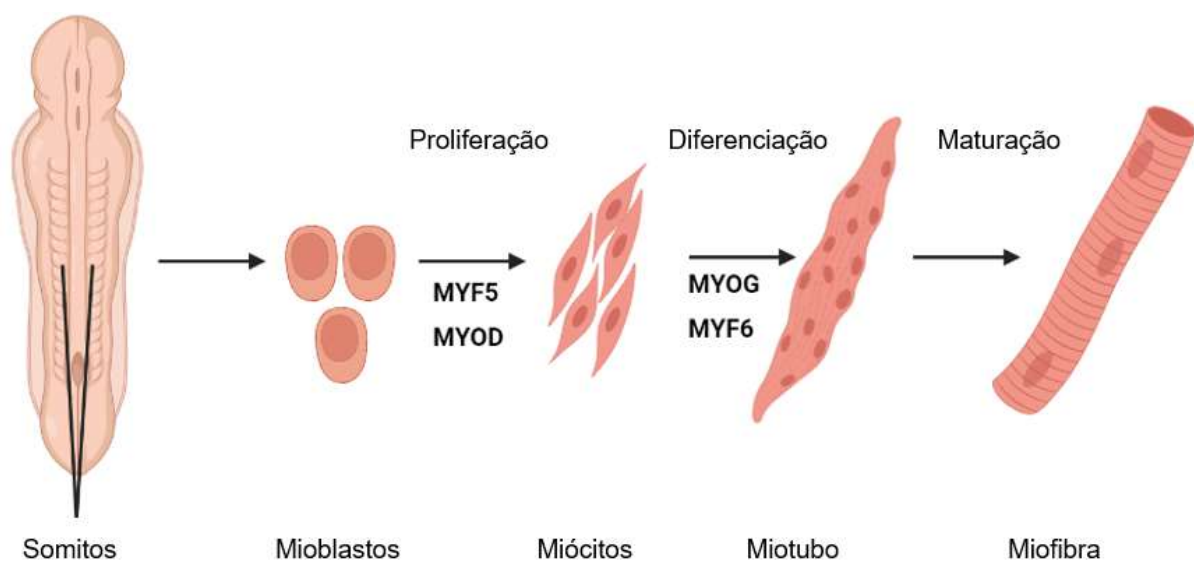


Figura 4: Miogênese a partir de células precursoras musculares originadas nos somitos. O mioblastos originados de células precursoras dos somitos passam por intensa proliferação, que é regulada principalmente por MYOD e MYF5. A diferenciação e maturação final são reguladas principalmente por MYF6 e MYOG. Adaptado de Biorender.com (2022) disponível em <https://app.biorender.com>.

A partir das células progenitoras embrionárias podemos traçar uma linha temporal para demonstrar em que momento do processo de formação dos músculos atuam os principais fatores de transcrição musculares e como regulam este processo. Nessa escala temporal, um fator de transcrição importantíssimo é o

PAX3, que é responsável pelo comprometimento da célula progenitora embrionária com a linhagem muscular, além de atuar no processo de autorrenovação e sobrevivência celular. O fator PAX3 é amplamente expresso em células precursoras miogênicas durante período embrionário (fig. 5). Por outro lado, no músculo adulto a expressão de PAX3 é praticamente nula, tendo sua expressão mantida somente em células satélite, células-tronco musculares, de alguns músculos, como por exemplo o gracilis. Essa questão está ligada à sua origem embrionária e não ao tipo de fibra (BUCKINGHAM *et al.*, 2003; RELAIX; ZAMMIT, 2012). Com a diminuição na expressão de PAX3 após o nascimento, PAX7 cumpre um papel semelhante fundamentalmente (fig. 5). Assim como PAX3, o PAX7 está associado a autorrenovação e sobrevivência celular, garantindo assim a manutenção do *pool* de células satélite no músculo adulto (BENTZINGER; WANG; RUDNICKI, 2012; KASSAR-DUCHOSSOY *et al.*, 2005; SOLEIMANI *et al.*, 2012). Camundongos com mutações em homozigose no gene *Pax7* sobrevivem por cerca de 3 semanas após o nascimento (PROSKOROVSKI-OHAYON *et al.*, 2017). Já em humanos, alterações em homozigose no gene *PAX7* leva a um quadro de miopatia congênita com atrofia e fraqueza muscular, baixa estatura e degeneração muscular progressiva devido a diminuição no *pool* de células satélite e, conseqüentemente, à diminuição do crescimento e da capacidade de regeneração muscular (FEICHTINGER *et al.*, 2019).

À medida que a diferenciação avança, os MRFs têm um papel regulatório crucial nas etapas de formação da fibra muscular. Composto por MYF5, MYOD, MYOG e MYF6, estes fatores de transcrição atuam essencialmente no músculo por compartilharem uma região central com um motivo básico hélice-alça-hélice. O domínio hélice-alça-hélice conduz a ligação do DNA à sequência E-box encontrada em sequências promotoras e potenciadoras de muitos genes músculo-específicos (BERKES; TAPSCOTT, 2005; OLSON, 1990). Para que a célula

progenitora avance no processo de diferenciação é necessária a expressão de MYF5 que, por consequência, ativa a expressão de MYOD. Quando ativo, MYOD induz a expressão de MYOG, o que resulta na regulação negativa da expressão de MYF5. A alteração na expressão de MYF5 para MYOG faz com que a célula saia do ciclo celular e se encaminhe para diferenciação. A atividade conjunta de MYOD e MYOG leva a ativação de MYF6 e outros genes de diferenciação muscular terminal para permitir a fusão dos mioblastos, formação dos miotubos e início da formação dos sarcômeros e das fibras multinucleadas. Por fim, em músculos maduros diferenciados, MYF6 continua a ser expresso em altos níveis enquanto a expressão de MYOD e MYOG é então regulada negativamente (fig. 5) (DEATO *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2011; ZAMMIT, 2017).

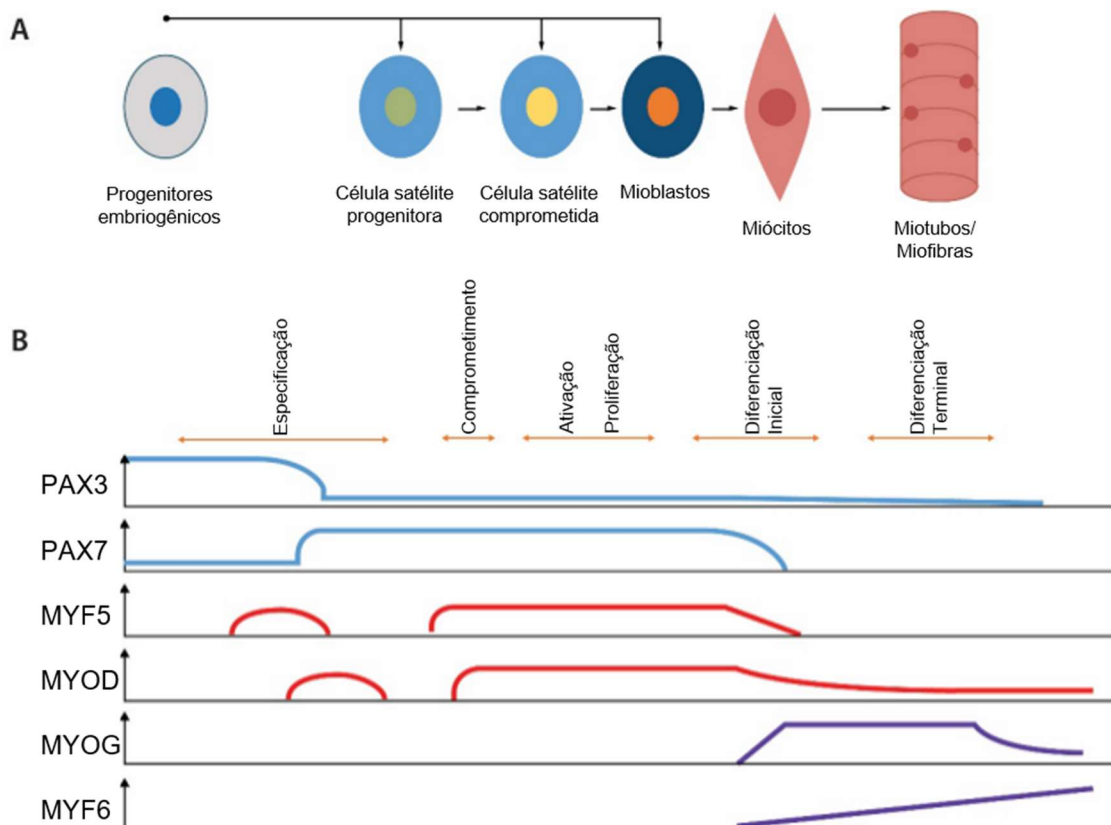


Figura 5: Fatores de transcrição envolvidos no processo de miogênese. (A) Etapas celulares do desenvolvimento muscular. (B) Regulação da miogênese por uma série de fatores de transcrição que atuam em escala temporal durante a formação do músculo. Modificado de: ALMEIDA *et al.*, 2016.

