

FRANCIELLE CAROLINE MOSELE

Papel da adiponectina no processo de regeneração muscular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

FRANCIELLE CAROLINE MOSELE

Papel da adiponectina no processo de regeneração muscular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular e tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

Versão corrigida.

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mosele, Francielle Caroline
Papel da adiponectina no processo de regeneração
muscular / Francielle Caroline Mosele; orientador
José Cesar Rosa Neto. -- São Paulo, 2018.
75 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Regeneração muscular. 2. Adiponectina. 3.
Células satélites. 4. Inflamação. I. Rosa Neto, José
Cesar, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Francielle Caroline Mosele

Título da Dissertação/Tese: Papel da adiponectina no processo de regeneração muscular

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel mediador da adiponectina sobre o processo de regeneração muscular", protocolada sob o CEUA nº 4257270218, sob a responsabilidade de **José Cesar Rosa Neto e equipe; Phablo Sâivio Abreu Teixeira; Francielle Caroline Mosele** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 21/05/2018.

We certify that the proposal "Role of adiponectin on the muscle regeneration", utilizing 54 Isogenics mice (54 males), 54 Genetically modified mice (GMO) (54 males), protocol number CEUA 4257270218, under the responsibility of **José Cesar Rosa Neto and team; Phablo Sâivio Abreu Teixeira; Francielle Caroline Mosele** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/21/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 24 meses

Depto/Setor: Biologia Celular E do Desenvolvimento

Origem:	Biotério Central FMUSP	sexo:	Machos	Idade ou peso:	8 a 10 semanas
Espécie:	Camundongos isogênicos			N amostral:	54
Linhagem:	C57BL/6				
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	8 a 10 semanas
Linhagem:	Adipo KO			N amostral:	54

São Paulo, 05 de setembro de 2018



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

*À Carmen e Otacir, meus pais, que me apoiaram incondicionalmente
A mim, por chegar até aqui*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela coragem e determinação para persistir, além de toda proteção.

Agradeço aos meus pais por todo amor, incentivo e apoio. Um agradecimento especial a você, meu pai, por investir todas as fichas em mim e meus irmãos. Amo vocês.

Agradeço, aos meus irmãos, que mesmo sem entender o que eu estava fazendo, sempre acreditaram e torceram por mim.

Ao Francisco Colloca e a Cida Florence, obrigada por me acolherem em São Paulo e por terem cuidado de mim ao longo desses dois anos.

A você, minha amiga Jéssica Silvino, muito obrigada por tudo! Pelas conversas, conselhos e dicas, mas principalmente por me ajudar a enfrentar todos os obstáculos e por acreditar que eu chegaria aqui, assim como acreditei em você.

Agradeço, aos meus amigos Amanda Gonçalves, Bruna Zanella e Juan de Nicolai, pelo carinho, por me ajudarem, cada um a seu modo, e por estarem comigo, apesar da distância.

Ao meu amigo Ivan Vechetti, mais uma vez, obrigada por sempre confiar em minha capacidade e por nunca reclamar das inúmeras dúvidas que surgiram no whatsapp! Sem você eu não saberia tudo o que sei hoje, obrigada.

Agradeço aos meus amigos e familiares que acompanharam, torceram por esse título e entenderam minha ausência.

Aos funcionários e pós-graduandos do departamento e do ICB, obrigada por toda ajuda! Seja com uma conversa, um “empréstimo” de reagente ou com esclarecimento de algo, vocês participaram desse trabalho. Em especial a você Adilson, que ouviu, me fez rir, brigou e emprestou tantos materiais!

Aos estagiários que passaram pelo laboratório, obrigada pela oportunidade de ensinar! Ao mesmo tempo que vocês aprenderam comigo, eu aprendi com vocês! Deborah, Rafaella, Jéssica e Jocasta, desejo a vocês um futuro maravilhoso!

A você Rafael, que passou e decidiu ficar nessa vida (louca, mas amada) da academia, obrigada pelas risadas, compartilhamento de lanches e por ouvir meus desesperos até hoje!

Aos amigos, que a pós-graduação me trouxe, Thaty, Ale e Sa, obrigada pelos bate-papos, apoio e auxílio quando necessitei!

Aos meus colegas de laboratório, Luana, Carolina, Helena, Loreana, Tiego, Edson, Jefferson e Alexandre, obrigada pelos auxílios e ensinamentos.

Agradeço, ao meu orientador, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, confiando em minha capacidade para desenvolver esse trabalho. Obrigada por incentivar a independência profissional dos seus alunos, aprendi muito e, com certeza, levarei isto para minha formação!

À equipe do GENIAL- Genome Investigation and Analysis Laboratory – do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP).

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Martin Luther King

RESUMO

MOSELE, FC. **Papel da adiponectina no processo de regeneração muscular**. 2018, 75 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo (2019).

No músculo reside um conjunto de células miogênicas indiferenciadas denominadas células satélites (CS), que são essenciais na homeostasia e na regeneração muscular. No entanto, as fases de ativação, proliferação e diferenciação das CS podem ser influenciadas por vários fatores extracelulares, como, a adiponectina. Essa adipocina tem sido amplamente estudada em relação a seus efeitos anti-inflamatórios e antidiabéticos, e foi proposta como reguladora da miogênese in vitro, porém sua atuação na regeneração in vivo, ainda não é bem elucidada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a regeneração muscular em camundongos deficientes de adiponectina. A lesão foi induzida pela injeção de 50 μ l de cloreto de bário no músculo tibial anterior esquerdo de animais machos selvagens (WT) e deficientes em adiponectina (AdKO). Após 3, 7 e 14 dias os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas para análises morfológicas, gênica e proteica. O grupo AdKO apresentou maior quantidade de núcleos centralizados comparado com o grupo WT após 7 dias da lesão. Foram encontrados redução da expressão gênica de Pax7, MyoD e Miogenina nos AdKO após 3 dias. Houve aumento dos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 após 3 e 7 dias, respectivamente, e aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-17, TNF- α e IFN γ após 7 dias nos animais AdKO. Apesar de não haver diferença entre os genótipos na expressão gênica de F4/80, os animais AdKO apresentaram aumento de CD206. Os animais WT tiveram aumento de mRNA de adiponectina com 7 dias da lesão. Não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos quanto ao infiltrado inflamatório, a deposição de colágeno total, a área de secção transversal e a recuperação da massa muscular. Concluímos que a adiponectina é importante no processo de remodelamento tecidual durante a regeneração e que sua deficiência não compromete a maturação das fibras musculares, devido aumento da resposta anti-inflamatória, apesar de haver um possível comprometimento na resposta pró-inflamatória.

Palavras-chave: Regeneração muscular. Adiponectina. Células satélites. Inflamação.

ABSTRACT

MOSELE, FC. **Role of adiponectin in the process of muscle regeneration.** 2018, 75 p. Dissertation (Masters thesis in Cell and Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo (2019).

In the muscle resides a set of undifferentiated myogenic cells, called satellite cells (SC), which are essential in the maintenance of homeostasis and muscle regeneration. However, the control and activation of SC can be influenced by several extracellular myogenic factors, such as adiponectin. Adiponectin, an adipokine, mainly produced by subcutaneous adipose tissue, has been widely studied in relation to its anti-inflammatory and anti-diabetic effects, but its role as regulator of in vivo regeneration is not yet well elucidated. Here we evaluate muscle regeneration in adiponectin deficient mice. Barium chloride was administered to the left anterior tibial muscle of wild type (WT) and adiponectin deficient (AdKO) animals. The right anterior tibial muscle was not injured and was used as control. The animals were euthanized after 3, 7 and 14 days after injury. We measured the area of the fibers by laminin, in addition to qualitatively evaluating the response to injury by HE and picrosirius. The inflammatory response was verified by the concentration of several cytokines in the muscle, by ELISA, and by the gene expression of some inflammation pathways (RT-qPCR). The regeneration response was obtained by the analysis of regulatory genes of this process by RT-pPCR. The data were compared statistically and the significant differences considered presented $p < 0.05$. The lesion was effective in causing tissue damage, and the activation of regulatory genes of the regeneration process besides inducing inflammation in WT. However, we observed that the animals with deletion for the adiponectin gene presented a myogenic response potentially similar to the control animals, however, the cellular response presents differences. We conclude that adiponectin deficiency does not compromise muscle regeneration, although there is a possible compromise of the pro-inflammatory response.

