

**JOÃO GUILHERME DE OLIVEIRA SILVESTRE**

**Papel do MuRF1 e MuRF2 Sobre Aspectos Estruturais e Funcionais de  
Mioblastos e Fibroblastos Musculares Esqueléticos**

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

Área de concentração: Ciências morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD);

São Paulo  
2016

## RESUMO

Silvestre JGO. Papel do MuRF1 e MuRF2 sobre aspectos estruturais e funcionais de mioblastos e fibroblastos musculares esqueléticos. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

No início dos anos 2000 surgiram os primeiros estudos descrevendo as proteínas MuRF1 e MuRF2, mostrando seus importantes papéis na estabilidade de proteínas da estrutura muscular, como por exemplo, a Titina, em microtúbulos estáveis e em filamentos intermediários, além de desempenharem a função de E3 ligase contribuindo para ubiquitinação de proteínas que devem ser degradadas. Nesse trabalho, nosso objetivo foi verificar o papel de MuRF1 e MuRF2 na diferenciação de células com potencial miogênico, além de caracterizar seu possível papel em uma população celular presente no nicho miogênico, os fibroblastos. Para isso utilizamos inicialmente, animais duplo nocautes para MuRF1 e MuRF2 (dKO MuRF1/2) e verificamos, através de análises histológicas, o processo de regeneração 28 dias após a injeção de cardiotoxina (CTX) no tibial anterior. Posteriormente, através de análises *in vitro*, realizamos o silenciamento de MuRF1 e MuRF2 utilizando RNAs de interferência e verificamos a capacidade de diferenciação de células miogênicas. Nossos resultados sugerem um importante papel de MuRF1 e MuRF2 na regeneração, visto que os animais dKO MuRF1/2 apresentaram coloração e marcação positiva para marcadores adipogênicos, 28 dias após a CTX. Além disso, as análises *in vitro* sugerem que MuRF1 e MuRF2 sejam importantes na determinação do destino de diferenciação de células com potencial miogênico, onde o silenciamento com RNAs causou uma queda na formação de miotubos e um aumento em marcadores adipogênicos. Posteriormente, após identificarmos essas E3 ligases em fibroblastos provenientes de cultura muscular esquelética, o silenciamento genético de MuRF1 e MuRF2 prejudicou o processo de migração de fibroblastos em ensaio de fechamento de ferida. Esses resultados realçam a importância de MuRF1 e MuRF2 na diferenciação miogênica além de sugerir um importante papel para a formação correta do citoesqueleto durante a migração celular.

**Palavras-chave:** Músculo Esquelético. E3 ligases. Mioblastos.

Fibroblastos.

## ABSTRACT

Silvestre JGO. Role of MuRF1 and MuRF2 on functional and structural aspects of myoblasts and fibroblasts skeletal muscle cells. [Ph.D thesis (Science Morphofunctional)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The muscle specific RING finger (MuRF) family has been proposed to perform as a linker for myofibril machinery, including titin with microtubules, intermediate filaments and also by acting as an Atroгене during muscle wasting. In the present study our aim was to verify the role of MuRF1 and MuRF2 during the myogenic differentiation of skeletal muscle and its role on skeletal muscle fibroblasts. Initially, we used MuRF1 and MuRF2 double knockout mice (dKO MuRF1/2) and submitted then to cardiotoxin injection (CTX). After that, we analyzed the regenerative process through histological procedure. Next, using *in vitro* analyzes, we silenced MuRF1 and MuRF2 expression by siRNA and seeking for myogenic differentiation capacity. Our results suggest that dKO MuRF1/2 caused an important impairment on skeletal muscle regeneration, because 28 days after CTX the skeletal muscle showed positive staining to white adipocytes. Moreover, siRNA on myogenic primary cultures showed that MuRF1 and MuRF2 play an important role in determining the fate decision between adipogenic and myogenic differentiation. The silencing using MuRF1 and MuRF2 siRNA impaired myotube formation and increase the expression of adipogenic markers. Another interesting finding was that skeletal muscle fibroblasts can express MuRF1 and MuRF2, and its silencing by siRNA impairs the migration capacity of fibroblasts. These results demonstrate the importance of MuRF1 and MuRF2 during myogenic differentiation of skeletal muscle and an important role at intracellular coordination of stress fiber formation of skeletal muscle fibroblasts.

**Keywords:** Skeletal Muscle. E3 ligases. Myoblasts. Fibroblasts.

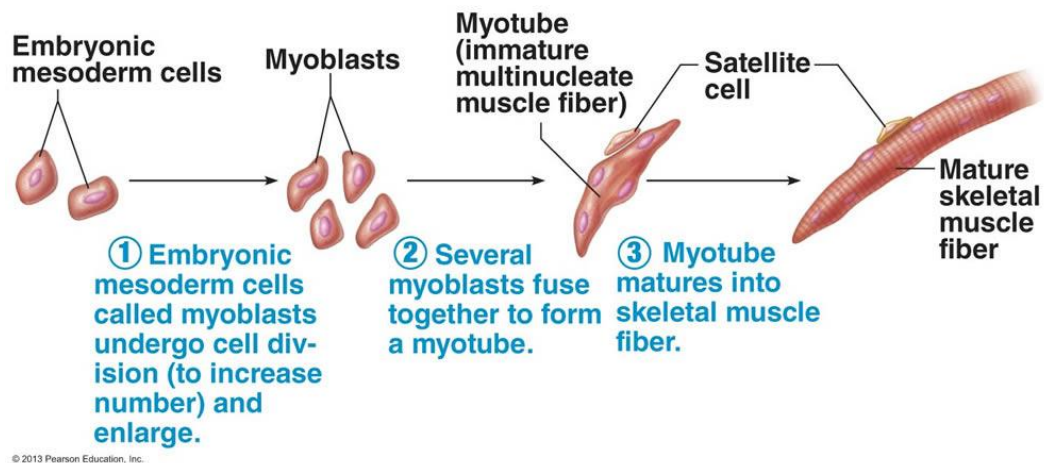
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Células satélite e o músculo esquelético.