Dada a importância dos fatores de transcrição que regulam a miogênese, é de se esperar que alterações que levem a alterações na expressão ou até a ausência de expressão dos mesmos possam resultar em consequências drásticas, como a não formação de músculo. De fato isso ocorre na ausência da expressão de *Myog*, que leva a deficiência na diferenciação terminal e ausência de fibras musculares (NABESHIMA *et al.*, 1993; RAWLS *et al.*, 1995; VENUTI *et al.*, 1995). Por outro lado, o que acontece, na maioria dos casos, é que alguns destes genes têm funções redundantes e que, na ausência de um destes fatores de transcrição outros podem assumir a sua função. Isso foi demonstrado em camundongos *Myod*^{-/-} onde uma elevada expressão de *Myf5* permite que ocorra uma formação normal da musculatura esquelética (RUDNICKI *et al.*, 1992). Elevada expressão de *Myog* também foi observado em camundongos com ausência de expressão de *Myf6* (VENUTI *et al.*, 1995). Para demonstrar a sobreposição de atuação destes genes, alguns trabalhos mostraram que quando anuladas a expressão de dois MRFs que têm papéis similares, a formação do músculo fica comprometida. Isso acontece em camundongos duplo *knockout* para *Myod* e *Myf5* que nascem com ausência total de musculatura esquelética e morrem logo após o nascimento (RUDNICKI *et al.*, 1993). Camundongos duplo *knockout* *MyoD* e *Myf6* também têm deficiência na formação de fibras musculares (RAWLS *et al.*, 1995). Apesar desta compensação parcial pela sobreposição funcional destes genes, é notável a importância de uma expressão equilibrada deste conjunto de genes para que a formação do músculo seja orquestrada e ocorra um desenvolvimento muscular normal.

1.3.Principais etapas celulares da regeneração muscular

Com uma imensa capacidade regenerativa, o tecido muscular esquelético pode se restabelecer em pouco tempo após lesão, e os passos necessários para o restabelecimento completo do músculo recapitulam as fases da miogênese (BENTZINGER; WANG; RUDNICKI, 2012). Essa rápida e efetiva resposta se

dá graças a uma subpopulação de células musculares parcialmente indiferenciadas, mononucleares, que se localizam nas periferias das fibras musculares. Estas células são denominadas células satélite, também chamadas de células precursoras miogênicas (MAURO, 1961), que conferem à musculatura uma grande capacidade de se adaptar a demandas como crescimento e regeneração. Ocupando uma posição estratégica, entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular, estas células estão aptas a reparar a fibra ao menor sinal de lesão. A proximidade com a fibra é fundamental na rápida resposta destas células às lesões e à necessidade de crescimento do músculo (BISCHOFF, 1990; BISCHOFF; HEINTZ, 1994). Além disso, essa população de células satélite pode suportar diversos ciclos de lesão e regeneração e respondem prontamente assim que estimuladas (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; DUMONT; WANG; RUDNICKI, 2015; KUANG *et al.*, 2007). Após terem recebido o estímulo através da lesão, as células satélite, agora ativadas, sofrem um processo de divisão assimétrica, onde parte das células volta ao seu estado quiescente e a outra parte inicia um intenso processo de proliferação seguido de diferenciação. Essas células em estado proliferativo, denominadas mioblastos/miócitos migram ao local da lesão e se fundem à fibra a ser regenerada (i.e. hipertrofia) ou fundem-se entre si para formar uma nova fibra (i.e. hiperplasia). Após este processo é possível notar fibras musculares com núcleos internalizados, característicos de fibras em processo regenerativo. Por fim, esta fibra recém-regenerada passa por um processo de maturação com a migração do núcleo para a região periférica da fibra, e então o ciclo de regeneração se completa (HAWKE *et al.*, 2001). Em suma, podemos classificar as etapas de regeneração como, ativação/proliferação, migração, fusão e maturação (fig. 6). Cada uma destas etapas é notadamente importante e, alterações em uma ou mais destas etapas pode levar a prejuízos na formação do músculo.

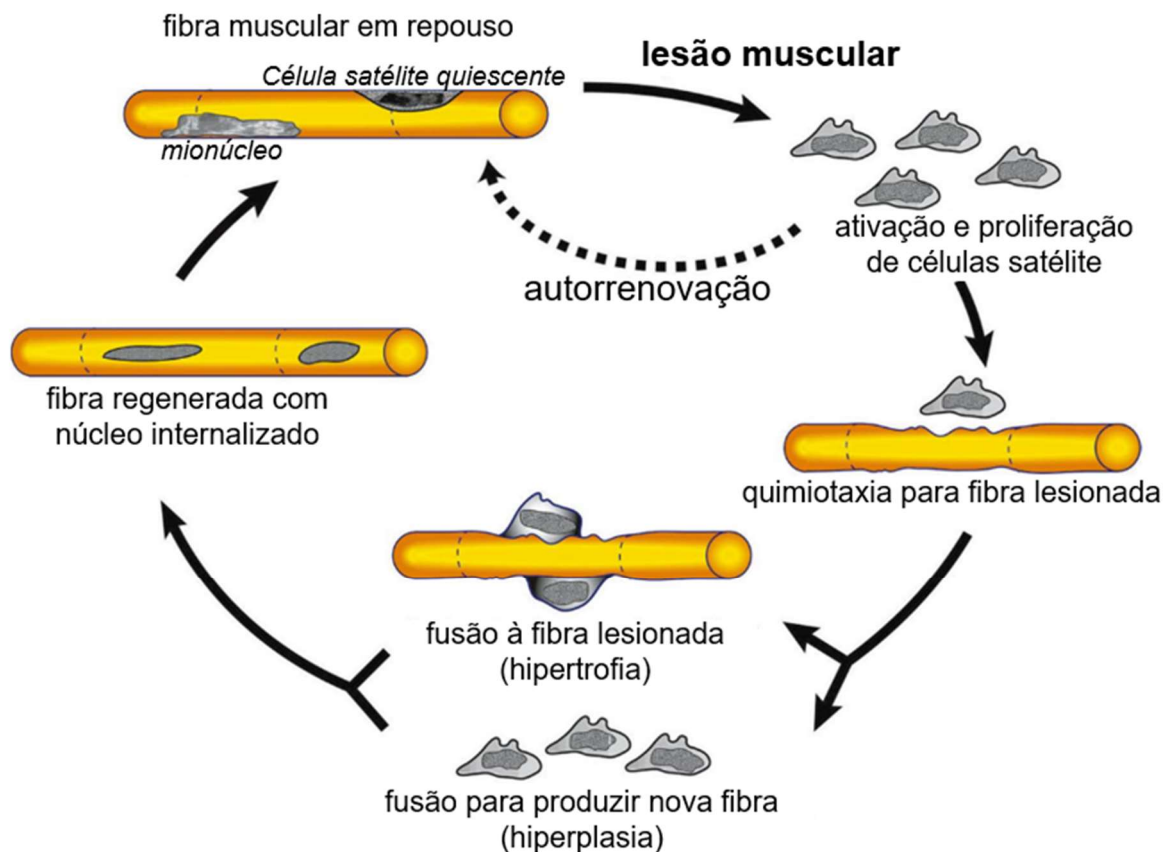


Figura 6: Ciclo de regeneração muscular a partir de estímulo por lesão. A imagem mostra as principais etapas do processo de regeneração muscular, como a ativação e proliferação celular, a migração e fusão dos mioblastos às fibras lesionadas e a maturação da fibra recém-regenerada. Modificado de Hawke e Garry, 2001.

Entre as fases do ciclo da regeneração muscular, a fusão dos mioblastos é um processo especialmente crítico. Mesmo sendo extremamente relevante, existe uma lacuna do conhecimento na literatura em relação aos mecanismos moleculares de regulação da fusão quando comparados aos demais passos do ciclo. Devido à falta de métodos para reconstituir a fusão muscular em laboratório até 10 anos atrás (i.e. 2013), as proteínas responsáveis por esta etapa do ciclo de regeneração muscular permaneceram não-identificadas, tornando um processo atraente de ser investigado cientificamente (SAMPATH; SAMPATH; MILLAY, 2018).