Keywords: Muscle regeneration. Adiponectin. Satellite cells. Inflammation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação do processo de regeneração muscular.....	19
FIGURA 2. Representação esquemática do processo de miogênese.....	23
FIGURA 3. Modulação da inflamação na regeneração muscular.....	26
FIGURA 4. Ilustração da estrutura da adiponectina e suas formas oligoméricas.....	29
FIGURA 5. Procedimento de indução de lesão química.....	35
FIGURA 6. Cortes transversais corados com hematoxilina-eosina de camundongos WT e AdKO controles e após 3, 7 e 14 dias de lesão muscular.....	41
FIGURA 7. Infiltrado de células inflamatórias após lesão muscular.....	42
FIGURA 8. Porcentagem de núcleos centralizados nos grupos CT (A), 3, 7 e 14 dias após lesão (B) em animais WT e AdKO.....	42
FIGURA 9. Porcentagem de colágeno total nos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	43
FIGURA 10. Cortes transversais de músculos tibiais anteriores dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO submetidos a coloração de <i>Picrosirius red</i>	44
FIGURA 11. Níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	46
FIGURA 12. Nível proteico de MCP-1 dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	47
FIGURA 13. Níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	48
FIGURA 14. Expressão gênica de marcadores inflamatórios dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	49
FIGURA 15. Expressão gênica de Pax7 dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	50
FIGURA 16. Expressão gênica dos MRFs dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	51
FIGURA 17. Massa muscular relativa dos grupos CT e 3, 7 e 15 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	52

FIGURA 18. Área de secção transversal das fibras musculares (A) e distribuição de frequência (B) dos grupos CT, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	53
FIGURA 19. Imunofluorescência para laminina em cortes transversais dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após a lesão em animais WT e AdKO.....	54
FIGURA 20. Expressão gênica de desmina nos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	55
FIGURA 21. Níveis proteicos de TGF- β 1 e VEGF dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	56
FIGURA 22. Expressão gênica de adiponectina (B) e seu receptor AdipoR1 (A) dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO.....	57
FIGURA 23. Nível sérico de adiponectina nos animais WT e AdKO.....	57

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Lista dos genes analisados com seu código <i>GenBank</i> e as respectivas sequências dos primers.....	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	acetil-coA carboxilase
AdKO	animais nocaute para adiponectina
Akt	proteína quinase serina-treonina
AMPK	quinase ativada por AMP (<i>do inglês: AMP-activated protein kinase</i>)
AST	área de secção transversal
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina (<i>do inglês: bovine serum albumin</i>)
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
CD34	fator de adesão celular
c-Met	receptor tirosina quinase
CS	células satélites
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERK	quinase regulada por sinal extracelular (<i>do inglês: extracellular-signal-regulated kinase</i>)
fAd	adiponectina de comprimento total
FGF	fator de crescimento fibroblástico (<i>do inglês: Fibroblast Growth Factor</i>)
gAd	adiponectina globular
GLUT4	transportador de glicose tipo 4
HE	hematoxilina-eosina
HGH	fator de crescimento de hepatócito (<i>do inglês: Hepatocyte Growth Factor</i>)
IFN	Interferon
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina (<i>do inglês: Insulin Growth Factor</i>)
IL	Interleucina
MAPK	quinase ativada por mitógeno (<i>do inglês: Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos 1 (<i>do inglês: Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
MEC	matriz extracelular

MiRNA	microRNAs
MRFs	fatores de regulação miogênica (<i>do inglês: Myogenic Regulation Factors</i>)
MRF4	<i>myogenic factor 6</i>
MPO	Mieloperoxidase
Myf5	<i>myogenic factor 5</i>
MyoD	<i>myogenic differentiation 1</i>
NCAM	molécula de adesão celular neuronal (<i>do inglês: Neural Cell Adhesion Molecule</i>)
NFkB	fator nuclear-kappa B (<i>do inglês: Nuclear Factor Kappa B</i>)
Notch	receptor Notch
Pax3	<i>paired box 3</i>
Pax7	<i>paired box 7</i>
PBS	tampão fosfato salino (<i>do inglês: Phosphate-Buffered Saline</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
RNAm	RNA mensageiro
ROS	espécies reativas de oxigênio (<i>do inglês: Reactive Oxygen Species</i>)
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SBF	soro fetal bovino (<i>do inglês:</i>
TA	tibial anterior
TGF-β	fator de crescimento transformante teta (<i>do inglês: Transforming Growth Factor Beta</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF-α	fator de necrose tumoral- α (<i>do inglês: Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
VCAM1	molécula de adesão celular vascular 1 (<i>do inglês: Vascular Cell Adhesion Protein 1</i>)
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (<i>do inglês: Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
WT	animais wild type

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<i>Músculo esquelético</i>	17
1.2	<i>Biologia das células satélites</i>	18
1.3	<i>Regeneração muscular</i>	23
1.4	<i>Adiponectina na regeneração muscular</i>	28
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVO	33
3.1	<i>Objetivos específicos</i>	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	<i>Protocolo experimental: indução de lesão química com BaCl₂</i>	34
4.2	<i>Dados anatômicos</i>	35
4.3	<i>Análise histológica</i>	35
4.4	<i>Imunofluorescência</i>	36
4.5	<i>Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)</i>	37
4.6	<i>Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR)</i>	38
4.7	<i>Análise estatística</i>	39
5	RESULTADOS	40
5.1	<i>Análise histológica</i>	40
5.2	<i>Resposta inflamatória</i>	45
5.3	<i>Potencial miogênico</i>	49
5.4	<i>Maturação da fibra muscular</i>	51
5.5	<i>Expressão de adiponectina</i>	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	63
	ANEXOS	64
	REFERÊNCIAS*	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Músculo esquelético*

O tecido muscular esquelético compõe grande parte da musculatura nos vertebrados, sendo responsável pela geração de força, locomoção, adaptação metabólica e armazenamento de glicogênio. Esse tecido é constituído de filamentos alongados e cilíndricos, denominados miofibrilas, que formam as fibras musculares multinucleadas, cujos núcleos estão localizados na região periférica, próximos a membrana plasmática, também chamada de sarcolema (BROOKS, 2003; FRONTERA; OCHALA, 2014).

As fibras musculares esqueléticas apresentam estriações transversais, decorrentes da repetição de unidades contráteis ao longo da fibra, conhecidas como sarcômeros. Os sarcômeros são constituídos por proteínas miofibrilares contráteis e não contráteis. Como contráteis, se destacam a actina e a miosina, essenciais para a contração muscular (FRONTERA; OCHALA, 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008) e as não contráteis incluem desmina, nebulina, α -actinina, proteínas do citoesqueleto, essenciais para a organização dos sarcômeros e na sinalização celular (GAUTEL, 2011; LANGE; EHLER; GAUTEL, 2006).

Também residem, no músculo esquelético, um conjunto de células mononucleares indiferenciadas, denominadas células satélites (CS) (MAURO, 1961). Estas células receberam esse nome devido sua localização entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular, sendo essenciais na plasticidade muscular, uma vez que participam do crescimento, da manutenção e da regeneração do tecido (MOTOHASHI; ASAKURA, 2014; PETTE; STARON, 2000).

A plasticidade muscular engloba todas as alterações nas características estruturais, metabólicas e funcionais decorrentes dos estímulos que modificam o ambiente muscular, como, por exemplo, a atividade contrátil, a carga no músculo e o fornecimento de substrato (FLÜCK; HOPPELER, 2003; MAGAUDDA et al., 2004; PETTE; STARON, 2000). Uma das principais características dessa plasticidade é a regulação intrínseca da transcrição de genes músculo-específicos que promovem o aumento ou

redução da síntese proteica (GLASS, 2005; PALLAFACCHINA; BLAAUW; SCHIAFFINO, 2013). Ou seja, considerando que cerca de 85% do volume da fibra muscular é proteína (HOPPELER, 1986) qualquer desequilíbrio entre as vias de anabolismo e catabolismo pode contribuir para o aumento ou redução da massa muscular (hipertrofia ou atrofia muscular) (FAVIER; BENOIT; FREYSSENET, 2008).

O número de núcleos na fibra muscular é fator determinante da taxa de síntese proteica, uma vez que fornecem a quantidade necessária de DNA para suportar o aumento da transcrição e, conseqüentemente, da tradução de RNAm para proteínas específicas e para a maquinaria da tradução, já que aumento da síntese de proteínas requer também aumento da maquinaria, como ribossomos, enzimas e cofatores, por exemplo. Com base no conhecimento de que os mionúcleos das fibras musculares maduras são pós-mitóticos, ou seja, não possuem a capacidade de divisão, a adição de novos mionúcleos compete as CS, que são precursores miogênicos com intensa atividade mitogênica. Essas células, quando ativadas, proliferam e se diferenciam fornecendo núcleos para a regeneração da microlesão muscular (miotrauma adaptativo), contribuindo assim com o auto reparo e hipertrofia da miofibra (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; HAWKE; GARRY, 2001; HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005; SNIJDERS et al., 2015).

1.2 *Biologia das células satélites*

Originalmente descrita no músculo esquelético de rãs (MAURO, 1961), as CS foram identificadas também em aves, répteis e mamíferos (GAMBLE; FENTON; ALLSOPP, 1978; HARTLEY; BANDMAN; YABLONKA-REUVENI, 1992; KAHN; SIMPSON, 1974).