O músculo esquelético é o tecido de maior abundância entre os vertebrados. O seu desenvolvimento acontece em estágios sobrepostos(1). Atualmente é bem descrita a origem da maior parte dos músculos esqueléticos, originados a partir de progenitores presentes nos somitos(1, 2).

São conhecidas duas fases na formação do tecido muscular esquelético durante o desenvolvimento embrionário, sendo a primeira fase, denominada fase proliferativa, e que tem como característica a multiplicação dos mioblastos, que são células precursoras musculares, através de divisão mitótica(3) (Fig. 1). Nessa fase, a maioria das células expressam Pax7, sendo caracterizadas como células ativas e em fase de proliferação(4). A segunda fase, chamada de diferenciação, ocorre quando os mioblastos fundem-se em pequenas células multinucleadas conhecidas como miotubos primários. Nesse estágio, grande parte das células aumentam a expressão de MyoD, onde é possível encontrar também células expressando somente MyoD ou em conjunto com Miogenina(4). Então, ocorre um aumento no comprimento dos miotubos pela fusão de mais mioblastos em sua porção final, gerando os chamados miotubos secundários(3) onde podem ser identificadas menos células que expressam somente MyoD e são encontradas mais células expressando Miogenina em conjunto com MyoD, ou somente Miogenina. Além disso, nessa fase ainda existem células que expressam Pax7 (aproximadamente 20%), tendo como características a não expressão de Miogenina e MyoD, caracterizando essas

células positivas para Pax7 em um estado quiescente(4). Posteriormente, os miotubos secundários começam a se maturar com os núcleos sendo forçados para a periferia à medida que o interior da fibra vai sendo preenchido com as proteínas contráteis, dando origem a fibra muscular madura(3) (Fig. 1).



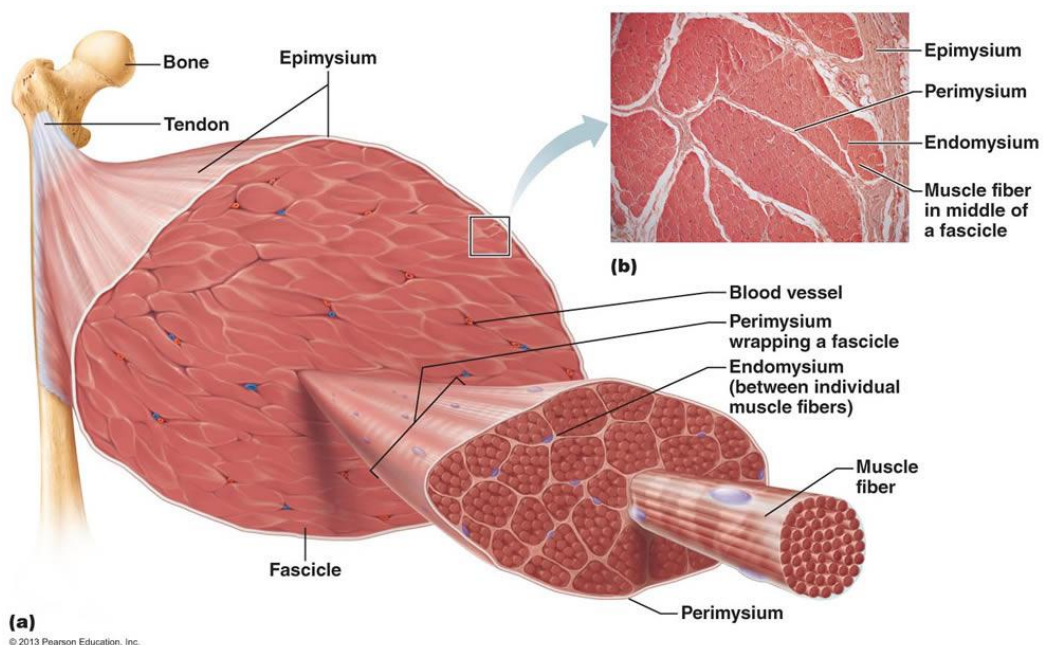
**Figura 1 - Fases do desenvolvimento de células miogênicas. Ilustração indicando as 4 fases compostas da fase proliferativa, fase de diferenciação em miotubos primários, miotubos secundários e célula muscular madura.**

Fonte: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap09/lecture1.html> (5)

O tecido muscular adulto é composto então por células alongadas e multinucleadas, com 10 a 100 micrômetros de diâmetro, podendo alcançar vários centímetros de comprimento. Estas células possuem núcleos localizados na periferia, junto à membrana plasmática. Seu citoplasma é preenchido por filamentos proteicos dispostos longitudinalmente, chamados de Miofibrilas. As miofibrilas são formadas principalmente por proteínas denominadas actina e miosina, sendo essas proteínas que conferem capacidade contrátil ao músculo esquelético(3, 6) (Fig. 2).

Quando visto ao microscópio óptico, o tecido muscular esquelético apresenta estriações transversais, com alternância de faixas claras e escuras.

Essa característica foi usada pra nomear a banda A (escura ou anisotrópica) e a banda I (clara ou isotrópica). No centro da banda I é possível encontrar uma faixa transversal chamada de linha Z e no centro da banda A é possível encontrar a linha M, circundada pela banda H. Essas estriações aparecem pelo fato de existir a repetição de unidades iguais, denominadas Sarcômeros(6). Os sarcômeros são conhecidos como a unidade funcional do músculo, sendo que vários sarcômeros conectados em série formam grandes miofibrilas(7) (Fig. 3).