1.4. Controle molecular da fusão celular durante o processo de regeneração muscular

A fusão celular é um evento biológico que ocorre apenas em um número limitado de tipos celulares em mamíferos, como espermatozoides e ovócitos durante a fertilização, trofoblastos durante a formação da placenta, macrófagos durante formação de células gigantes e osteoclastos, além de mioblastos durante a miogênese e regeneração muscular (HERNÁNDEZ; PODBILEWICZ, 2017; PETRANY; MILLAY, 2019). Este evento possui uma regulação bem orquestrada e envolve passos importantes como migração, reconhecimento celular, adesão, sinalização celular, alteração do citoesqueleto e rearranjo da membrana plasmática. Isso permite que ocorra a aproximação e a ligação entre duas membranas em uma única bicamada e a mistura dos conteúdos citoplasmáticos (ABMAYR; PAVLATH, 2012). No músculo esquelético, este é um evento chave tanto no reparo quanto na formação de fibras musculares.

Dado que a fibra muscular é a estrutura funcional do músculo esquelético, um sincício multinucleado, formado a partir da fusão de várias células mononucleadas, entende-se que o processo de fusão entre mioblastos é um processo crucial para a formação da musculatura esquelética e para o seu processo de regeneração. De fato, o processo de fusão entre mioblastos durante a formação de uma nova fibra e entre mioblastos e fibras musculares durante a regeneração é extremamente importante. Isso porque, sem que ocorra o correto processo de fusão celular a musculatura esquelética não é formada e/ou reparada (HERNÁNDEZ; PODBILEWICZ, 2017).

Todo o processo de fusão celular durante a formação e reparo na musculatura esquelética é orquestrada pelos MRFs, que regulam a expressão de proteínas como myomixer (MYMX) e myomaker (MYMK), dentre outras. A descoberta da proteína transmembrana MYMK foi um grande passo para o melhor

entendimento que rodeia este processo (MILLAY *et al.*, 2013). Expresso somente em células musculares, quando sua expressão é induzida em fibroblastos MYMK pode promover a fusão destes fibroblastos com mioblastos. Apesar disso, MYMK não tem capacidade de promover a fusão entre fibroblastos somente. Essa incapacidade levou a identificação da segunda proteína de membrana MYMX como parceira nesta fusão. Esta proteína é expressa especificamente em músculo esquelético e foi descrita e nomeada por três grupos independentes em um mesmo período (myomixer; myomerger; minion) (BI *et al.*, 2018; QUINN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Quando expressas em conjunto, MYMK e MYMX podem induzir a fusão inclusive entre fibroblastos (QUINN *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2017). No processo de regeneração normal, a expressão tanto de MYMX quanto de MYMK é induzida pela expressão tanto de MYOD quanto de MYOG (MILLAY *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2020). Tanto MYMK quanto MYMX são expressos durante a fase embrionária, mas não em miofibras adultas e saudáveis. A expressão de MYMK em fibras adultas, quando induzida, contribui para a ocorrência de danos e instabilidade da membrana sarcoplasmática (PETRANY *et al.*, 2020). Após lesão induzida, tanto MYMK quanto MYMX são ativados em células satélite. A expressão destes genes não foi identificada em outros tipos celulares que passam por fusão, como osteócitos, gametas etc. Isso reforça a ideia de serem proteínas atuantes no processo de fusão de mioblastos especificamente (LEHKA; RĘDOWICZ, 2020). Em camundongos, experimentos de perda de função para MYMK e MYMX revelaram que estas proteínas são necessárias para a formação do músculo. A perda destes genes provoca morte ao nascimento por falta de músculo esquelético. Além disso, a cultura de mioblastos destes animais modificados mostrou que as células são capazes de se diferenciar, mas não de se fundir, confirmando um papel específico das proteínas no processo de fusão (BI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Uma característica interessante é de que enquanto MYMK é necessária em ambas as células que se fundirão, MYMX é necessária em somente uma das células. Isto pode significar que uma simples

célula expressando MYMX pode desencadear a formação de um novo miotubo (CHEN *et al.*, 2019). Com base nos estudos atuais, fica evidente que estas duas proteínas são essenciais para o processo de fusão dos mioblastos. Sabe-se, também, que existe interação física entre elas, porém ainda é obscuro o correto mecanismo de ação e interação entre essas proteínas.

Outra proteína que foi descrita como participativa no processo de fusão em mioblastos é a colágeno 24 alfa-1 (COL25A1). Componente da matriz extracelular (MEC), esta proteína é uma proteína transmembrana, onde a porção extracelular é clivada para compor a MEC. Seu papel preciso no processo de fusão de mioblastos ainda não é conhecido, mas sua participação neste processo foi descrita em um estudo realizado por GONÇALVES *et al.*, 2019, que mostrou que a ausência da expressão de COL25A1 leva à um prejuízo na fusão *in vivo* de mioblastos em camundongos.

Seja atuando diretamente no processo de fusão ou regulando etapas que levam à fusão entre mioblastos, como a sinalização celular, a migração e o remodelamento da membrana plasmática, diversas proteínas têm sido correlacionadas a diferentes etapas do desenvolvimento e regeneração do músculo. Uma destas proteínas é a palmdelphin (PALMD), proteína citoplasmática recém-descrita como atuante na formação de miotubos (NIE *et al.*, 2017). PALMD é uma isoforma citosólica predominante de uma família de proteínas implicadas na dinâmica da membrana plasmática e no controle da forma celular (HU *et al.*, 2005). Em um recente estudo, se demonstrou que sua inibição através de pequenos RNAs de interferência (siRNA) na linhagem celular de mioblastos de camundongo C2C12 levou à inibição da diferenciação destas células, enquanto a superexpressão de PALMD aumentou o processo de diferenciação miogênica. No entanto, seus mecanismos moleculares e celulares de participação na fusão de mioblastos ainda precisam ser esclarecidos (NIE *et al.*, 2017).

Também ainda não esclarecidos totalmente estão os mecanismos por trás da atuação de shisa2 (SHISA2) no processo de fusão em mioblastos. SHISA2 é uma proteína de retículo endoplasmático, que atua como adaptador para modular funções de outras proteínas de membrana, como receptores de superfície celular, por exemplo (PEI; GRISHIN, 2012). Um estudo recente mostrou que SHISA2 pode atuar no remodelamento do citoesqueleto através da polimerização da F-actina, o que está diretamente ligado à capacidade de migração da célula. Quando super expressa em mioblastos, SHISA2 promove um aumento de F-actina polimerizada, quantidade de lamelipódios e filopódios. Partindo destas observações, a sugestão é que o aumento no processo de fusão pela superexpressão de SHISA2 se dá pelo aumento na mobilidade celular (WROBLEWSKA *et al.*, 2016).

1.5. Síndromes associadas à deficiência do processo de fusão celular no tecido muscular

No caso de haver alguma deficiência no processo de fusão, a formação e a regeneração do músculo podem ser comprometidas. É o caso da síndrome de Carey-Fineman-Ziter 1, que é um distúrbio multissistêmico congênito caracterizado por hipotonia, seqüência de Moebius (paralisia facial congênita bilateral com abdução ocular prejudicada), complexo de Pierre Robin (micrognatia, glossoptose e palato ogival ou fenda palatina), atraso nos marcos motores e déficit de crescimento. Estes sintomas são resultados de alterações genéticas em um gene que codifica uma proteína que atua diretamente no processo de fusão de mioblastos, a MYMK (DI GIOIA *et al.*, 2017; PASETTI *et al.*, 2016).

No ano de 2022 foi reportada uma família com fenótipo semelhante ao da síndrome de Carey-Fineman-Ziter 1 e identificou-se nos indivíduos afetados alterações em outro gene que codifica uma proteína com função muito semelhante a de MYMK, o gene que codifica MYMX. Desta forma, *MYMK* e *MYMX* parecem

ser extremamente importantes no processo de fusão de mioblastos. Ao conjunto de alterações clínicas ocasionadas pelas alterações genéticas em *MYMX*, foi dado o nome de síndrome de Carey-Fineman-Ziter 2 (RAMIREZ-MARTINEZ *et al.*, 2022). Além disso, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) já foi associada ao aumento da expressão de *MYMX* em modelos animais mdx (i.e. modelo de distrofia muscular que exibe degeneração e regeneração muscular durante a progressão da doença), quando comparados aos controles selvagens (BI *et al.*, 2017).

Com menor acometimento muscular, alterações bialélicas no gene *COL25A1*, que codifica a proteína COL25A1 causam um fenótipo conhecido como fibrose congênita dos músculos extraoculares-5. Esse quadro clínico é caracterizado por ptose com denervação do músculo levantador da pálpebra de uma ou ambas as órbitas, dentre outros sintomas (SHINWARI *et al.*, 2015). Em estudo publicado anteriormente GONÇALVES *et al.*, 2019 sugere que *COL25A1* atua no processo de reconhecimento e adesão durante a de fusão de mioblasto.