No músculo as CS estão em estado de quiescência, ou seja, na fase G0 do ciclo celular e, nessa condição, possuem características morfológicas distintas das células musculares, apresentando citoplasma delgado, organelas difusas e núcleo pequeno com alta taxa de heterocromatina, com baixíssima atividade transcricional (ASFOUR; ALLOUH; SAID, 2018; HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005). Em resposta a miotraumas severos ou adaptativos, que requerem a regeneração muscular, as CS são ativadas e sua morfologia muda drasticamente. Há aumento do volume citoplasmático, as organelas

(aparelho de Golgi, retículo endoplasmático), se tornam aparentes e a quantidade de heterocromatina reduz (HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005).

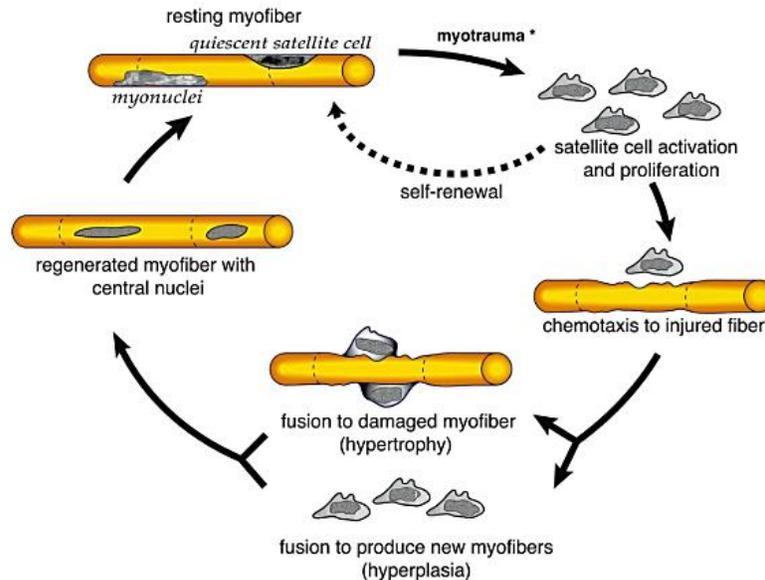


Figura 1. Representação do processo de regeneração muscular. Em resposta a injúria, CS quiescentes se tornam ativadas e proliferam. Algumas dessas células retornam ao estado quiescente, mantendo o pool de CS, por um processo chamado de auto renovação. Em seguida o outro conjunto de células, migram ao local da lesão e, dependendo da severidade, se fusionam a miofibra danificada, gerando novos mionúcleos, ou alinham e fusionam-se umas às outras, produzindo uma nova miofibra, restaurado a integridade e função do tecido muscular. Retirado de Hawke e Garry, 2001.

Após ativação, o processo de regeneração ocorre de forma semelhante a miogênese (RELAIX, 2006), porém as CS podem seguir três destinos diferentes (Figura 1): originar novas CS, diferenciar-se em novos mionúcleos ou participar da formação de novas fibras (apenas em situações de necrose seguida de regeneração) (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; HAWKE; GARRY, 2001).

Assim como sua função, a preservação do pool de CS também é essencial na manutenção da homeostasia do músculo esquelético (TIERNEY; SACCO, 2016). Após a ativação e a proliferação, um conjunto de células retornam ao estado quiescente para manter um pool constante, através de um mecanismo de divisão assimétrica, para o próximo processo de regeneração, quando vier a ser necessário (DUMONT; WANG; RUDNICKI, 2015; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; KUANG et al., 2007). Nesta direção, os estudos têm demonstrado que parte do desenvolvimento da sarcopenia associada ao envelhecimento, se dá por uma diminuição na quantidade e atividade das

CS (BRACK et al., 2007). Em ratos, as CS constituem cerca de 2% dos núcleos no músculo de idosos, que nos adultos correspondem cerca de 4% e de 30% nos neonatos (ASFOUR; ALLOUH; SAID, 2018; MOURA; RICCI, 2006).

Além da idade, outro fator determinante na quantidade de CS é o tipo de fibra. Fibras oxidativas, caracterizadas pela alta densidade de junções e capilares em relação às fibras glicolíticas, apresentam número de CS cinco a seis vezes maior. Logo, o processo regenerativo em fibras lentas ocorre mais rapidamente, o que pode atribuir papéis diferentes na formação e diferenciação dos distintos tipos de fibras (FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004).

As CS, tanto no estado quiescente como no estado ativado, expressam marcadores miogênicos, não expressos pelas fibras musculares, que permitem sua caracterização e compreensão da sua biologia. Vários marcadores, expressos em etapas distintas do ciclo celular, conferem uma assinatura molecular para as CS, que juntos regulam as fases de ativação, proliferação, migração e diferenciação durante o processo de crescimento ou reparo muscular (HAWKE; GARRY, 2001; RELAIX; ZAMMIT, 2012).

Em quiescência, as CS são molecularmente conhecidas por expressarem simultaneamente CD34, m-caderina, c-met, NCAM (*neural cell adhesion molecule*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), Pax7, Pax3 (*paired box transcription factors*), entre outros (BEAUCHAMP et al., 2000; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; CORNELISON et al., 2000; HAWKE; GARRY, 2001; IRINTCHEV et al., 1994; SCHMIDT et al., 2003).

A M-caderina, VCAM-1, NCAM e CD34 são moléculas importantes tanto na adesão das CS à lâmina basal quanto na migração dessas. O c-Met é receptor para HGF (*hepatocyte growth factor*), um potente ativador da mitose nas CS e importante também na migração. A expressão específica do fator de transcrição Pax7 é essencial para o crescimento e reparo pelas CS (VON MALTZAHN et al., 2013), pois participa da especificação dessas células (SEALE et al., 2000), evitando a apoptose (RELAIX et al., 2006). Em 2000, Seale et al. observaram que a inativação de Pax7 acarretava em deficiência muscular grave e letalidade. Já em 2006, Relaix et al. demonstrou que a ausência de Pax7 culminava numa atrofia do músculo adulto pela perda das CS, que sofrem apoptose, e que esse tecido não regenerava mesmo na presença de Pax3,

indicando que não há potencial compensatório para a ausência de Pax7 (RELAIX et al., 2006).

Após ativadas, a expressão desses marcadores se mantém em menores níveis até que se inicie a proliferação, uma vez que outros marcadores passam a caracterizar essas células, como os fatores de regulação miogênica (MRFs, *myogenic regulatory factors*) (SEALE; RUDNICKI, 2000).

Os MRFs são fatores transcricionais expressos no músculo esquelético durante a miogênese e crescimento muscular, nos processos de reparação, sendo importantes também para a manutenção do fenótipo do músculo. Fazem parte dos MRFs a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4/Myf6 (FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004; ZAMMIT, 2017). Durante o estado de quiescência, a expressão dos MRFs é praticamente negativa, exceto para Myf5, que possuem níveis detectáveis em grande parte das CS quiescentes, indicando que essas células já estão direcionadas para a via miogênica (BEAUCHAMP et al., 2000; GAYRAUD-MOREL et al., 2012).

Apesar da variação no comprimento e na sequência de aminoácidos, essas proteínas nucleares contêm três domínios principais. O primeiro é um domínio básico altamente conservado, conhecido como “*basic helix-loop-helix*” (bHLH), localizado numa região central; o segundo é rico em cisteína/histidina que reside ao lado N-terminal adjacente ao bHLH e o terceiro é um domínio rico em serina/treonina, localizado próximo a extremidade C-terminal (ASFOUR; ALLOUH; SAID, 2018; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; SABOURIN; RUDNICKI, 2000).

Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico (“*basic*”), uma sequência consenso no DNA conhecida como E-box (5´-CANNTG-3´), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos. A região “*helix-loop-helix*” do MRF constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47. A ligação do heterodímero MRF-proteína E à sequência E-box ativa a transcrição dos genes músculo-específicos, levando à sua expressão (ASFOUR; ALLOUH; SAID, 2018; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; MEGENEY; RUDNICKI, 1995a; MOLKENTIN; OLSON, 1996; SABOURIN; RUDNICKI, 2000). Além disso, essa interação pode iniciar a transcrição dos genes dos próprios MRFs durante o crescimento muscular (MURRE et al., 1989; SASSOON, 1993).

Pax7 é essencial na ativação das CS por se ligar diretamente a proteínas intensificadoras da transcrição de Myf5 e a região promotora de MyoD, garantindo a expressão desses MRFs já nos estágios iniciais da ativação das CS (SOLEIMANI et al., 2012), sendo ambos regulados de forma independente durante o ciclo celular à medida que a proliferação ocorre. A MyoD e o Myf5 são, portanto, conhecidos como fatores primários, sendo expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a de diferenciação, (MEGENEY; RUDNICKI, 1995b) porém também são expressos em CS ativas e por isso, o melhor marcador para diferenciar CS ativadas de CS em proliferação é o antígeno nuclear de célula proliferativa (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*) (ASFOUR; ALLOUH; SAID, 2018). Enquanto que a miogenina e o MRF4 são expressos em células na fase de diferenciação e fusão em fibras musculares imaturas (Figura 2) (MEGENEY; RUDNICKI, 1995b). Na ausência de MyoD a fase de proliferação é prolongada (YABLONKA-REUVENI et al., 1999).