**Figura 2 - Tecido Muscular Adulto. Ilustração de um tecido muscular adulto destacando as fibras musculares compostas por núcleos localizados na periferia e recoberta por diferentes camadas de tecido conjuntivo.**

Fonte: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap09/lecture1.html>(5)

No microscópio eletrônico é possível notar a presença de filamentos finos de Actina e grossos de Miosina. Estes filamentos são dispostos longitudinalmente nas miofibrilas, organizados de uma forma simétrica e paralela. A partir da linha Z, partem os filamentos de Actina até a borda externa da banda H. Já os filamentos de Miosina ocupam a região central do

sarcômero. Dessa forma, a banda I é composta somente por filamentos de actina, a banda A é composta por actina e miosina e a banda H, somente por filamentos de Miosina. A cabeça da Miosina se liga no filamento de Actina, tracionando-o em direção à linha M, no centro do sarcômero, produzindo força ativa com o encurtamento do sarcômero(8).

A manutenção da estrutura de filamentos proteicos é feita por algumas proteínas essenciais como a Titina. A Titina é uma grande proteína intrasarcomérica (2500 kDa) que abrange o sistema miofibrilar. Sua região N-terminal está integrada na linha Z, enquanto a região C-terminal está localizada na linha M. Essa proteína tem como característica principal formar uma rede elástica que ancora os filamentos de miosina das linhas Z e possui porções semelhantes a molas que se encontram adjacentes aos filamentos de actina, ajudando a estabilizar o filamento de miosina, sendo essa característica que impede o alongamento excessivo do sarcômero(9). Além disso, a Titina se associa a numerosas moléculas, entre elas as proteínas *Muscle RING Finger* (MuRFs)(10, 11).

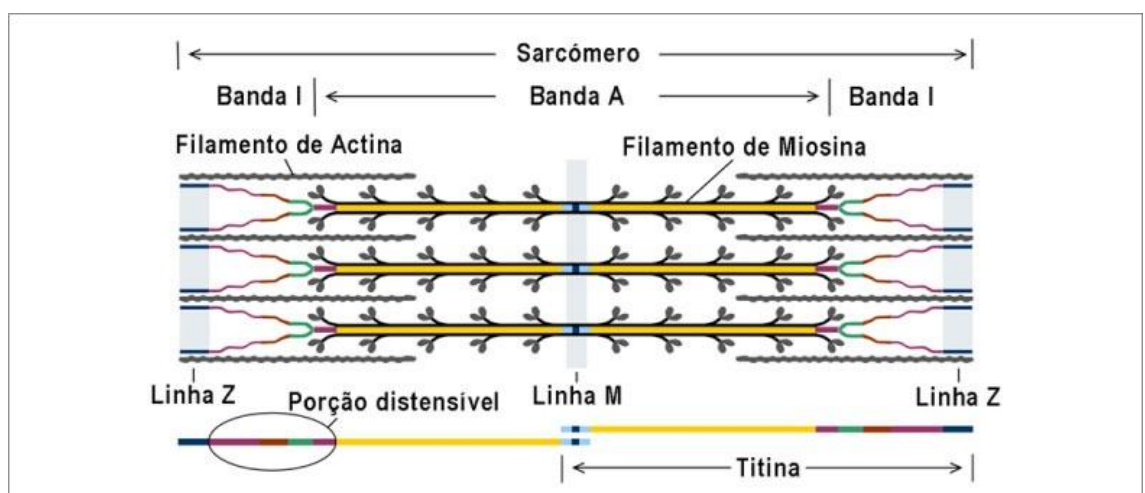


Figura 3 - Sarcômero. Ilustração esquematizando o Sarcômero, as Bandas I e A, a Linha M e Z e a proteína sarcomérica Titina. Fonte: (12).

Outra proteína que participa da estrutura muscular e deve ser destacada é a Miomesina. Essa proteína é de extrema importância para a manutenção da rede que ancora as miofibrilas, pois ela se utiliza de alfa-hélices como elastômeros que permitem o músculo ser elástico e extensível(13).

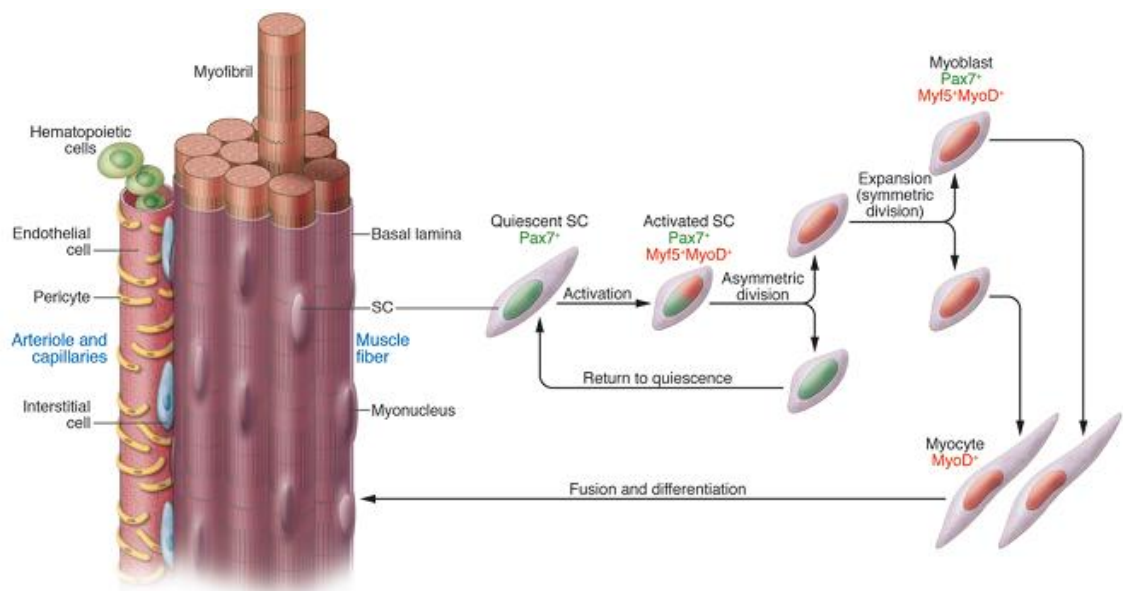
Dentre as principais características do músculo esquelético adulto está a sua capacidade adaptativa, o que inclui sua capacidade de regeneração e alteração de massa frente alterações na demanda mecânica, podendo ocasionar atrofia ou hipertrofia do tecido. Essa alta plasticidade é possível graças a uma população de células conhecida como células satélite(14-17).