Recentemente outras proteínas também foram relatadas como atuantes no processo de fusão de mioblastos, porém nenhum fenótipo está associado a alterações nestes genes, que é o caso dos genes *PALMD* e *SHISA2*.

Visto que pequenas alterações em genes que codificam proteínas importantes para a formação e reparo das fibras musculares podem gerar graves consequências, o mesmo pode ocorrer no caso de alguma alteração secundária na expressão destas proteínas. Em doenças crônicas como distrofias musculares, alguns efeitos secundários são observados e não estão diretamente ligados à ausência/deficiência primária da proteína. Um exemplo é o processo inflamatório constante na musculatura de pacientes com DMD. O processo inflamatório não é resultado direto da ausência de distrofina no músculo, mas do rompimento da membrana sarcoplasmática e a liberação do conteúdo do sarcoplasma no meio

extracelular. A procura por estes defeitos secundários tem se tornado cada vez mais um objetivo importante para alcançar, não a cura, mas a minimização dos efeitos da doença e melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

1.6. Distrofias musculares: definições e aspectos epidemiológicos

Distrofias musculares são um grupo de doenças musculares genéticas caracterizadas por perda progressiva e irreversível de células musculares, levando à fraqueza e perda de capacidade motora. A fraqueza progressiva se dá através da substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo e adiposo, devido a seguidos ciclos de degeneração e regeneração desequilibrados, com falhas no processo de regeneração. Com alta variabilidade, a progressão clínica das distrofias varia desde formas congênitas com progressão rápida e acometimento muscular severo até formas de início tardio e com acometimento muscular brando (EMERY, 2002; VAINZOF; ZATZ, 2003) São mais de 40 formas de distrofias musculares com genes já descritos, variando quanto ao padrão de herança e aos grupos musculares afetados (EMERY, 2002). Diversos genes e seus produtos proteicos estão relacionados com diferentes formas de distrofias. A ausência total, parcial ou a perda de função de proteínas de matriz extracelular, membrana nuclear, citoesqueleto e sarcolemas, leva a um quadro secundário de instabilidade do sarcolema, influxo de cálcio, estresse oxidativo, respostas inflamatórias e desarranjo da matriz extracelular. Todo este processo conduz à instabilidade estrutural do músculo esquelético e à perda progressiva das fibras musculares (EMERY, 2002).

Com uma prevalência de casos de cerca de 1 para 5000 a 1 para 6000 meninos nascidos vivos, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum entre as doenças neuromusculares (CRISAFULLI *et al.*, 2020). O gene da distrofina está localizado no braço curto do cromossomo X e mutações que causam DMD resultam na deficiência da proteína distrofina no músculo. Estas

mutações são, em 60% dos casos, deleções, além de duplicações e mutações de ponto nos demais casos. A perda funcional dessa proteína de 427kDa provoca degeneração muscular acentuada devido à instabilidade estrutural no complexo distrofina-glicoproteínas associadas (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987). As manifestações clínicas começam entre 2 e 3 anos de idade, com cerca de 10 a 12 anos de idade o paciente passa a necessitar de auxílio de cadeira de rodas para locomoção e a sobrevivência, em geral, não ultrapassa a terceira década de vida (CRISAFULLI *et al.*, 2020; HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987).

1.7. Relevância da regeneração muscular nas distrofias musculares

O processo de lesão crônica ao qual a musculatura esquelética está exposta nos pacientes com distrofias musculares, leva o tecido a repetidos ciclos de degeneração e regeneração. Apesar de todo o potencial regenerativo do tecido muscular esquelético, a regeneração não é suficiente e não supera o processo de degeneração, o que leva a uma perda progressiva das fibras musculares e sua substituição por tecido conjuntivo e adiposo. Em alguns tipos de distrofia muscular, o gene mutado não é expresso em células satélite e, portanto, não influencia diretamente na resposta regenerativa destas células. Por outro lado, na Distrofia Muscular de Duchenne, o processo de regeneração pode não ser suficiente pois o defeito proteico primário influencia diretamente nas células satélite. Esses dados foram apresentados por DUMONT *et al.*, 2016 e revelaram que a ausência de distrofina em células satélite leva à senescência, em longo prazo.

Estudos recentes em nosso laboratório mostram que os músculos de alguns animais distróficos apresentam grande atividade regenerativa, que foi comprovada através da expressão gênica e proteica de fatores de transcrição relacionados às células satélite e seu processo de ativação e proliferação. Além da expressão desses fatores, os músculos dos animais distróficos analisados

apresentaram uma grande quantidade de fibras em processo regenerativo através da marcação por isoforma da miosina de cadeia pesada de desenvolvimento (dMHC). Apesar destes dados, observamos que as fibras musculares recém-formadas não atingem o diâmetro de fibras totalmente maduras, o que pode indicar a formação incompleta das fibras musculares, que provocaria um prejuízo no processo regenerativo (RIBEIRO *et al.*, 2019). Outro trabalho de nosso laboratório também revelou que em células disferlina-deficientes de pacientes humanos, ocorre um atraso no processo de fusão de mioblastos *in vitro* e a consequente diminuição do diâmetro do miotubo formado (ISHIBA *et al.*, 2019).

Portanto, a partir destes dados, verificamos que, independentemente do defeito gênico primário, o processo distrófico é seguido de tentativa de regeneração. Entretanto, a regeneração não é totalmente eficaz, gerando miotubos e fibras musculares pequenas e imaturas. A hipótese é que esta falha na regeneração pode ser devido à deficiência no processo de formação dos miotubos, que envolve etapas como, migração e fusão dos mioblastos.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo Geral

A proposta deste trabalho foi de investigar a etapa final do processo de miogênese e regeneração muscular, que envolve a diferenciação final, fusão dos mioblastos e maturação da fibra muscular. Para tal, utilizamos um modelo celular *in vitro* para a distrofia de Duchenne (DMD), comparando com controle normal. A partir da observação de diferenciação de miotubos defeituosa na DMD, o desenvolvimento do trabalho se deu através da análise de genes relacionadas ao processo de regeneração muscular, diferenciação e fusão celular, incluindo os genes *MYMK*, *MYMX*, *COL25A1*, *MYOD*, *MYOG* e *MYF5*. Posteriormente, a partir da análise de genes envolvidos na migração celular como, *PALMD*,

SHISA2. Incluiu-se no estudo a análise da migração de mioblastos nos dois grupos estudados.

1.8.2. Objetivos específicos

- a) Análise da capacidade de formação de miotubos normais a partir de mioblastos derivados de pacientes com DMD.
- b) Avaliar possíveis alterações no mecanismo de fusão celular através da análise quantitativa da expressão de genes e proteínas relacionados: MYMX, MYMK, COL25A1
- c) Avaliar possíveis alterações na miogênese através da análise quantitativa da expressão de genes e proteínas atuantes como fatores de transcrição no processo de miogênese e regeneração: MYF5, MYOD, MYOG
- d) Avaliar possíveis alterações no mecanismo de migração celular através da análise quantitativa da expressão de genes PALMD e SHISA2, e estudo de migração celular

1.9. Material e métodos

1.9.1. Cultura de células

Seis diferentes linhagens de mioblastos foram utilizadas neste estudo, duas linhagens DMD e quatro linhagens controle. Mioblastos de pacientes com DMD são AB1023 (mutação NM_004006.3;c.8713C>T;p.Arg2505Ter) e AB1071 (mutação: deleção do exon 45 a 52). As linhagens de controle são AB678, AB1079, AB1167 e AB1190 sem nenhuma mutação patogênica. Mioblastos foram isolados de biópsias do músculo quadríceps e imortalizados pela plataforma de imortalização de células humanas do Instituto de Miologia conforme protocolo previamente estabelecido (Dr. Vincent Mouly (Institut de Myologie, França) (MAMCHAOUÏ et al., 2011).

As linhagens celulares imortalizadas foram semeadas a $2,5 \times 10^5$ células por 75 cm^2 e cultivadas em meio de proliferação, Skeletal Muscle Cell Growth

Medium (PromoCell), com 20% de soro fetal bovino (Gibco). Quando as células atingiram entre 70% a 80% de confluência, o meio foi trocado para meio de diferenciação, que é composto por DMEM GlutaMAX™ (Invitrogen), 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen) e 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich). As células foram coletadas ainda em proliferação (mioblastos - 0 dia) e após indução da diferenciação em diferentes tempos: 12 horas, 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias e 6 dias. As células foram destacadas usando um raspador de células para evitar a degradação das proteínas da membrana, centrifugadas a 300g por 10 min a 4°C. Os *pellets* celulares foram lavados com solução salina tamponada com fosfato 1x (PBS, Gibco) e centrifugados mais uma vez. Os *pellets* resultantes foram congelados e armazenados a -70°C antes de proceder à análise de RNA e proteínas.