Em cada fase do processo regenerativo há vias de sinalização envolvidas e dentre muitas, a via de Notch e Wnt têm papel importante no equilíbrio entre a proliferação e diferenciação das CS. Localizado na membrana das CS, o receptor Notch, quando ativado pelo seu ligante Delta, é clivado e migra para o núcleo, onde ativa a transcrição de Hes, fator de transcrição envolvido na ativação do ciclo celular, logo, culmina na proliferação das CS ativadas (BRAY, 2006; LUO; RENAULT; RANDO, 2005). Após a proliferação, é necessário que haja declínio dessa sinalização para que as CS partam para a próxima fase, por isso, Numb é essencial. Vindo de células em divisão assimétrica ativa, Numb inibe Notch, permitindo agora a expressão dos MRFs (CONBOY; RANDO, 2002). Sendo assim, uma inibição precoce de Notch nesta fase, por qualquer outro fator, impede o aumento da população das CS e conseqüentemente, pode prejudicar a regeneração.

Por outro lado, a sinalização de Wnt, ligante do receptor de membrana Frizzled, promove a diferenciação, através da estabilização de β -catenina no núcleo, que culmina na ativação de genes músculo-específicos necessários nesta fase (PALLAFACCHINA; BLAAUW; SCHIAFFINO, 2013; VON MALTZAHN et al., 2012). Logo, o equilíbrio entre as duas sinalizações possibilita uma passagem precisa das CS pelos estágios da regeneração (BRACK et al., 2008).

Além de Notch e Wnt, outras vias de sinalização participam do controle das CS. ERK1/2 é essencial para a proliferação (JONES et al., 2001), logo, para induzir a fase de diferenciação das CS, deve ser suprimida, já que sua ativação inibe a expressão de miogenina (YOKOYAMA et al., 2007). De acordo com Gopinath et al. (2014), FOXO3 é expresso em CS quiescentes, sendo importante para o retorno a quiescência. A regeneração de animais com deleção específica desse fator de transcrição nas CS não é prejudicada, indicando um comprometimento no processo de auto-renovação dessas células, enquanto que a super expressão de FOXO3 nessas mesmas células é capaz de suprimir a entrada no ciclo celular.

Foi demonstrado também que miRNAs participam na regulação da quiescência da CS. miR-489 é altamente expresso em CS quiescentes, regulando o gene Dek, alvo envolvido com a proliferação das CS (CHEUNG et al., 2012). Outro miRNA envolvido na manutenção da quiescência é o miR-31, que inibe a tradução de Myf5, já expresso na maioria das CS quiescentes (CRIST; MONTARRAS; BUCKINGHAM, 2012) .

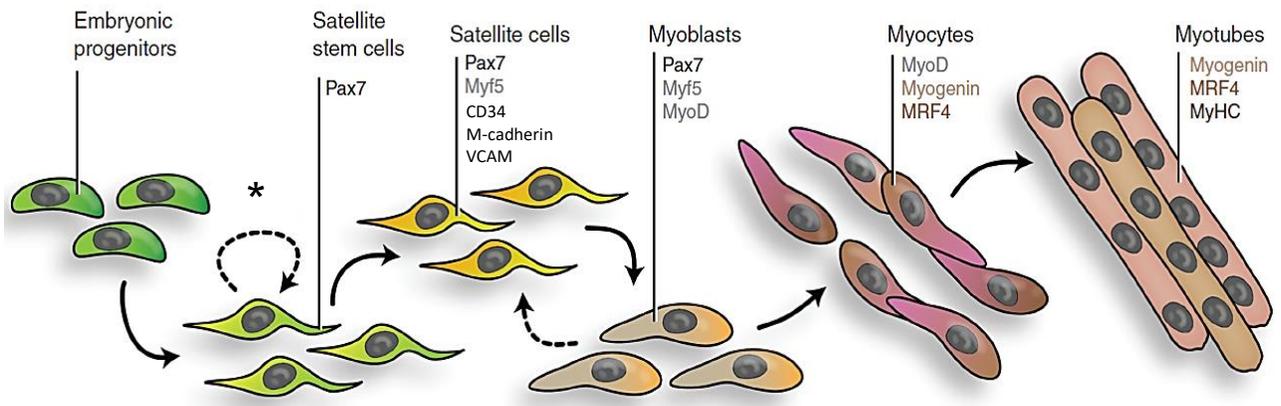


Figura 2. Representação esquemática do processo de miogênese. Células satélites quiescentes são ativadas por miotraumas. A expressão de miogenina e MRF4 induz a diferenciação dos mioblastos em miocitos. Posteriormente, os miocitos se fundem para originar os miotubos. * auto renovação. Adaptado de Dumont et al., 2015.

1.3 Regeneração muscular

A regeneração muscular, também chamada de miogênese pós-natal, é um processo altamente sincronizado e complexo, no qual as células inflamatórias também participam, com o objetivo de restaurar a integridade e homeostase do tecido (SAINI et

al., 2016). Isso se dá através de um equilíbrio entre atividades pró e anti-inflamatórias e pró e anti oxidantes, mantido pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*), fatores de crescimento, citocinas e hormônios (SILVA; MACEDO, 2011). A inflamação na regeneração é totalmente controlada e regulada através de fases bem definidas, com o objetivo de garantir uma completa e eficiente reconstrução do tecido (KHARRAZ et al., 2013). No geral, esse processo pode ser basicamente caracterizado em três fases: degenerativa, proliferativa e de remodelamento, que se sobrepõe com as fases de ativação, proliferação e diferenciação das CS, conduzidas pelos diferentes MRFs (BARBERI et al., 2013; FORBES; ROSENTHAL, 2014; MOURA; RICCI, 2006) (Figura 3).

A primeira fase se dá pela lesão do sarcolema derivada do aumento no influxo de cálcio, que culmina numa rápida necrose do tecido. Isso porque esse influxo promove ativação, possivelmente, de calpaínas e de proteases responsáveis pelo desarranjo das proteínas estruturais dos sarcômeros (TIDBALL, 2011). Essa lesão do sarcolema é responsável pela ativação local da resposta imune inata via liberação de ácidos nucleicos que agem como padrões moleculares associados a danos (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Pattern*), de proteínas de choque térmico e de proteínas de alta mobilidade (Hmg1) (COSTAMAGNA et al., 2015; KHARRAZ et al., 2013). Além desses, também há a liberação de eicosanoides derivados do ácido araquidônico, um constituinte dos fosfolipídios das membranas plasmáticas. Esses eicosanoides, em especial as prostaglandinas, colaboram na vasodilatação, na atividade quimiotática e no aumento da permeabilidade do endotélio vascular (FERRARI et al., 2005; SILVA; MACEDO, 2011). Em conjunto, essas moléculas agem possibilitando a invasão de células inflamatórias para o local do dano, evento subsequente a lesão do sarcolema.

Os neutrófilos são os primeiros a chegar no local lesionado e têm como principal função a remoção, por fagocitose, dos fragmentos relacionados a lesão (MOURA; RICCI, 2006). Para tal, liberam proteases lisossomais, formam ROS e ativam a enzima mieloperoxidase (MPO) (DOMINGUES-FARIA et al., 2016). Teixeira et al. (2003) verificou aumento de tecido necrosado e atraso no processo regenerativo em animais nocaute para neutrófilos, demonstrando a importância dessas células para este processo. Essa resposta pelos neutrófilos deve ser aguda e altamente regulada, como forma de preservar

células e tecidos circundantes e evitar exacerbação do dano por um aumento na formação de ROS (MOURA; RICCI, 2006). Atraída por MPO secretada e ativada pelos neutrófilos, a segunda subpopulação a migrar para o local danificado deriva de um tipo de leucócito, os monócitos, que quando saem da circulação e migram para os tecidos passam a ser denominados macrófagos. No entanto, estudos *in vivo* relatam que os monócitos recrutados após lesão poderiam vir primeiramente do tecido conjuntivo circundante no músculo (ALMEIDA et al., 2016).

Os macrófagos existem em populações funcionais distintas, atuando em momentos diferentes após o dano tecidual. São classificados pela função oposta que exercem, sendo denominados M1 ou M2, referindo-se à ativação clássica ou alternativa, respectivamente (SAINI et al., 2016). Domingues-Faria et al. (2016) aponta que função dos macrófagos que invadem precocemente o local lesionado difere daqueles que aparecem mais tardiamente. A população M1 dos macrófagos atrai as CS para o local lesionado (ROBERTSON et al., 1993), estimulando a proliferação, enquanto que os macrófagos M2 atuam no processo de diferenciação (ARNOLD et al., 2007; AURORA; OLSON, 2014; CANTINI et al., 1994; DOMINGUES-FARIA et al., 2016).