Em 1961, Mauro descreveu as células satélites como células mononucleares, que são encontradas entre a lâmina basal e a membrana plasmática das fibras musculares multinucleadas (14). Posteriormente, essas células foram caracterizadas pelo seu estado quiescente(18) (Fig. 4). Por outro lado, após alguns estímulos, como lesão no tecido muscular, elas são ativadas e iniciam a entrada no ciclo celular após a indução de alguns fatores como óxido nítrico(19), e o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ )(20). Após a ativação, a via p38 $\alpha$ /Proteínas quinases ativadas por mitógenos beta ( $\beta$ MAPK) é estimulada, permitindo a indução da expressão de Pax7 e MyoD, que inicia a proliferação das células satélites(18, 21). Posteriormente, ocorre uma diminuição na expressão de Pax7 e MyoD, com aumento na expressão de Miogenina(4)(Fig. 4).

Além disso, mais recentemente, estudos têm mostrado que outros tipos celulares, como células tronco(15) e pericitos(22), são também capazes de diferenciar-se em tecido muscular. Por exemplo, células denominadas como *Side Population* (SP), caracterizadas pela expressão de Sca1(23), são



conhecidas pela sua capacidade progenitora, sendo encontradas em tecidos adultos como músculo esquelético e medula óssea. Após a lesão, essas células se proliferam participando do processo regenerativo do músculo esquelético(24). Já os Pericitos, conhecidos como progenitores associados a vasos e que apresentam potencial miogênico, são encontrados intimamente associado a vasculatura da fibra muscular e apresentam marcação positiva para CD44(25). Estudos tem mostrado sua ativação e participação do processo regenerativo de células musculares (25, 26). No entanto, essas subpopulações podem contribuir também com a revascularização do tecido(27), com a formação de fibrose (28, 29), bem como para o aparecimento células ectópicas durante o processo de regeneração, como por exemplo o surgimento de células com fenótipo adipogênico (26),



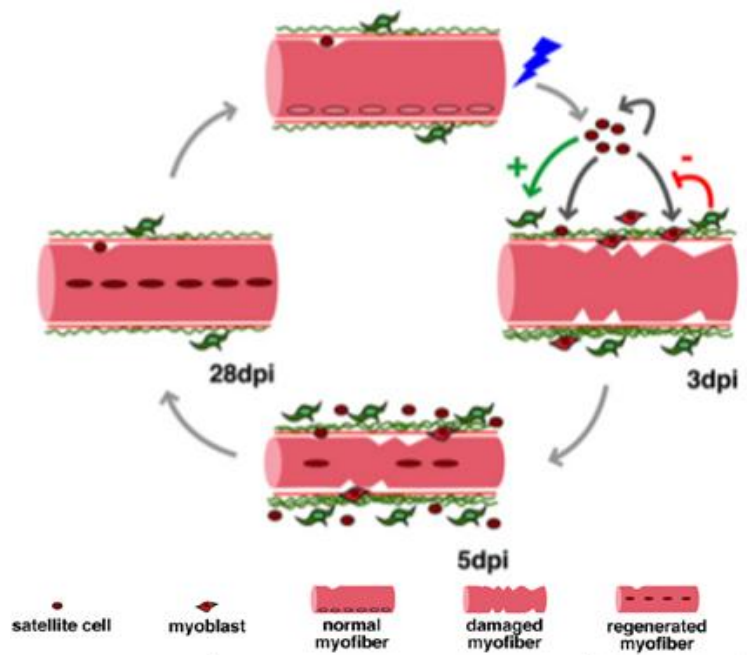
**Figura 4 - Populações celulares no tecido muscular. Ilustração indicando diferentes tipos de células encontradas no tecido muscular. Fonte: (30).**

## 1.2 Fibroblastos.

A regeneração do tecido muscular esquelético é caracterizada como um processo complexo, envolvendo a ativação de um grande número de respostas intracelulares(31, 32). Como dito anteriormente, a literatura tem mostrado que a regeneração depende da atividade das células satélites, reparando o tecido após processos de injúria, recuperando sua função (Fig. 5). Entretanto, as células denominadas como Fibroblastos também desempenham um papel importante, visto que são responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular (MEC). Essa matriz atua como um esqueleto para as células musculares, além de transmitir força de tracionamento e garantem proteção contra traumas mecânicos. Nesse sentido, Davis e colaboradores(33) mostraram recentemente que a completa regeneração é dependente do remodelamento/composição da MEC. Por outro lado, o excesso de MEC é capaz de prejudicar a função muscular e atrapalhar a regeneração do músculo esquelético(3, 34).

Os Fibroblastos são classificados como as células mais importantes do tecido conjuntivo, tendo como principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo(6), sendo responsáveis pela produção de colágeno, fibras elásticas e reticulares(9, 35), fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases responsáveis pela limpeza e remodelamento da célula(36). Durante o crescimento ativo, como em reparo de feridas, o material da matriz extracelular é produzido e para isso os fibroblastos entram em um estado ativo onde seu citoplasma fica mais extenso. Outra característica importante dos fibroblastos é a migração, onde as células exercem forças tracionais sobre a matriz

extracelular(37). A partir da influência de alguns fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1), os fibroblastos se diferenciam em Miofibroblastos. Além disso, TGF- $\beta$ 1 induz a expressão da  $\alpha$ -actina (actina de músculo liso) em Miofibroblastos(9).



**Figura 5 - Fibroblastos e a regeneração muscular. Ilustração representando o processo de regeneração do tecido muscular e a importância de fibroblastos durante esse processo.**Fonte: (32).