1.9.2. Análise de RNA

Os *pellets* de células previamente obtidos foram usados para extração de RNA total usando o protocolo TRIzol (Invitrogen). O RNA obtido foi solubilizado em água livre de RNase (Ambion™) e quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). A síntese de cDNA foi realizada usando 1µg de RNA total de acordo com o protocolo SuperScript™ VILO™ (Invitrogen). Conjuntos específicos de primers foram usados para análises gênicas e o gene *TBP* foi usado como controle endógeno (Tabela 1). A PCR em tempo real foi realizada usando o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) em um termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems). O *foldchange* foi obtido pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, com *TBP* e as amostras de controle de 0 dias como normalizadores.

Tabela 1: Sequência de Primers

Gene	Sequência Líder 5'-3'	Sequência Retardada 5'-3'
<i>MYF5</i>	CTCAGCAGGATGGACGTGAT	TATGCAGGAGCCGTCGTA
<i>MYOD</i>	TGCCACAACGGACGACTTC	CGGGTCCAGGTCTTCGAA
<i>MYOG</i>	CTCAGCAGGATGGACGTGAT	AGGTTGTGGGCATCTGTAGG
<i>TBP</i>	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
<i>MYMX</i>	CAGTTCTGCCCGGCACTGA	CAAAGCCTCTCGCATGTCCT
<i>MYMK</i>	TCTACACCCAGCAGATAGG	AAGTGTAGTCCCAGTCCTC
<i>COL25A1</i>	TCCCAAAGGAGAAAGAGGTG	CAGGCTCTCCATCTTTCCC
<i>SHISA2</i>	TTTCTCTGTGCTGAACTGTC	CAGATACTGCCCTTGATGTG
<i>PALMD</i>	CAATTGAGCGGACAACAGAA	TTGGAAGGTCAGGGATATTAGC

1.9.3. Análise de proteínas

Para análise de proteínas foram utilizadas amostras de 0 dia, 3 dias e 6 dias. *Pellets* celulares de duas linhagens de DMD (AB1023; AB1071) e duas linhagens de controle (AB1167; AB1190) foram homogeneizadas em tampão RIPA (Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich). As amostras foram mantidas em gelo por 30 min e posteriormente centrifugadas a 16.000 g por 20 min a 4°C, seguidas de quantificação de proteínas utilizando o kit Pierce BCA Assay (Thermo Fischer Scientific). Amostras homogeneizadas com 30 µg de proteína foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas PVDF iBlot™ Transfer Stack usando iBlot™ Gel Transfer Device (Invitrogen) por 7 minutos. As membranas foram cortadas de acordo com o peso molecular das proteínas a serem reveladas, tomando como referência o padrão proteico Protein Precision Plus™ Dual Color (1610394, Bio-

Rad). As membranas foram então incubadas usando os seguintes anticorpos: anti-MYF5 (ab125078, abcam; 1 :1000), anti-Miogenina (MYOG) (ab15232, abcam; 1:250) e anti-SHISA2 (HPA050172, Sigma-Aldrich; 1:300). As membranas foram então incubadas com os anticorpos secundários apropriados anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com peroxidase (Thermo Fisher Scientific) e reveladas usando o kit Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent (Invitrogen) ou Novex™ ECL Prime Chemiluminescent Kit de reagente de substrato (Invitrogen). anti-GAPDH (8884S, Cell Signaling; 1:1000) ou Anti- α Actinin (12413S, Cell Signaling; 1:1000) foram usados como controle endógeno. As imagens de quimioluminescência foram obtidas usando o fotodocumentador ChemiDoc™ MP Image System (Bio-Rad). As bandas foram quantificadas por densitometria usando o software ImageLab (Versão 6.1.0, Bio-Rad Laboratories). A proteína de interesse e a proteína endógena foram analisadas na mesma membrana, tanto para amostras experimentais quanto para amostras controle.

1.9.4. Detecção de proteínas por imunocitoquímica e reação de imunofluorescência

Mioblastos DMD e controle foram semeados em densidade de 2×10^4 células por câmara no Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide (177429; Termo Fischer Scientific). As células foram cultivadas em meio de proliferação por 24 horas e então o meio de cultura foi trocado para meio de diferenciação, então as células foram fixadas após 6 dias com paraformaldeído 4% por 20 min, seguido de permeabilização com 1x PBS com 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 10 min e bloqueio em 1x PBS com soro fetal bovino 1% (Gibco) e 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 30 min em temperatura ambiente. As células foram então incubadas com anticorpo primário durante a noite a 4°C, seguidas por três lavagens com 1x PBS com 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e incubadas com um anticorpo secundário seguido por três lavagens. Os anticorpos primários utilizados foram anti-COL25A1 (SAB1409894, Sigma-Aldrich; 1:150), anti-

distrofina (ab15277, abcam 1:200) anti-ESGP (MYMX) (ab214934, abcam; 1:150), anti TMEM8C (MYMK) (ab188300, abcam; 1:150) anti-PALMD (PA5-53678, Invitrogen; 1:200) e anti-SHISA2 (HPA050172, Sigma-Aldrich; 1:200). As imagens qualitativas foram obtidas usando um sistema confocal de microscópio de fluorescência Zeiss LSM-800. Para o ensaio de imunofluorescência foram analisadas duas linhagens DMD (AB1023; AB1071) e duas linhagens controle (AB1167; AB1190).

1.9.5. Análise morfométrica: Índice de fusão e área do miotubo

Os mioblastos foram semeados na densidade de 2×10^4 células por câmara em Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide (177429; Termo Fischer Scientific). As células foram cultivadas em meio de proliferação até atingirem 100% de confluência (~ 3 dias), então o meio foi mudado para meio de diferenciação. As células foram fixadas após 6 dias com paraformaldeído 4% por 20 min, seguido de permeabilização com 1x PBS com 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 10 min e bloqueio em 1x PBS com 1% de soro fetal bovino (Gibco) e 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) durante 30 min à temperatura ambiente. As células foram então incubadas com um anticorpo contra a cadeia pesada de miosina (MF-20, Developmental Studies Hybridoma Bank; 1:100) durante a noite a 4°C, seguido de três lavagens com 1x PBS com 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e incubação com um anticorpo secundário de camundongo conjugado com Alexa Fluor 594 (A21442, Invitrogen) e lavado novamente. As lâminas foram montadas com Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories) com DAPI (2 µg/mL). A especificidade dos anticorpos foi avaliada usando amostras de controle indiferenciadas e incubando amostras apenas com anticorpo secundário. As imagens foram obtidas em um sistema confocal Zeiss LSM-800 com um EC-Plan Neofluar 20x/0,5. O índice de fusão foi calculado usando o número de núcleos dentro dos miotubos/núcleos totais. Dez imagens de campos aleatórios com aumento de 20x por linhagem foram quantificadas para cada experimento. Foram

utilizadas duas linhagens DMD (AB1023; AB1071) e duas linhagens controle (AB1167; AB1190).

1.9.6. Ensaio de migração transwell

Um total de 5×10^4 células em 250 μ L de meio sem soro foi semeado em uma câmara superior de um inserto Transwell não revestido (inserto de 24 poços; tamanho de poro de 8 μ m; BD Biosciences). O meio suplementado com 20% de soro foi usado como quimioatraente na câmara inferior. Após 24h de incubação, as células da câmara superior foram removidas com um cotonete e as células que migraram pelos poros foram fixadas e coradas com DAPI diluído em Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories) (2 μ g/mL) por quinze minutos. As imagens das células migradas foram tiradas com um sistema confocal de microscópio de fluorescência Zeiss LSM-800 com um EC-Plan Neofluar 20x/0,5, e os números de células migradas foram quantificados usando o software ImageJ (National Institutes of Health). Dez imagens de campos aleatórios com aumento de 20x por linhagem foram quantificadas para cada experimento. Os resultados representam o número de núcleos por imagem. Para a análise do ensaio de migração, foram utilizadas duas linhagens DMD (AB1023; AB1071) e quatro linhagens de controle (AB678; AB1079; AB1167; AB1190).

1.9.7. Análise estatística

Todas as análises realizadas no manuscrito foram repetidas em três experimentos independentes, com pelo menos duas repetições técnicas cada. Os dados foram apresentados como mediana, intervalo interquartil (q25 e q75), valores mínimo e máximo. As diferenças entre os dois grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Diferenças para mais de dois grupos foram avaliadas por Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dun. As análises estatísticas foram calculadas usando GraphPad Prism 8.0.2 e um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo.