Nessa fase de degeneração, caracterizada por uma inflamação aguda, o número de macrófagos M1, denominados também de pró-inflamatórios, aumenta para realizar a fagocitose, além de contribuírem na regulação da atividade mitótica das CS e na liberação de fatores de crescimento e citocinas, tais como TNF- α e IL-1 (FERRARI et al., 2005; MOURA; RICCI, 2006).

A fase seguinte é caracterizada pela fagocitose do tecido necrosado, surgimento de novos capilares sanguíneos, proliferação das CS, estimulada por M1, e de fibroblastos, que produzem fibronectina, colágeno e outros componentes da matriz extracelular (MEC) (DOMINGUES-FARIA et al., 2016; MOURA; RICCI, 2006; SILVA; MACEDO, 2011). Com o avanço do processo regenerativo, os macrófagos M1 mudam diminuem em proporção e há um aumento do recrutamento e diferenciação desses novos macrófagos para o fenótipo M2, com o objetivo de minimizar a inflamação, passando a liberar IL-10 e TGF- β , por exemplo. Essas citocinas anti-inflamatórias são essenciais na cicatrização adequada, contribuindo para a angiogênese e para a deposição transitória da matriz extracelular (YANG; HU, 2018). O aumento da população de macrófagos M2,

também chamados de anti-inflamatórios, também é importante na diferenciação e fusão das CS, sendo esses os que possuem papel efetivo na regeneração (PILLON et al., 2013; TIDBALL; VILLALTA, 2010).

A última fase, a de remodelamento, consiste da diminuição dos capilares sanguíneos, organização das fibras de colágeno I e, por fim, maturação das miofibras, restaurando a funcionalidade do tecido reparado (MOURA; RICCI, 2006). Nessa fase é fundamental evitar a formação de fibrose, que pode comprometer a força e a flexibilidade do músculo.

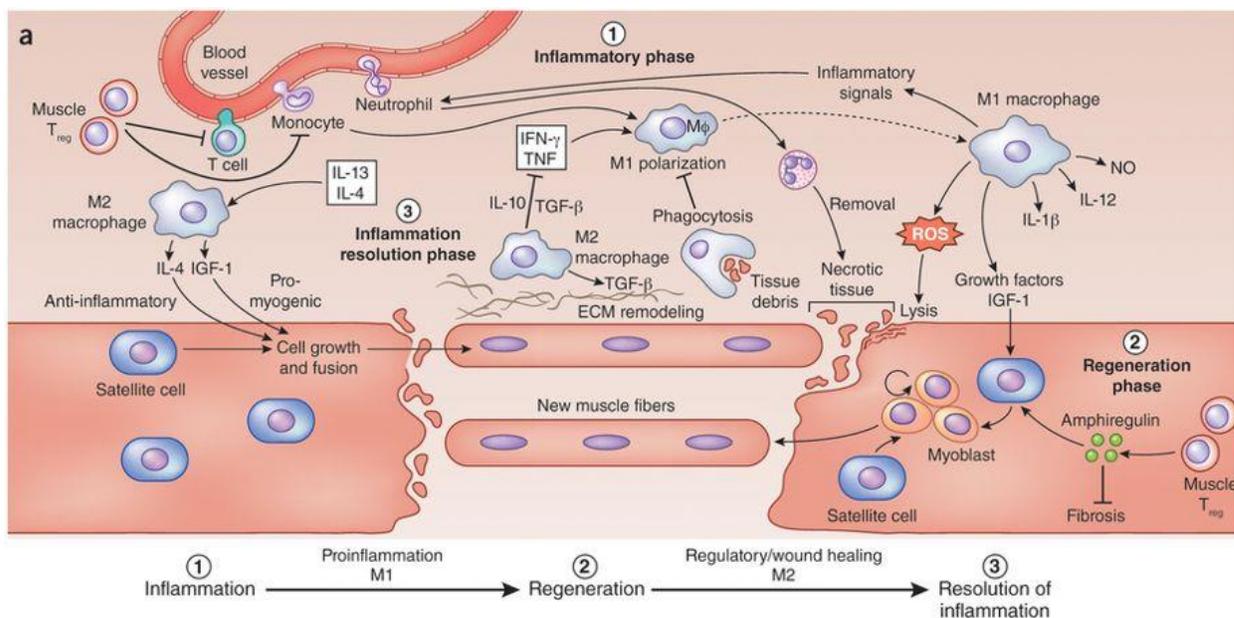


Figura 3. Modulação da inflamação na regeneração muscular. 1) A lesão muscular desencadeia a migração de neutrófilos até o dano. Lá, eles removem o tecido necrótico e ativam macrófagos M1 por IFN- γ , TNF e MPO. Os M1 secretam tanto fatores pró-inflamatórios como outros fatores importantes para a ativação das CS. 2) Além de requerer um balanço entre ações pró e anti-inflamatórias, a regeneração também conta com o remodelamento da MEC para substituir as miofibras destruídas por tecido conjuntivo, ou seja, uma fibrose, que deve ser temporária para não comprometer a função muscular. 3) IL-4 e IL-13, o IGF-1 promovem a polarização dos macrófagos para M2, controlando a inflamação e dando continuidade a regeneração através de TGF- β . Retirado de Forbes et al. (2015).

Não obstante, a ativação da CS parece ser um evento crítico para o remodelamento vascular do músculo esquelético, e por sua vez a vascularização se torna necessária para que haja o correto suprimento de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento para as células satélites, inclusive o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) parece ter um efeito indutor na atividade das CS (JOANISSE et al., 2016).

No entanto, o controle e ativação das CS podem ser influenciados por vários outros fatores de crescimento, que atuam como reguladores positivos, como os hormônios (GH - *growth hormone*, insulina e testosterona), os fatores de crescimento (IGF-I, *insulin-like growth factor*; HGF, *hepatocyte growth factor*; FGF, *fibroblast growth factor*) e também as citocinas IL-6, *interleukin-6*; e IL-15, *Interleukin-15*; e/ou reguladores negativos como o TGF- β , *transforming growth factor-beta* (ASFOUR; ALLOUH; SAID, 2018; CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). Por exemplo, tanto os fatores de crescimento da insulina I e II (IGF-I e IGF-II) participam na indução da proliferação, porém, IGF-I tem papel mais eficiente na diferenciação (JIMÉNEZ-AMILBURU et al., 2012). O fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) atua no recrutamento de CS para o ciclo celular, fornecendo mais células para a regeneração (KÄSTNER et al., 2000). O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) induz a ativação e proliferação das CS (GAL-LEVI et al., 1998; MILLER et al., 2000). IL-6 participa da proliferação das CS, ativando STAT3 que ativa a expressão de ciclina D1, extremamente importante para a saída de G0 (SERRANO et al., 2008).

O balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias também podem ter papel determinante na regulação das CS e, conseqüentemente, na regeneração muscular. Inclusive tem sido demonstrado que o TNF- α é necessário nas primeiras 24 horas, mas deve diminuir na sequência para que o processo ocorra de maneira eficaz, ao mesmo tempo que citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e IL-10 apresentam comportamento oposto (COSTAMAGNA et al., 2015). O conhecimento sobre a interação entre marcadores inflamatórios e o processo de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites tem avançado, mas ainda há muitos aspectos a serem esclarecidos.

Diversos estudos indicam que as CS são as principais células miogênicas precursoras e que nenhum outro tipo celular é capaz de compensar sua perda (DUMONT et al., 2015). Entretanto, outras células constituintes do nicho também são descritas por contribuírem na regeneração. Por exemplo, a proliferação dos fibroblastos durante a regeneração está correlacionada com o aumento das CS (MURPHY et al., 2011). Outra célula participante da formação da MEC, os progenitores fibro-adipogênicos (FAPs), atuam na diferenciação das CS, ao contrário dos fibroblastos, liberando IL-6 e IGF1. Alguns outros tipos de células residentes no músculo esquelético adulto podem adquirir expressão de marcadores de CS e contribuírem na miogênese *in vitro*. A população de

PICs (células intersticiais PW1⁺/Pax7⁻), segundo Mitchell et al. (2010), representa uma célula-tronco bipotente, já que adquirem expressão de Pax7 e MyoD quando cultivadas *in vitro* com mioblastos. De acordo com Dellavalle et al. (2007), os pericitos, células localizadas ao redor dos vasos sanguíneos, podem se diferenciar em miotubos e a cocultura com mioblastos aumenta esse fenômeno. Tais células apresentam potencial terapêutico e requerem mais estudos.

1.4 Adiponectina na regeneração muscular

Dentre os aspectos a serem melhor elucidados na regeneração, podemos destacar o papel da adiponectina, que recebeu essa denominação como consenso, por ter sido descoberta por quatro grupos de pesquisa de forma independente, sendo chamada de AdipoQ (HU; LIANG; SPIEGELMAN, 1996), Acrp30 (SCHERER et al., 1995), apM1 (MAEDA et al., 1996) e GBP28 (NAKANO et al., 1996). Desde então, seus benefícios sobre a sensibilidade à insulina, inflamação sistêmica (AMIN et al., 2010; KATSIKI; MANTZOROS; MIKHAILIDIS, 2017; WANG et al., 2016) e, mais recentemente, também como regulador da miogênese *in vitro* (FIASCHI et al., 2009, 2012), fizeram dela alvo de diversos estudos.