O miofibroblasto também é uma célula do tecido conjuntivo, tendo como característica a presença de feixes de filamentos de actina com proteínas motoras da actina associadas à miosina do tipo não muscular. Esses feixes atravessam o citoplasma da célula, terminando no lado oposto da membrana plasmática. Então, elas se fixam formando uma junção de ancoragem entre a célula e a membrana extracelular, semelhante a um ponto de adesão focal, encontrado em células epiteliais, permitindo a contração dos feixes de actina(9).

A migração é um processo vital em diferentes situações, como por exemplo, durante a embriogênese, durante o fechamento de ferida, em

respostas imunes e no desenvolvimento de tecidos(38-40). O processo de migração pode ser entendido como um processo repetitivo de múltiplos passos. Inicia-se quando ocorre a formação de pólos espaciais na célula e, então, a extensão de protrusões em sua membrana na direção do movimento. Essas novas protrusões se estabilizam por meio de fortes adesões ao substrato próximo a célula, e iniciam mecanismos de contrações que geram movimento. Além disso, promovem a retração da parte posterior da célula, permitindo assim seu movimento(38-40). Cada passo desse processo passa diretamente pela montagem, desmontagem e reorganização dos filamentos de actina, que são mediados por membros das famílias de GTPases Rho(41, 42).

Ainda nesse sentido, trabalhos recentes mostram a importância do correto arranjo do citoesqueleto para a migração de fibroblastos. Rahman e colaboradores(43) demonstraram a importância da fosforilação de Akt para a formação dos filamentos de actina na borda de fibroblastos em processo de migração. Em 2013, Veland e colaboradores demonstram também a importância da via Wnt no controle da organização do citoesqueleto(44).

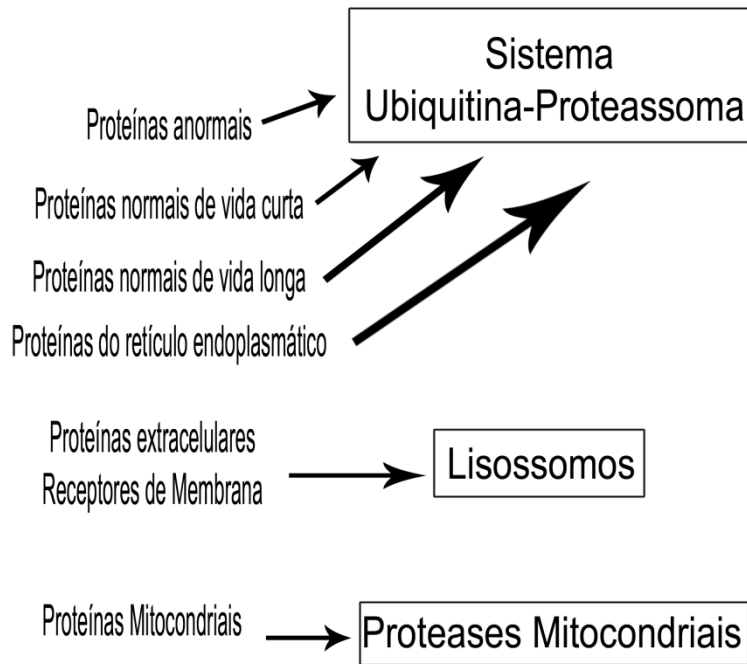
Atualmente, poucos estudos têm focado em vias catabólicas, como por exemplo, no sistema Ubiquitina Proteassoma, e suas implicações nas atividades funcionais de fibroblastos(45-47), tornando, portanto, as vias catabólicas promissores candidatos ao controle das atividades funcionais de fibroblastos.

### 1.3 O Processo de atrofia do músculo esquelético.

Como dito anteriormente, o músculo esquelético é a estrutura geradora de força do corpo, sendo invariavelmente desafiada por diferentes tipos de estresse, como calor, estresse oxidativo e o estresse mecânico(48). Além disso, o processo de reparo e regeneração do tecido muscular esquelético passa diretamente pela diferenciação das células citadas acima, conhecidas como células satélites (14-17). Dessa forma, para que ocorra o correto remodelamento do tecido, é necessário que ocorra a destruição e a síntese das proteínas que compõe o tecido a ser regenerado(48).

O "*turnover*" de proteínas é um processo de fundamental importância, onde todas as proteínas intracelulares e muitas proteínas extracelulares devem ser hidrolisadas para os aminoácidos que as constituem e, posteriormente, substituídas através da síntese de proteínas(49).

As células dos mamíferos possuem alguns sistemas proteolíticos responsáveis pelo processo de degradação, além de utilizarem diversos mecanismos regulatórios que garantem a alta seletividade da proteólise, prevenindo a quebra excessiva dos constituintes celulares(49) (Fig. 6).



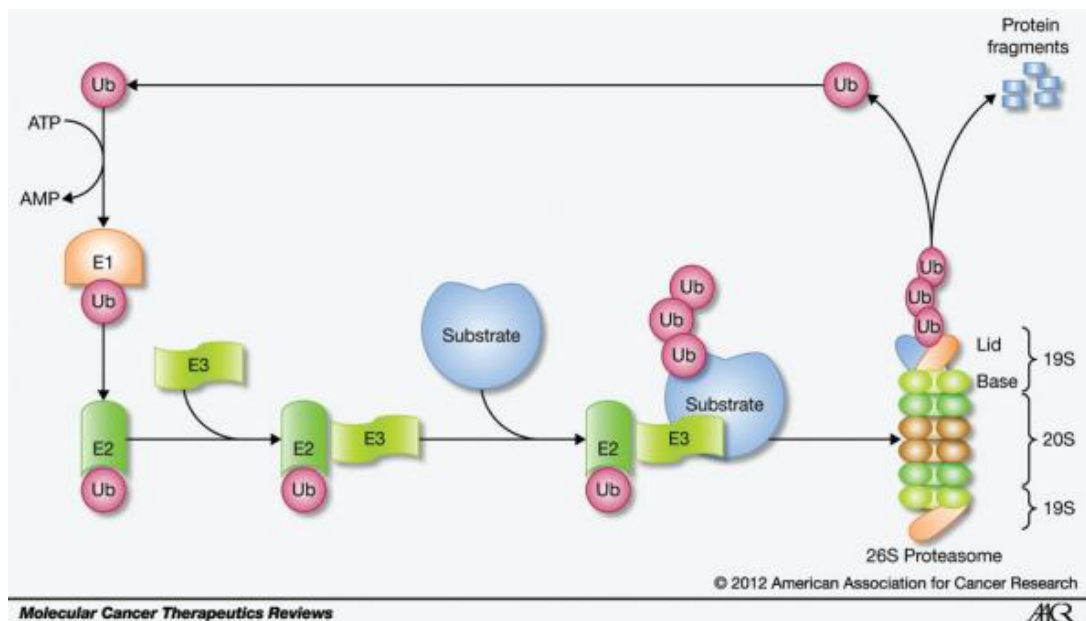
**Figura 6 - Substratos das diferentes vias proteolíticas em células de mamíferos. Adaptado de (49).**