Capítulo 3 - Discussão Geral e Conclusões

Amplamente estudados, os processos de miogênese e regeneração da musculatura esquelética são complexos e requerem uma organizada série de etapas (LABARGE; BLAU, 2014; PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003). Na miogênese, alterações em genes que atuam nas etapas deste processo podem levar à uma formação incompleta e até mesmo, a não formação da musculatura esquelética (CHAL; POURQUIÉ, 2017). Alterações genéticas que causam quadros de distrofia muscular progressiva podem levar à um prejuízo neste processo, resultando em uma regeneração deficiente (SEALE *et al.*, 2004). Além disso, em casos de lesões crônicas na musculatura esquelética as falhas na regeneração podem levar à substituição das fibras musculares por tecido fibrótico e adiposo (EMERY, 2002; VAINZOF; ZATZ, 2003). Uma hipótese para a regeneração ineficiente da musculatura esquelética nas distrofias, era a de que o pool de células satélite se exauria com os sucessivos ciclos de degeneração e regeneração e o processo de regeneração era prejudicado (HESLOP; MORGAN; PARTRIDGE, 2000). Em nossos estudos recentes, demonstramos que o pool de células satélite é mantido em modelos murinos para distrofias musculares, até mesmo em modelos com severo comprometimento da musculatura esquelética. Além disso, demonstramos que estas células conseguem gerar novas fibras musculares, porém estas fibras permanecem pequenas e, provavelmente, não funcionais (RIBEIRO *et al.*, 2019b). Os resultados obtidos neste trabalho nos levaram a buscar qual seria a causa deste defeito na regeneração. Para tal, estudamos o processo de fusão dos mioblastos, que é complexo e demanda uma série de proteínas e que, no caso de haver alterações, pode acarretar prejuízo na formação de miotubos/fibras musculares. Visando investigar se de fato existe um defeito no processo de formação de miotubos, utilizamos modelos celulares de mioblastos imortalizados provindos de pacientes com DMD, comparando com

mioblastos de controles saudáveis. Os resultados mostraram que, no modelo *in vitro* utilizado, existe um prejuízo na formação de miotubos em DMD comparados com controles saudáveis. Os miotubos das linhagens DMD eram menores em área e contendo menos núcleos, sugerindo um defeito de fusão. Este dado embasou nossa busca por possíveis alterações na expressão de genes e proteínas relacionados ao processo de fusão, como MYMX, MYMK e COL25A1 (BI *et al.*, 2017, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2019; HERNÁNDEZ; PODBILEWICZ, 2017; MILLAY *et al.*, 2013). As proteínas MYMX e MYMK mostraram importante envolvimento com a diferenciação muscular em controles normais. Entretanto, o padrão de expressão de ambas foi similar nos DMD e nos controles. Com base nestes resultados, portanto, não pudemos confirmar que o processo de fusão em mioblastos está comprometido.

Por outro lado, a análise da expressão de MRFs se mostrou indicativa de que o processo de formação de miotubos está prejudicado, já que a análise de MYF5 e MYOD mostrou uma expressão diminuída nas células de DMD durante o processo de diferenciação muscular. Apesar de alguns fatores de transcrição possuírem funções redundantes, estes fatores atuam em etapas específicas do processo de regeneração. Como os fatores MYF5 e MYOD atuam nos estágios iniciais do processo de regeneração muscular, isso nos levou a olhar para etapas anteriores ao processo de fusão (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017). Uma etapa extremamente importante no processo de formação dos miotubos é a migração dos mioblastos para a região da lesão, possibilitando que ocorra a fusão. Duas proteínas importantes foram recentemente descritas com papel na formação de miotubos, PALMD e SHISA2, que atuam na dinâmica de membranas e na migração de mioblastos, respectivamente (NIE *et al.*, 2017; WROBLEWSKA *et al.*, 2016). A análise dos dados obtidos a partir da expressão gênica e proteica destes dois genes nas células de DMD e controles sugeriu que poderia ocorrer uma possível alteração no processo de migração de mioblastos. Isto porque os genes *SHISA2* e *PALMD* se mostraram menos expresso em alguns estágios do

processo de formação do miotubo nas células DMD, assim como a expressão proteica de SHISA2. Para investigar mais profundamente a migração, procedemos com a análise do ensaio de migração, que mede a capacidade de migração celular. Os dados gerados a partir deste estudo nos mostraram que a migração está de fato, comprometida em mioblastos de DMD, comparados com mioblastos normais. Amplamente estudada no contexto de terapias baseadas em transplante de células tronco e mioblastos, o processo de migração das células implantadas recebeu muito destaque por sua importância para a eficiência da terapia (CHOI; FERRARI; TEDESCO, 2020). Nas terapias em pacientes com distrofias, um grande desafio é a importante substituição das fibras musculares por tecido fibrótico, que impede com que a migração das células implantadas ocorra de forma efetiva. No entanto, analisando as células de pacientes com DMD, observamos um prejuízo na migração, que pode influenciar diretamente na ineficiente regeneração dos próprios pacientes.

Nossa conclusão é de que a deficiência no processo de migração dos mioblastos pode estar diretamente ligada a uma ineficiente regeneração em pacientes com DMD. Análises mais profundas do processo de migração de mioblastos distróficos devem ser realizadas a fim de entender esta importante etapa da regeneração e pode apontar para importantes alvos para terapias em distrofias musculares.

Resumo

RIBEIRO JÚNIOR, Antonio Fernando. **Estudo de proteínas envolvidas na diferenciação tardia do músculo esquelético e seu papel no processo distrófico**. 2023. 84f. Tese de Doutorado em Ciências (Biologia - Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O comprometimento do músculo esquelético nas distrofias musculares genéticas é marcadamente caracterizado por ciclos de degeneração e regeneração. A regeneração é muitas vezes ineficiente, levando a uma perda progressiva de massa muscular. Nossos estudos recentes com modelos de camundongos distróficos, no entanto, mostraram a manutenção de um processo regenerativo ativo nos músculos, com a presença de um pool significativo de células satélite com capacidade proliferativa mantida e formação de novas fibras musculares. Entretanto, essas fibras recém-formadas permanecem menores e com menos mionúcleos, compatíveis com um processo regenerativo defeituoso. Para entender melhor esse mecanismo comprometido, aqui estudamos a miogênese no músculo distrófico usando um modelo celular de mioblastos imortalizados de pacientes com DMD e controles saudáveis. Observamos a formação de miotubos defeituosos na DMD, com miotubos menores, mais finos e contendo menos mionúcleos. Analisamos alguns genes relacionados a processos-chave na formação de miotubos, avaliando tanto a expressão de mRNA quanto de proteínas. O estudo incluiu genes relacionados à fusão de membranas (myomaker, myomixer e colagen 25A1) à regulação do processo miogênico (MYF5, MYOD e MYOG) e à dinâmica de membranas e migração celular (palmdelphin e shisa2). O processo de migração *in vitro* dos mioblastos também foi estudado. Nossos achados sugerem que a ineficiente de formação de miotubos em células de DMD pode não estar relacionada às proteínas que atuam diretamente no processo de fusão celular, mas sim em etapas anteriores, como a migração, que está alterada

em DMD. Análises mais profundas do processo de migração de mioblastos distróficos devem ser realizadas a fim de entender esta importante etapa da regeneração e pode apontar para importantes alvos para terapias em distrofias musculares.

Palavras-chave: miogênese, distrofias musculares, regeneração muscular, fusão celular

Abstract

RIBEIRO JÚNIOR, Antonio Fernando. Study of proteins involved in late differentiation of skeletal muscle and their role in the dystrophic 2023. 84p. Ph.D. thesis in sciences (Biology- Genetics) – Biosciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Skeletal muscle impairment in genetic muscular dystrophies is markedly characterized by cycles of degeneration and regeneration. The regeneration is usually inefficient, leading to a progressive loss of muscle mass. Our recent studies with mice dystrophic models, however, have shown maintenance of an active regenerative process in the muscles, with the presence of a significant pool of satellite cells with proliferative capacity, and formation of new muscle fibers. Nonetheless, these newly formed fibers remain smaller and with fewer myonuclei, compatible with a defective regenerative process. To better understand this compromised mechanism, here we studied the myogenesis in the dystrophic muscle using a cellular model of immortalized myoblasts from DMD and normal controls. We observed a defective myotube formation in DMD, with the formation of smaller and thinner myotubes containing fewer myonuclei. We analyzed some genes that could be involved to key processes in myotube formation, evaluating both mRNA and protein expression. The study included genes related to membrane fusion (*myomaker*, *myomixer*, and *colagen 25A1*) and cellular migration (*palmdelphin* and *shisa2*). The myoblast migration process was also studied. Our findings suggest that more than an alteration in the proteins involved in the fusion of myoblasts, the migration capacity is compromised in DMD immortalized cells and possibly impairs efficient myotube formation. Additional analysis of the migration process of dystrophic myoblasts must be performed in order to understand this important stage of

regeneration and may point to important targets for therapies in muscular dystrophies.