Essa adipocina, secretada pelo tecido adiposo, possui estrutura semelhante a um fator complemento 1q (LUO; LIU, 2016) e existe em três formas distintas (Figura 4): a de baixo peso molecular (LMW, *Low Molecular Weight*), em forma de trímero; médio peso molecular (MMW, *Medium Molecular Weight*), em forma de hexâmero; e alto peso molecular (HMW, *High Molecular Weight*) (LIU; LIU, 2014; LUO; LIU, 2016; TILG; MOSCHEN, 2006).

Com essas diferentes formas oligoméricas, a adiponectina circula abundantemente no sangue, sendo referida como adiponectina de comprimento total (fAd). Porém, uma forma adicional menor, denominada adiponectina globular (gAd), que contém apenas o domínio C-terminal, é produzida através da clivagem de fAd por uma elastase derivada de neutrófilo ou monócito ativado (OKAMOTO et al., 2006; WAKI et al., 2005).

Ela desempenha seus efeitos através de dois receptores, chamados AdipoR1 e AdipoR2. Com sete domínios transmembranares, seus receptores possuem a cauda N-terminal interna e a C-terminal externa, o oposto encontrado em outros receptores acoplados a proteína G (GHADGE; KHAIRE; KUVALEKAR, 2018). Os receptores AdipoR1 e R2 são predominantemente expressos, respectivamente, no músculo esquelético e no fígado, porém ambos também são expressos no tecido adiposo e em outros tecidos (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005; YAMAUCHI et al., 2014). AdipoR1 é considerado receptor para a forma gAd, possuindo pouca afinidade por fAd, enquanto AdipoR2 apresenta afinidades intermediárias para ambas formas (LIU; SWEENEY, 2014).

Foi descrito também a T-caderina, com afinidade para a forma hexamérica, que está presente no sistema cardiovascular, nervoso e músculo esquelético, participando também da adesão e sinalização celular (FERNADES; ALBUQUERQUE; MOREIRA, 2008).

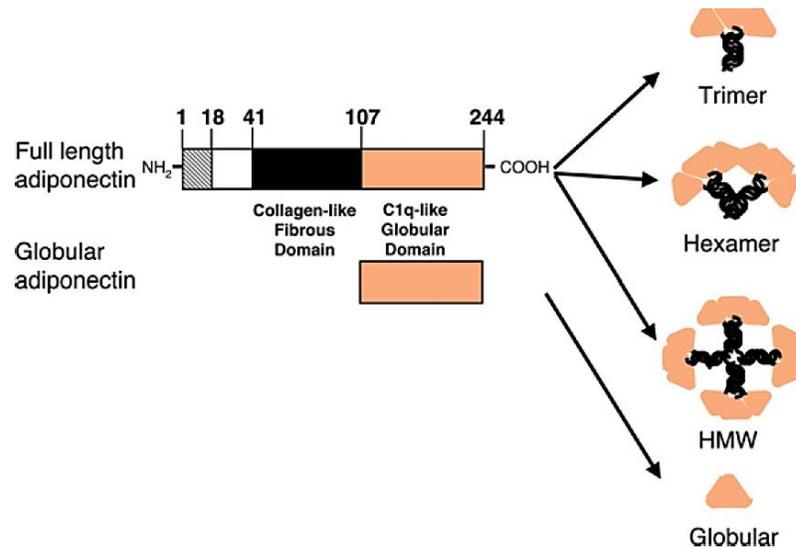


Figura 4. Ilustração da estrutura da adiponectina e suas formas oligoméricas. Retirado de Okamoto et al., 2006.

A adiponectina é amplamente estudada devido seus efeitos antidiabéticos, principalmente no fígado e no músculo esquelético (FIASCHI et al., 2014; TURER; SCHERER, 2012). Nos hepatócitos, está envolvida com a redução da gliconeogênese, aumento da síntese de glicogênio e do consumo de glicose, enquanto que, no músculo

participa da oxidação de ácidos graxos, da produção de lactato e da captação de glicose (FIASCHI et al., 2009; LIU; SWEENEY, 2014).

No músculo esquelético, a ativação da fosfatidilinositol (PI) 3-quinase, quando estimulado pela insulina, é inibida pela grande quantidade de triglicerídeos (TG) armazenado, o que afeta o transporte e absorção de glicose, culminando na resistência à insulina (SHULMAN, 2000). A adiponectina atua na diminuição desses TG armazenados, tanto no tecido hepático como no músculo esquelético, o que contribui na melhora da sinalização da insulina. Isso ocorre pois sua ação aumenta a expressão de moléculas que participam no transporte e metabolismo de ácidos graxos e na dissipação de energia (YAMAUCHI et al., 2001). No músculo, tanto gAd como fAd ativam AMPK, estimulando a fosforilação inibitória de acetil-coA carboxilase (ACC), o que desencadeia a β -oxidação e a absorção de glicose, através da translocação de GLUT4 para o sarcolema. Ao mesmo tempo, também ativam PPAR α , o que aumenta a β -oxidação.

Já no fígado, apenas fAd ativa PPAR α e AMPK, reduzindo fosfoenolpiruvato carboxilase e glicose-6-fosfatase, moléculas envolvidas na gliconeogênese; aumentando a fosforilação inibitória de ACC e β -oxidação, respectivamente (CHENG et al., 2014; FERNADES; ALBUQUERQUE; MOREIRA, 2008). Apesar das evidências que descrevem sua atuação como molécula sensibilizadora para insulina, pacientes com sensibilidade à insulina afetada apresentam níveis circulantes reduzidos dessa adipocina quando comparado a sujeitos eutróficos (LAGO et al., 2007; SADA et al., 2006; SOWERS, 2008).

Em adição, essa adipocina também possui efeitos antiinflamatórios e cardioprotetores. Nos macrófagos, inibe a fagocitose e a produção de citocinas (LAGO et al., 2007) e participa da polarização de M1 para M2, suprimindo a ativação de M1 e promovendo a proliferação de M2 (LUO; LIU, 2016), fenômeno fundamental na regeneração. No sistema cardiovascular, a adiponectina reduz a expressão de moléculas de adesão, a formação de *foam cell* e proliferação das células musculares lisas, e aumenta o colesterol HDL, reduzindo assim o risco de aterosclerose (PETTO et al., 2015; VILLARREAL-MOLINA; ANTUNA-PUENTE, 2012).

Em 2009, foi demonstrado a capacidade da adiponectina globular em induzir a diferenciação *in vitro* de mioblastos, através da ativação de p38, Akt e AMPK e de uma

sinalização redox específica, culminando no aumento da expressão de marcadores músculo-específicos, como mMHC e caveolina-3 (FIASCHI et al., 2009). Dessa forma, pela primeira vez foi evidenciado o papel direto dessa adipocina no processo de regeneração muscular.

Após ativadas, as CS migram para o local danificado para diferenciar-se, onde podem formar novas fibras a partir da fusão com outras CS ou originar novos mionúcleos ao se fundir com as fibras locais danificadas (DUMONT et al., 2015). Fiaschi et al. (2012) demonstraram que a adiponectina atua nesse processo de migração das CS. *In vitro*, CS tratadas com gAd indicavam aumento da migração, processo favorecido pela produção da metaloproteinase-2, facilitando a degradação da MEC e a formação de miotubos. Observaram ainda que gAd promove fosforilação de p38 MAPK, molécula responsável pelo switch da quiescência para a ativação das CS (JONES et al., 2005).

A adiponectina circulante, embora os adipócitos sejam os principais produtores também pode ser produzida por outros tipos celulares, tais como glândula pituitária, endotélio e hepatócitos, além das células satélites (FIASCHI et al., 2012). As CS produzem adiponectina de comprimento total, porém essa demonstrou menor eficácia na indução da migração, sugerindo que a proteólise de fAd seja necessária para maximizar os efeitos da adiponectina. Ambos trabalhos de Fiaschi et al. (2009, 2012) indicam um sistema autócrino de produção de adiponectina, cuja secreção pode ser aumentada por estímulos inflamatórios, por exemplo, conduzindo a uma resposta exarcebada e aumento dos seus efeitos.

Ainda, o mesmo grupo de pesquisa observou que a gAd é capaz de aumentar a diferenciação miogênica por mesoangioblastos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ainda demonstram efeito positivo em músculos distróficos tratados *ex vivo* com mesoangioblastos e gAd (FIASCHI et al., 2010). Tendo em vista a importância da adiponectina no processo miogênico *in vitro*, este presente trabalho investigou a regeneração após lesão *in vivo*, buscando compreender melhor a atuação dessa adipocina durante esse processo.

2 JUSTIFICATIVA

O processo de regeneração muscular é importante para a manutenção da homeostasia deste tecido. Além disso, muitos processos fisiológicos como o envelhecimento, ou patológico, como diversas miopatias apresentam diminuição na eficiência deste processo.