A degradação de proteínas musculares esqueléticas pode ocorrer através de diferentes formas. Aqui serão destacadas duas das principais vias proteolíticas: O sistema proteolítico lisossomal e o sistema ubiquitina-proteassoma(50).

O sistema proteolítico lisossomal é muito estudado por estar presente em praticamente todas as células do corpo (48), sendo conhecido pelas proteases intralisossomais (as catepsinas B, C, D, H, L entre outras), que possuem o papel de degradar proteínas exógenas endocitadas, proteínas de membrana e glicoproteínas(49, 51).

A via proteolítica proteassomal, é muito bem conhecida por participar de forma importante no processo atrofico, atuando diretamente na fibra muscular(52). Todas as proteínas que precisam ser degradadas pelo proteassoma precisam ser inicialmente ligadas covalentemente a um peptídeo

de 76 aminoácidos chamado ubiquitina (Ub). Essa ubiquitinação ocorre em etapas envolvendo 3 enzimas: E1 (enzimas ativadoras da ubiquitina), E2 (enzimas carreadoras da ubiquitina ativada) e E3 (ubiquitina-ligases). As E3 são responsáveis pela especificidade da ubiquitinação, reconhecendo determinado substrato e transferindo o conjugado ubiquitina para resíduos de lisina na proteína alvo. A proteína marcada é então degradada no complexo 26S do proteassoma(53) (Fig. 7).



**Figura 7 - Sistema Ubiquitina Proteassoma.** Esquema ilustrando os componentes do sistema Ubiquitina Proteassoma. Fonte: (54).

#### 1.4 As E3 ligases MuRF1 e MuRF2.

No início dos anos 2000, foram descobertas novas E3 ligases com expressão restrita ao tecido muscular. Essas E3 ligases foram descritas inicialmente como MuRFs(55) sendo posteriormente classificadas em MuRF1(10, 11), MuRF2(11, 56, 57) e MuRF3(11). Nesse sentido, MuRF1 foi caracterizada como importante para estabilização da proteína presente na linha M, a Titina(10, 11), além de ter sua expressão aumentada durante processos

atróficos(58). Em relação ao MuRF2, os estudos sugerem sua ligação com microtubulos estáveis e também com proteínas na região da linha M(11, 56, 57), além de participar do processo atrófico como E3 ligases e sendo necessários, por exemplo, para formação de auto-fagossomos(59). Outro dado importante descrito inicialmente é que o silenciamento da expressão de MuRF1 e MuRF2 perturba a estrutura dos microtúbulos e de filamentos intermediários prejudicando assim a diferenciação muscular, atrasando, por exemplo, a fusão e a miofibrilogênese(56, 57). Além disso, foi descrito que MuRF1(60) e MuRF2(57) estão presentes no núcleo celular, indicando possíveis funções além da manutenção da estabilidade e da atividade como E3 ligase.

Dados não publicados de outro estudo em andamento do nosso grupo mostram que camundongos duplo *Knock out* para MuRF1 e MuRF2 (dKO-MuRF1/2) possuem capacidade regenerativa muscular esquelética extremamente deficiente, com comprometimento de células miogênicas, indicando que MuRFs podem ter um importante papel em proliferação e diferenciação celular. Além disso, nesse outro estudo foi observado que músculos em regeneração de camundongos dKO-MuRF1/2 possuem aspectos histológicos semelhantes a adipócitos brancos, levantando a possibilidade de MuRFs desempenharem um papel importante na diferenciação miogênica.

### 1.5 Objetivos.

1) O primeiro objetivo deste trabalho foi identificar o papel de MuRF1 e MuRF2 durante o processo de diferenciação de células miogênicas.



2) O segundo objetivo foi determinar a função dessas E3 ligases em Fibroblastos de músculos esqueléticos.

## 2. CONCLUSÕES

### 2.1 papel do MuRF1 e MuRF2 na diferenciação miogênica.

Juntos, esses resultados sugerem que as E3 ligases MuRF1 e MuRF2 possuem um papel fundamental durante a diferenciação de mioblastos em miotubos, e o silenciamento pode alterar o destino de diferenciação dessas células, favorecendo uma diferenciação adipogênica através do aumento de pericitos.