Keywords: myogenesis, muscular dystrophies; muscle regeneration; cell fusion

Referências Bibliográficas

- ABMAYR, S. M.; PAVLATH, G. K. **Myoblast fusion: Lessons from flies and mice** *Development* 15 fev. 2012.
- ALMEIDA, C. F.; FERNANDES, S. A.; JUNIOR, A. F. R.; OKAMOTO, O. K.; VAINZOF, M. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155%2F2016%2F1078686>>.
- 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.
- BERKES, C. A.; TAPSCOTT, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 4–5, p. 585–595, 2005.
- BI, P.; MCANALLY, J. R.; SHELTON, J. M.; SÁNCHEZ-ORTIZ, E.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Fusogenic micropeptide Myomixer is essential for satellite cell fusion and muscle regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 15, p. 3864–3869, 2018.
- BI, P.; RAMIREZ-MARTINEZ, A.; LI, H.; CANNAVINO, J.; MCANALLY, J. R.; SHELTON, J. M.; SÁNCHEZ-ORTIZ, E.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. **Science**, v. 356, n. 6335, p. 323–327, 21 abr. 2017.
- BISCHOFF, R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. **Development**, v. 109, n. 4, p. 943–952, 1990.
- BISCHOFF, R.; HEINTZ, C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. **Developmental Dynamics**, v. 201, n. 1, p. 41–54, 1994.
- BUCKINGHAM, M. Skeletal muscle formation in vertebrates. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 11, n. 4, p. 440–448, 2001.
- BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCAN COURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: From somite to limb. **Journal of Anatomy**, v. 202, n. 1, p. 59–68, 2003.
- CAMPBELL, K. P.; KAHL, S. D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 259–262, 1989.
- CHAL, J.; POURQUIÉ, O. Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. **Development**

(Cambridge), v. 144, n. 12, p. 2104–2122, 2017.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. 2004. Disponível em: <www.prv.org>.

CHEN, B.; YOU, W.; WANG, Y.; SHAN, T. The regulatory role of Myomaker and Myomixer–Myomerger–Minion in muscle development and regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 0123456789, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03341-9>.

CHOI, S.; FERRARI, G.; TEDESCO, F. S. Cellular dynamics of myogenic cell migration: molecular mechanisms and implications for skeletal muscle cell therapies. **EMBO Molecular Medicine**, v. 12, n. 12, 7 dez. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emmm.202012357>.

CRISAFULLI, S.; SULTANA, J.; FONTANA, A.; SALVO, F.; MESSINA, S.; MESSINA, S.; TRIFIRÒ, G. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: An updated systematic review and meta-analysis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, 2020.

DEATO, M. D. E.; MARR, M. T.; SOTTERO, T.; INOUE, C.; HU, P.; TJIAN, R. MyoD Targets TAF3/TRF3 to Activate Myogenin Transcription. **Molecular Cell**, v. 32, n. 1, p. 96–105, 10 out. 2008.

DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; MALTZAHN, J. Von; PASUT, A.; BENTZINGER, F.; BRUN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Polarity and Asymmetric Division. v. 21, n. 12, p. 1455–1463, 2016.

DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. **Development (Cambridge)**, v. 142, n. 9, p. 1572–1581, 2015a.

DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. **Development (Cambridge)**, v. 142, n. 9, p. 1572–1581, 2015b.

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

ERVASTI, J. M.; OHLENDIECK, K.; KAHL, S. D.; GAVER, M. G.; CAMPBELL, K. P. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature**, v. 345, n. 6273, p. 315–319, 1990.

FEICHTINGER, R. G.; MUCHA, B. E.; HENGEL, H.; ORFI, Z.; MAKOWSKI, C.; DORT, J.; D'ANJOU, G.; NGUYEN, T. T. M.; BUCHERT, R.; JUENGER, H.; FREISINGER, P.; BAUMEISTER, S.; SCHOSER, B.; AHTING, U.; KEIMER, R.; NGUYEN, C. T. E.; FABRE, P.; GAUTHIER, J.; MIGUET, M.; LOPES, F.; ALHAKEEM, A.; ALHASHAM, A.; TABARKI, B.; KANDASWAMY, K. K.; BAUER, P.; STEINBACHER, P.; PROKISCH, H.; STURM, M.; STROM, T. M.; ELLEZAM, B.; MAYR, J. A.; SCHÖLS, L.; MICHAUD, J. L.; CAMPEAU, P. M.; HAACK, T.

B.; DUMONT, N. A. Biallelic variants in the transcription factor PAX7 are a new genetic cause of myopathy. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 11, p. 2521–2531, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41436-019-0532-z>>.

FERNÁNDEZ-COSTA, J. M.; FERNÁNDEZ-GARIBAY, X.; VELASCO-MALLORQUÍ, F.; RAMÓN-AZCÓN, J. Bioengineered in vitro skeletal muscles as new tools for muscular dystrophies preclinical studies. **Journal of Tissue Engineering**, v. 12, p. 10–12, 2021.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Behavior Genetics**, v. 45, n. 2, p. 183–195, 2015.

GONÇALVES, T. J. M.; BOUTILLON, F.; LEFEBVRE, S.; GOFFIN, V.; IWATSUBO, T.; WAKABAYASHI, T.; OURY, F.; ARMAND, A. S. Collagen XXV promotes myoblast fusion during myogenic differentiation and muscle formation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J.; DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A.; MOFARRAHI, M.; MCCLUNG, J. M.; KONTOS, C. D.; DAVIS, E. C.; MOROZ, N.; PICKETT, A. E.; HUCK, L.; HAREL, S.; DANIALOU, G.; HUSSAIN, S. N. A. *biology*. p. 534–551, 2001.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, E. G.; BRUN, C. E.; RUDNICKI, M. A. **The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration** *Seminars in Cell and Developmental Biology* Elsevier Ltd, 1 dez. 2017.

HERNÁNDEZ, J. M.; PODBILEWICZ, B. **The hallmarks of cell-cell fusion** *Development (Cambridge)* Company of Biologists Ltd, 15 dez. 2017.

HESLOP, L.; MORGAN, J. E.; PARTRIDGE, T. A. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 12, p. 2299–2308, 2000.

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. 919–928, 1987.

HU, B.; PETRASCH-PARWEZ, E.; LAUE, M. M.; KILIMANN, M. W. Molecular characterization and immunohistochemical localization of palmdelphin, a cytosolic isoform of the paralemmin protein family implicated in membrane dynamics. **European Journal of Cell Biology**, v. 84, n. 11, p. 853–866, 14 nov. 2005.

ISHIBA, R.; SANTOS, A. L. F.; ALMEIDA, C. F.; CAIRES, L. C.; RIBEIRO, A. F.; AYUB-GUERRIERI, D.; FERNANDES, S. A.; SOUZA, L. S.; VAINZOF, M. Faster regeneration associated to high expression of *Fam65b* and *Hdac6* in dysferlin-deficient mouse. **Journal of Molecular**

Histology, v. 50, n. 4, p. 375–387, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10735-019-09834-y>>.

KASSAR-DUCHOSSOY, L.; GIACONE, E.; GAYRAUD-MOREL, B.; JORY, A.; GOMÈS, D.; TAJBAKHSH, S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. **Genes and Development**, v. 19, n. 12, p. 1426–1431, 2005.

KUANG, S.; KURODA, K.; LE GRAND, F.; RUDNICKI, M. A. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 999–1010, 2007.

LABARGE, M. A.; BLAU, H. M. Skeletal Muscle Stem Cells. **Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition**, v. 7, p. 267–279, 2014.

LEHKA, L.; RĘDOWICZ, M. J. Mechanisms regulating myoblast fusion: A multilevel interplay. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 104, n. January, p. 81–92, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.004>>.

LIU, Q. C.; ZHA, X. H.; FARALLI, H.; YIN, H.; LOUIS-JEUNE, C.; PERDIGUERO, E.; PRANCKEVICIENE, E.; MUÑOZ-CÀNOVES, P.; RUDNICKI, M. A.; BRAND, M.; PEREZ-IRATXETA, C.; DILWORTH, F. J. Comparative expression profiling identifies differential roles for Myogenin and p38 α MAPK signaling in myogenesis. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 6, p. 386–397, 2012.