Dessa forma, o conhecimento dos mecanismos de homeostase, manutenção e regeneração é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Por isso compreender o real papel dessa adipocinas e seus mecanismos de ação podem atuar como uma nova ferramenta para o tratamento de doenças musculares.

Ainda há muitas dúvidas sobre a ação da adiponectina na regeneração *in vivo* e a falta de dados na literatura indica que estudos são necessários para o esclarecimento, como, por exemplo, do significado funcional da adiponectina ou ainda compreender como ocorre a modulação da regeneração, se essa existir.

3 OBJETIVO

Avaliar a regeneração muscular em camundongos deficientes de adiponectina.

3.1 *Objetivos específicos*

Identificar se a deleção de adiponectina é capaz de modificar o processo de regeneração muscular após lesão química, avaliando:

- A característica da extensão da lesão e do processo regenerativo através da coloração hematoxilina-eosina;
- A capacidade de maturação das fibras musculares através da expressão gênica de desmina e medição da área de secção transversal, por meio de imunofluorescência para laminina;
- A deposição de colágeno ao longo do processo regenerativo pela coloração de Picrosirius Red;
- O potencial de proliferação e diferenciação das células satélites através da análise da Pax7, MyoD, Miogenina, MRF4 e Myf5 por meio de expressão gênica (RT-qPCR);
- A resposta inflamatória da regeneração através de ELISA para citocinas pró e anti-inflamatórias e expressão gênica de marcadores de macrófagos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (WT), provenientes do Biotério Central FMUSP (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), e camundongos deficientes em adiponectina (AdKO), provenientes do Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, com idade entre 8 e 10 semanas. Os animais AdKO foram gerados e obtidos da Jackson Laboratory, sendo considerados animais nocaute total. Todos os animais foram mantidos em gaiolas (no máximo 4 animais por gaiola) no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luminosidade claro/escuro invertido (12/12h), onde receberam dieta normal (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libitum*. Este experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (protocolo nº 4257270218).

4.1 *Protocolo experimental: indução de lesão química com BaCl₂*

Para realização do experimento foram utilizados os seguintes grupos experimentais para ambos genótipos:

- Controle (CT): músculo não lesionado;
- 3 dias (3d): músculo lesionado e coletado três dias após;
- 7 dias (7d): músculo lesionado e coletado sete dias após;
- 14 dias (14d): músculo lesionado e coletado quatorze dias após.

Antes da indução da lesão, os camundongos foram anestesiados por inalação com isoflurano embebido em algodão e, a seguir, foi injetado no músculo tibial anterior (TA) esquerdo, 50 μL de BaCl_2 a 1,2% dissolvido em solução salina de tampão fosfato estéril (PBS) (HARDY et al., 2016; SRIKUEA; HIRUNSAI, 2016), com o auxílio de seringa 0,5 mL (Figura 5). O músculo TA direito foi utilizado como controle, não sendo lesionado.

Após 3, 7 e 14 dias do protocolo de lesão, os camundongos C57BL/6 e nocaute para adiponectina foram eutanasiados. Os animais foram colocados em uma caixa hermeticamente fechada e transparente, contendo algodão embebido com isofluorano, e seguida, foram decapitados.



Figura 5. Procedimento de indução de lesão química. Os animais foram previamente anestesiados com gaze embebida com isofluorano em vidro hermeticamente fechado. Em seguida, com o animal deitado, os pelos da pata esquerda eram retirados para facilitar a injeção na região central do tibial anterior. A todo momento, a anestesia foi controlada pela observação dos movimentos respiratórios, retirando ou colocando na cabeça do animal um falcon com algodão embebido com isofluorano.

4.2 *Dados anatômicos*

Durante todo o período do experimento o peso dos animais foi monitorado. Ao final de cada período experimental, os animais foram pesados, anestesiados com isofluorano e eutanasiados por decapitação. Em seguida, os músculos tibial anterior esquerdo e direito foram coletados, pesados e submetidos às análises morfológica, molecular e proteica. Além disso, foram utilizados dois parâmetros para avaliar o índice de atrofia e/ou hipertrofia muscular: peso do músculo (mg) e área de secção transversal (AST) das fibras musculares (μm^2).

4.3 *Análise histológica*

Após a dissecação, os músculos foram fixados, sob um disco de cortiça, com O.C.T. Compound (Tissue-Tek®, Sakura® Finetek, CA, USA) e Tragaanth (Sigma Aldrich®, MO, USA) em posição vertical e envoltos por talco neutro, a fim de evitar

artefatos de congelamento. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C .

Para preparo das lâminas histológicas, os discos de cortiça foram fixados, verticalmente, com O.C.T na peça metálica e redonda do criostato. Cortes histológicos (7 e $10\mu\text{m}$) foram obtidos a -27°C e colados em lâminas quentes StarFrost (Knittel Glass®). Essas lâminas permaneceram em temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, foram armazenadas a -80°C .

As lâminas permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, até que fosse observado o descongelamento completo dos cortes ($10\mu\text{m}$). Posteriormente, foram incubadas com hematoxilina-eosina (HE) e *Picrosirius Red* para análise da morfologia geral e deposição de colágeno no tecido, respectivamente.

As imagens das lâminas coradas com picrosirius foram capturadas em microscópio Nikon DS-Ri7, enquanto as imagens de lâminas coradas com HE foram obtidas através do microscópio Nikon Eclipse E800. Foi contabilizado o número de células inflamatórias e de núcleos centralizados utilizando o *ImageJ*.

4.4 *Imunofluorescência*

Para marcação de laminina, as lâminas permaneceram em temperatura ambiente de 30-60 minutos para descongelamento completo dos cortes ($7\mu\text{m}$) e, em seguida, foram lavadas em PBS pH 7.4 e fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, foram incubadas em PBS pH 7.4 + glicina 0,1M por 10 minutos para inibir autofluorescência endógena. As lâminas foram então bloqueadas em solução bloqueio (PBS pH 7.4, 5% BSA, 5% SFB e 0,1% Triton X-100) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas overnight à 4°C com anticorpo anti-laminina rabbit (nb300-144) diluído 1:100 em PBS pH 7.4 + 5% BSA + 0,1% Triton X-100, lavadas e incubadas por 2 horas com anticorpo anti-rabbit diluído em PBS pH 7.4 + 5% BSA (1:50). Após isso, foram lavadas e montadas com vectashield conjugado com DAPI.

As imagens foram capturadas em microscópio Nikon Eclipse E800 e foi mensurada a AST de aproximadamente 900 fibras de 6 a 8 campos aleatórios por músculo/animal, através do software *MyoVision* (WEN et al., 2017).

4.5 *Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)*

As amostras musculares congeladas (20-50 mg) foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos (LNNH Uniscience) com 0,5 mL de tampão de extração (1% Triton X-100, 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4; 40 mM de NaCl, 2mM EDTA, 1,5 mM de ortovanadato de sódio, 50mM fluoreto de sódio, 0,1% SDS, 10mM pirofosfato de sódio, 10mM de β -glicerofosfato, 1% desoxicolato de sódio) contendo 10 ug/ml de inibidor de protease cocktail (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos e os sobrenadantes coletados para quantificação proteica pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA).

Foi determinado os níveis proteicos de IL-6 (Affymetrix®, eBioscience), IL-4, IL-10, IL-17, VEGF, TGF- β , MCP-1, TNF- α , IFN γ e IL-1 β por ELISA (DuoSet ELISA®, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Para análise do nível sérico de adiponectina (DuoSet ELISA®, R&D Systems), após eutanásia, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min à 4°C para coleta do soro e submetido ao ensaio.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas overnight com anticorpo de captura diluído em PBS pH 7.4. No dia seguinte, os poços foram bloqueados com reagente diluente (PBS pH 7.4 + 1% BSA) por 1 hora. Após o bloqueio, as amostras/curva padrão foram incubadas por 2 horas. Em seguida, o anticorpo de detecção foi incubado também por 2 horas e, logo depois, estreptovidina-HRP foi adicionada por 20 minutos no escuro, ambos diluídos em reagente diluente. Após esse tempo, foi adicionado o substrato TMB (Novex® by Life Technologies™) por 20-30 minutos e, em seguida, após adição de solução stop (H₂SO₄2N), a leitura foi realizada em espectrofotômetro Eon (BioTek) a 450 e 570 nm. A cada etapa antecedente às incubações, os poços foram lavados com solução wash buffer (PBS pH 7.4 + 0,05 % Tween® 20), exceto após adição de TMB, e todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente. Para IL-1 β e IFN- γ , o reagente diluente utilizado era composto por Trisma 1M + NaCl 5M + 0,01% BSA.

4.6 Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR)

A) Extração de RNA com trizol

Para a extração de RNA total, os músculos TA previamente congelados em nitrogênio líquido foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (LNNH Uniscience) em 0,5 mL de TRIzol (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA), conforme as especificações do fabricante. O RNA purificado foi ressuscendido em água ultrapura e armazenado a -80°C. Foi utilizado o espectrofotômetro Eon (Biotek) para verificar a qualidade da extração e quantificar o RNA. A qualidade do RNA foi obtida pelo gel de agarose, a partir da análise dos RNAs ribossomais.