### 2.2 Expressão de MuRF1 e MuRF2 em fibroblastos

Nossos resultados sugerem fortemente que, assim como em mioblastos, a E3 ligase MuRF2 possui um papel importante na manutenção/polimerização dos filamentos responsáveis pela migração celular em fibroblastos de músculo esquelético, enquanto que a E3 ligase MuRF1 parece não ser crucial para o processo de migração.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Biressi S, Molinaro M, Cossu G. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol.* 2007;308(2):281-93.
2. Sieiro-Mosti D, De La Celle M, Pele M, Marcelle C. A dynamic analysis of muscle fusion in the chick embryo. *Development.* 2014;141(18):3605-11.
3. Lieber RL. *Skeletal Muscle - Structure, Function and Plasticity.* Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins; 2002. 336 p.
4. Juhas M, Engelmayr GC, Jr., Fontanella AN, Palmer GM, Bursac N. Biomimetic engineered muscle with capacity for vascular integration and functional maturation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(15):5508-13.
5. Carter P. 2016 [Available from: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap09/lecture1.html>].
6. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.; 2004. 540 p.
7. Mansson A, Rassier D, Tsiavaliaris G. Poorly Understood Aspects of Striated Muscle Contraction. *Biomed Res Int.* 2015;2015:245154.
8. Schappacher-Tilp G, Leonard T, Desch G, Herzog W. A novel three-filament model of force generation in eccentric contraction of skeletal muscles. *PLoS One.* 2015;10(3):e0117634.
9. Ross MH, Pawlina W. *Histologia Texto e Atlas.* 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.; 2012. 987 p.
10. Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol.* 2001;306(4):717-26.
11. Gregorio CC, Perry CN, McElhinny AS. Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2005;26(6-8):389-400.
12. Castro-Ferreira R, Fontes-Carvalho R, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Papel da titina na modulação da função cardíaca e suas implicações fisiopatológicas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2011;96:332-9.

---

<sup>1</sup>De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

13. Xiao S, Grater F. Molecular basis of the mechanical hierarchy in myomesin dimers for sarcomere integrity. *Biophys J*. 2014;107(4):965-73.
14. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9:493-5.
15. Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat*. 2009;215(5):477-97.
16. Kang JS, Krauss RS. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(3):243-8.
17. Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2008;2(1):22-31.
18. Farina NH, Hausburg M, Betta ND, Pulliam C, Srivastava D, Cornelison D, et al. A role for RNA post-transcriptional regulation in satellite cell activation. *Skelet Muscle*. 2012;2(1):21.
19. Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell*. 2000;11(5):1859-74.
20. Li YP. TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285(2):C370-6.
21. Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DD, Fedorov YV, et al. The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol*. 2005;169(1):105-16.
22. Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, et al. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat Commun*. 2011;2:499.
23. Montanaro F, Liadaki K, Schianda J, Flint A, Gussoni E, Kunkel LM. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res*. 2004;298(1):144-54.
24. Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, et al. Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells*. 2004;22(7):1305-20.
25. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):255-67.
26. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, et al. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. *Stem Cells Dev*. 2013;22(16):2298-314.

27. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Mintz A, Delbono O. Pericytes: multitasking cells in the regeneration of injured, diseased, and aged skeletal muscle. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:245.
28. Dulauroy S, Di Carlo SE, Langa F, Eberl G, Peduto L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat Med.* 2012;18(8):1262-70.
29. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Mintz A, Delbono O. Type-1 pericytes participate in fibrous tissue deposition in aged skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;305(11):C1098-113.
30. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010;120(1):11-9.
31. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(2):R345-53.
32. Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development.* 2011;138(17):3625-37.
33. Davis ME, Gumucio JP, Sugg KB, Bedi A, Mendias CL. MMP inhibition as a potential method to augment the healing of skeletal muscle and tendon extracellular matrix. *J Appl Physiol (1985).* 2013;115(6):884-91.
34. Garg K, Corona BT, Walters TJ. Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Front Pharmacol.* 2015;6:87.
35. Chen JC, Lin BB, Hu HW, Lin C, Jin WY, Zhang FB, et al. NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways. *Biomed Res Int.* 2014;2014:547187.
36. Hildebrand KA, Gallant-Behm CL, Kydd AS, Hart DA. The Basics of Soft Tissue Healing and General Factors that Influence Such Healing. *Sports Medicine and Arthroscopy Review.* 2005;13(3):136-44.
37. Thievensen I, Fakhri N, Steinwachs J, Kraus V, Mclsaac RS, Gao L, et al. Vinculin is required for cell polarization, migration, and extracellular matrix remodeling in 3D collagen. *FASEB J.* 2015;29(11):4555-67.
38. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 1996;84(3):359-69.
39. Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell.* 1996;84(3):371-9.

40. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453-65.
41. Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*. 1999;144(6):1235-44.
42. Zegers MM, Friedl P. Rho GTPases in collective cell migration. *Small GTPases*. 2014;5:e28997.
43. Rahman P, Huysmans RD, Wiradjaja F, Gurung R, Ooms LM, Sheffield DA, et al. Silencer of death domains (SODD) inhibits skeletal muscle and kidney enriched inositol 5-phosphatase (SKIP) and regulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2011;286(34):29758-70.
44. Veland IR, Montjean R, Eley L, Pedersen LB, Schwab A, Goodship J, et al. Inversin/Nephrocystin-2 is required for fibroblast polarity and directional cell migration. *PLoS One*. 2013;8(4):e60193.
45. Park SH, Jung EH, Kim GY, Kim BC, Lim JH, Woo CH. Itch E3 ubiquitin ligase positively regulates TGF-beta signaling to EMT via Smad7 ubiquitination. *Mol Cells*. 2015;38(1):20-5.
46. Wei J, Mialki RK, Dong S, Khoo A, Mallampalli RK, Zhao Y, et al. A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: roles of SCF(FBXL19) E3 ligase and Erk2. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):2757-64.
47. Lynch EA, Stall J, Schmidt G, Chavrier P, D'Souza-Schorey C. Proteasome-mediated degradation of Rac1-GTP during epithelial cell scattering. *Mol Biol Cell*. 2006;17(5):2236-42.
48. Bell RA, Al-Khalaf M, Megeney LA. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skelet Muscle*. 2016;6:16.
49. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*. 1999;129(1S Suppl):227S-37S.
50. Cuervo AM, Dice JF. How do intracellular proteolytic systems change with age? *Front Biosci*. 1998;3:d25-43.
51. Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(10):2098-114.
52. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14440-5.
53. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79.