MAHDY, M. A. A. Skeletal muscle fibrosis: an overview. **Cell and Tissue Research**, v. 375, n. 3, p. 575–588, 2019.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 9, p. 493–495, 1961.

MILLAY, D. P.; O'ROURKE, J. R.; SUTHERLAND, L. B.; BEZPROZVANNAYA, S.; SHELTON, J. M.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. **Nature**, v. 499, n. 7458, p. 301–305, 2013.

MILLAY, D. P.; SUTHERLAND, L. B.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Myomaker is essential for muscle regeneration. **Genes and Development**, v. 28, n. 15, p. 1641–1646, 2014.

MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1–46, 2020.

NABESHLMA, Y.; HANAOKAT, K.; HAYASAKAT, M.; ESUML, E.; LI, S.; NONAKA, I.;

- NABESHIMA, Y. Myogenin gene disruption muscle defect. **Nature**, v. 364, n. August, p. 532–535, 1993.
- NIE, Y.; CHEN, H.; GUO, C.; YUAN, Z.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; MO, D.; CHEN, Y. Palmdelphin promotes myoblast differentiation and muscle regeneration. **Scientific Reports**, v. 7, 2 fev. 2017.
- OLSON, E. N. MyoD family: a paradigm for development? **Genes and Development**, v. 4, n. 9, p. 1454–1461, 1990.
- OTT, M. O.; BOBER, E.; LYONS, G.; ARNOLD, H.; BUCKINGHAM, M. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. **Development**, v. 111, n. 4, p. 1097–1107, 1991.
- PARKER, M. H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 7, p. 497–507, 2003.
- PEI, J.; GRISHIN, N. V. Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 3, p. 758–769, 2012.
- PETRANY, M. J.; MILLAY, D. P. Cell Fusion: Merging Membranes and Making Muscle. **Trends in Cell Biology**, v. 29, n. 12, p. 964–973, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.09.002>>.
- PETRANY, M. J.; SONG, T.; SADAYAPPAN, S.; MILLAY, D. P. Myocyte-derived Myomaker expression is required for regenerative fusion but exacerbates membrane instability in dystrophic myofibers. **JCI Insight**, v. 5, n. 9, 2020.
- PROSKOROVSKI-OHAYON, R.; KADIR, R.; MICHALOWSKI, A.; FLUSSER, H.; PEREZ, Y.; HERSHKOVITZ, E.; SIVAN, S.; BIRK, O. S. PAX7 mutation in a syndrome of failure to thrive, hypotonia, and global neurodevelopmental delay. **Human Mutation**, v. 38, n. 12, p. 1671–1683, 2017.
- QUINN, M. E.; GOH, Q.; KUROSAKA, M.; GAMAGE, D. G.; PETRANY, M. J.; PRASAD, V.; MILLAY, D. P. Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15665>>.
- RAMIREZ-MARTINEZ, A.; ZHANG, Y.; VAN DEN BOOGAARD, M. J.; MCANALLY, J. R.; RODRIGUEZ-CAYCEDO, C.; CHAI, A. C.; CHEMELLO, F.; MASSINK, M. P. G.; CUPPEN, I.; ELFERINK, M. G.; VAN ES, R. J. J.; JANSSEN, N. G.; WALRAVEN-VAN OIJEN, L. P. A. M.; LIU,

N.; BASSEL-DUBY, R.; VAN JAARSVELD, R. H.; OLSON, E. N. Impaired activity of the fusogenic micropeptide Myomixer causes myopathy resembling Carey-Fineman-Ziter syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 11, 2022.

RAWLS, A.; MORRIS, J. H.; RUDNICKI, M.; BRAUN, T.; ARNOLD, H. H.; KLEIN, W. H.; OLSON, E. N. Myogenin's Functions Do Not Overlap with Those of MyoD or Myf-5 during Mouse Embryogenesis. **Developmental Biology**, v. 172, n. 1, p. 37–50, 1 nov. 1995.

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

RIBEIRO, A. F.; SOUZA, L. S.; ALMEIDA, C. F.; ISHIBA, R.; FERNANDES, S. A.; GUERRIERI, D. A.; SANTOS, A. L. F.; ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G.; VAINZOF, M. Muscle satellite cells and impaired late stage regeneration in different murine models for muscular dystrophies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48156-7>>.

RIBEIRO, A. F.; SOUZA, L. S.; ALMEIDA, C. F.; ISHIBA, R.; FERNANDES, S. A.; GUERRIERI, D. A.; SANTOS, A. L. F.; ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G.; VAINZOF, M. Muscle satellite cells and impaired late stage regeneration in different murine models for muscular dystrophies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11842, 2019b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-48156-7>>.

RUDNICKI, M. A.; BRAUN, T.; HINUMA, S.; JAENISCH, R. 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, n. 3, p. 383–390, 1992.

RUDNICKI, M. A.; SCHNEGELSBERG, P. N. J.; STEAD, R. H.; BRAUN, T.; ARNOLD, H. H.; JAENISCH, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1351–1359, 1993.

SAMPATH, S. C.; SAMPATH, S. C.; MILLAY, D. P. **Myoblast fusion confusion: The resolution begins** *Skeletal Muscle* BioMed Central Ltd., 31 jan. 2018.

SEALE, P.; ISHIBASHI, J.; SCIMÈ, A.; RUDNICKI, M. A. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45⁺:Sca1⁺ stem cells from injured muscle. **PLoS Biology**, v. 2, n. 5, 2004.

SHI, J.; BI, P.; PEI, J.; LI, H.; GRISHIN, N. V.; BASSEL-DUBY, R.; CHEN, E. H.; OLSON, E. N. Requirement of the fusogenic micropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 45, p. 11950–11955, 7 nov. 2017.

SHINWARI, J. M. A.; KHAN, A.; AWAD, S.; SHINWARI, Z.; ALAIYA, A.; ALANAZI, M.; TAHIR, A.; POIZAT, C.; AL TASSAN, N. Recessive mutations in COL25A1 are a cause of congenital cranial dysinnervation disorder. **American Journal of Human Genetics**, v. 96, n. 1, p. 147–152, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.006>>.

SOLEIMANI, V. D.; PUNCH, V. G.; KAWABE, Y. ichi; JONES, A. E.; PALIDWOR, G. A.; PORTER, C. J.; CROSS, J. W.; CARVAJAL, J. J.; KOCKX, C. E. M.; VAN IJCKEN, W. F. J.; PERKINS, T. J.; RIGBY, P. W. J.; GROSVELD, F.; RUDNICKI, M. A. Transcriptional Dominance of Pax7 in Adult Myogenesis Is Due to High-Affinity Recognition of Homeodomain Motifs. **Developmental Cell**, v. 22, n. 6, p. 1208–1220, 12 jun. 2012.

TAJBAKHSI, S.; BORELLO, U.; VIVARELLI, E.; KELLY, R.; PAPKOFF, J.; DUPREZ, D.; BUCKINGHAM, M.; COSSU, G. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. **Development**, v. 125, n. 21, p. 4155–4162, 1998.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 543–555, 2003.

VENUTI, J. M.; MORRIS, J. H.; VIVIAN, J. L.; OLSON, E. N.; KLEIN, W. H. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. **Journal of Cell Biology**, v. 128, n. 4, p. 563–576, 1995.

WROBLEWSKA, L.; KITADA, T.; ENDO, K.; SICILIANO, V.; STILLO, B.; SAITO, H.; WEISS, R. Shisa2 regulates the fusion of muscle progenitors Zuojun. v. 33, n. 8, p. 839–841, 2016.

YAO, J.; FETTER, R. D.; HU, P.; BETZIG, E.; TJIAN, R. Subnuclear segregation of genes and core promoter factors in myogenesis. **Genes and Development**, v. 25, n. 6, p. 569–580, 2011.

ZAMMIT, P. S. **Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis** *Seminars in Cell and Developmental Biology* Elsevier Ltd, 1 dez. 2017.

ZHANG, H.; WEN, J.; BIGOT, A.; CHEN, J.; SHANG, R.; MOULY, V.; BI, P. Human myotube formation is determined by MyoD–Myomixer/Myomaker axis. **Science Advances**, v. 6, n. 51, p. 1–14, 2020.

ZHANG, Q.; VASHISHT, A. A.; O’ROURKE, J.; CORBEL, S. Y.; MORAN, R.; ROMERO, A.; MIRAGLIA, L.; ZHANG, J.; DURRANT, E.; SCHMEDT, C.; SAMPATH, S. C.; SAMPATH, S. C. The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. **Nature Communications**, v. 8, 2017.