54. Rahimi N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(3):538-48.
55. Spencer JA, Eliazer S, Ilaria RL, Jr., Richardson JA, Olson EN. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol.* 2000;150(4):771-84.
56. McElhinny AS, Perry CN, Witt CC, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 15):3175-88.
57. Pizon V, Iakovenko A, Van Der Ven PF, Kelly R, Fatu C, Furst DO, et al. Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 23):4469-82.
58. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001;294(5547):1704-8.
59. Pizon V, Rybina S, Gerbal F, Delort F, Vicart P, Baldacci G, et al. MURF2B, a novel LC3-binding protein, participates with MURF2A in the switch between autophagy and ubiquitin proteasome system during differentiation of C2C12 muscle cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e76140.
60. McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol.* 2002;157(1):125-36.
61. Witt CC, Witt SH, Lerche S, Labeit D, Back W, Labeit S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J.* 2008;27(2):350-60.
62. de la Garza-Rodea AS, van der Velde I, Boersma H, Goncalves MA, van Bekkum DW, de Vries AA, et al. Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice. *Cell Transplant.* 2011;20(2):217-31.
63. Hosaka Y, Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Yuasa K, Imamura M, Matsuda R, et al. Alpha1-syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. *J Cell Biol.* 2002;158(6):1097-107.
64. Danoviz ME, Yablonka-Reuveni Z. Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. *Methods Mol Biol.* 2012;798:21-52.

65. Fuentes-Calvo I, Crespo P, Santos E, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C. The small GTPase N-Ras regulates extracellular matrix synthesis, proliferation and migration in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):2734-44.
66. Rudolf R, Bogomolovas J, Strack S, Choi KR, Khan MM, Wagner A, et al. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. *Age (Dordr)*. 2013;35(5):1663-74.
67. Lee ZH, Kim HJ, Ryoo HM. A Novel Osteogenic Activity of Suberoylanilide Hydroxamic Acid is Synergized by BMP-2. *J Bone Metab*. 2015;22(2):51-6.
68. Perera S, Holt MR, Mankoo BS, Gautel M. Developmental regulation of MURF ubiquitin ligases and autophagy proteins nbr1, p62/SQSTM1 and LC3 during cardiac myofibril assembly and turnover. *Dev Biol*. 2011;351(1):46-61.
69. Vandekerckhove J, Deboben A, Nassal M, Wieland T. The phalloidin binding site of F-actin. *EMBO J*. 1985;4(11):2815-8.
70. Zhang E, Gao B, Yang L, Wu X, Wang Z. Notoginsenoside Ft1 Promotes Fibroblast Proliferation via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Benefits Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;356(2):324-32.
71. Mia MM, Bank RA. The pro-fibrotic properties of transforming growth factor on human fibroblasts are counteracted by caffeic acid by inhibiting myofibroblast formation and collagen synthesis. *Cell Tissue Res*. 2015.
72. Perreault L, Starling AP, Glueck D, Brozinick JT, Sanders P, Siddall P, et al. Biomarkers of Ectopic Fat Deposition: The Next Frontier in Serum Lipidomics. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(1):176-82.
73. Goodpaster BH, Wolf D. Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2004;5(4):219-26.
74. Vettor R, Milan G, Franzin C, Sanna M, De Coppi P, Rizzuto R, et al. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(5):E987-98.
75. Sciorati C, Clementi E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(11):2135-56.
76. Farup J, Madaro L, Puri PL, Mikkelsen UR. Interactions between muscle stem cells, mesenchymal-derived cells and immune cells in muscle homeostasis, regeneration and disease. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1830.

77. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 21):3654-64.
78. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 2010;12(2):143-52.
79. Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Wu R, Yang B, He T, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells.* 2013;31(9):1840-56.
80. Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:645-73.
81. Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2697-713.
82. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006;4(4):263-73.
83. Kim JH, Park KW, Lee EW, Jang WS, Seo J, Shin S, et al. Suppression of PPARgamma through MKRN1-mediated ubiquitination and degradation prevents adipocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 2014;21(4):594-603.
84. Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005;44(37):5932-43.
85. Shen H, Zhao SH, Cao JH, Li XY, Fan B. Porcine MuRF2 and MuRF3: molecular cloning, expression and association analysis with muscle production traits. *Mol Biol Rep.* 2011;38(8):5115-23.
86. Yamamoto J, Kamata S, Miura A, Nagata T, Kainuma R, Ishii I. Differential adaptive responses to 1- or 2-day fasting in various mouse tissues revealed by quantitative PCR analysis. *FEBS Open Bio.* 2015;5:357-68.
87. Murphy SM, Kiely M, Jakeman PM, Kiely PA, Carson BP. Optimization of an in vitro bioassay to monitor growth and formation of myotubes in real time. *Biosci Rep.* 2016;36(3).
88. Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, et al. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science.* 2005;308(5728):1599-603.
89. Tschumperlin DJ. Fibroblasts and the ground they walk on. *Physiology (Bethesda).* 2013;28(6):380-90.



90. Zanotti S, Bragato C, Zucchella A, Maggi L, Mantegazza R, Morandi L, et al. Anti-fibrotic effect of pirfenidone in muscle derived-fibroblasts from Duchenne muscular dystrophy patients. *Life Sci.* 2016;145:127-36.
91. Heeg MHJ, Koziolk MJ, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Müller GA, et al. The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway<sup>2</sup>. *Kidney International.* 2005;68(1):96-109.
92. Liu J, Yu W, Liu Y, Chen S, Huang Y, Li X, et al. Mechanical stretching stimulates collagen synthesis via down-regulating SO2/AAT1 pathway. *Scientific Reports.* 2016;6:21112.
93. Yan Y, Furumura M, Gouya T, Iwanaga A, Teye K, Numata S, et al. Shikonin Promotes Skin Cell Proliferation and Inhibits Nuclear Factor-kappaB Translocation via Proteasome Inhibition In Vitro. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(16):2228-33.