B) Reação de Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied biosystems, Thermo Fischer Scientific), conforme especificação do fabricante. Foram utilizados 2µg/µL de RNA total obtido do músculo esquelético e o volume final da reação foi ajustado para 20 µL de água livre de Rnases.

C) Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A PCR em Tempo Real foi realizada com o *Fast SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 1µL do produto da transcrição reversa, 5,5 µL de *Fast SYBR® Green PCR Master*, primers “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas) e água-ultrapura suficiente para um volume final de 10 µL de solução. Os primers para os genes analisados estão listados no quadro 1. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* serão padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Ct comparativo.

Genes	GenBank	Primer SENSE (5'– 3')	Primer ANTISENSE (3'– 5')
TAF1	NM_013684.3	TTAGGCCTGGAAAGGTGTTACG	CCTCCAAACAGATGGACATTCT
F4/80	NM_001355722.1	GAATCCTGTGAAGATGTGGATG	GGCATGAGCAGCTGTAGGA
NFkB	NM_008689.2	CCAACTGGCAGGTATTTGAC	GCTGCTTCATGTCCCCTG
CD206	NM_008625.2	GACAGAGCCTGTGAGCAACC	ATGCCGTTTCCAGCCTTT
CD11c	NM_001363984.1	AGCCAGAGTGGGAAGTGAGA	AACTGGTCATGGCTGCTGA
Pax7	NM_011039.2	GACTCCGGATGTGGAGAAAA	GAGCACTCGGCTAATCGAAC
MyoD	NM_010866.2	AGTGAAAAGAAGCCCTGAAGC	GCATCTGAGTCGCCACTGTA
Miogenina	NM_031189.2	TCCCAACCCAGGAGATCATT	AGTTGGGCATGGTTTCGTCT
MyF5	NM_008656.5	AGGAAAAGAAGCCCTGAAGC	GCATCTGAGTCGCCACTGTA
MRF4	NM_008657.3	ATGGTACCCTATCCCCTTGC	ATCTTGGGGGCAGATTTTCT
Desmina	NM_010043.2	AGGCTCAAGGCCAAACTACA	TCTGCGCTCCAGGTCAATAC
AdipoR1	NM_001306069.1	CAGCCAAGGCTGAGGAAGA	CTTGAGAGGAAGCGTCAG
AdipoQ	NM_009605.5	GAGAAAGGAGATGCAGGTCTTC	ACGCTGAGCGATACATAAG

Quadro 1. Lista dos genes analisados com seu código GenBank e as respectivas sequências dos primers.

4.7 Análise estatística

A distribuição dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal foi utilizada a análise de variância para o modelo de dois fatores (ANOVA-*two way*), complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo os valores apresentados em média e desvio padrão (média \pm DP). Para analisar dados apenas entre os genótipos, foi utilizado teste T. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 6.0*

5 RESULTADOS

5.1 *Análise histológica*

Para avaliar os aspectos histológicos dos músculos TA de animais WT e AdKO cortes transversais foram corados com hematoxilina-eosina. A injeção com cloreto de bário foi capaz de lesionar os músculos esquerdos, enquanto que os contralaterais controles não sofreram alteração morfológica, demonstrando integridade tecidual (Figura 6).

Após a lesão, a estrutura muscular é perdida e com 3 dias já é possível verificar esse dano. Ambos genótipos apresentaram extensas áreas necróticas, com perda da definição dos limites das fibras e aumento de células, devido a resposta inflamatória, sem diferença significativa entre os grupos (Figura 6 e 7).

Após 7 dias, é notável a presença de fibras musculares em regeneração, com núcleos centralizados e tamanho reduzido. O grupo WT demonstra redução no infiltrado inflamatório, porém o mesmo não é observado para o grupo AdKO, que se mantém semelhante ao período de 3 dias (Figura 7). A quantificação de núcleos centralizados indica aumento em ambos genótipos, entretanto AdKO demonstra aumento maior comparado com WT, exibindo mais que 2 núcleos em algumas fibras (Figura 8B).

Com o processo de regeneração mais avançado, após 14 dias, o infiltrado inflamatório reduz no grupo KO, enquanto que o WT reduz ainda mais (Figura 6 e 7). As fibras musculares com núcleos centralizados são observadas em ambos genótipos, porém o número desses núcleos reduz nos AdKO enquanto WT demonstra número semelhante ao período de 7 dias (Figura 6 e 8B).

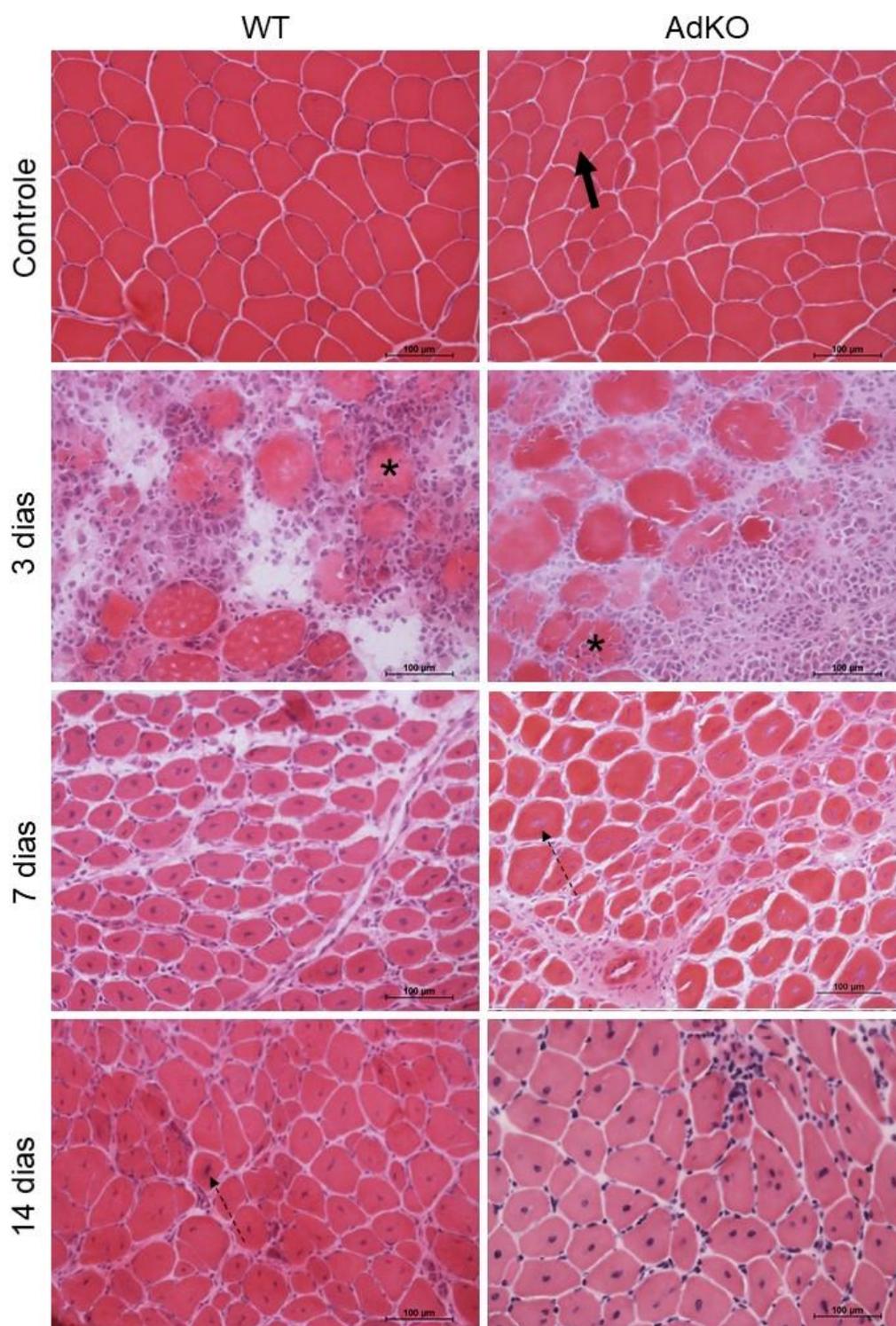


Figura 6. Cortes transversais corados com hematoxilina-eosina de camundongos WT e AdKO controles e após 3, 7 e 14 dias de lesão. Seta preta, núcleo central no controle AdKO; seta pontilhada, núcleos centralizados após lesão; asteriscos, fibras necróticas. Foi usado n=6 para WT e n=5 para KO. A barra corresponde a 100µm.

Curiosamente, o grupo controle de AdKO, que não recebeu injeção de cloreto de bário, apresentou núcleos centralizados em maior quantidade comparado com WT (Figura 6 – seta preta – e 8A).

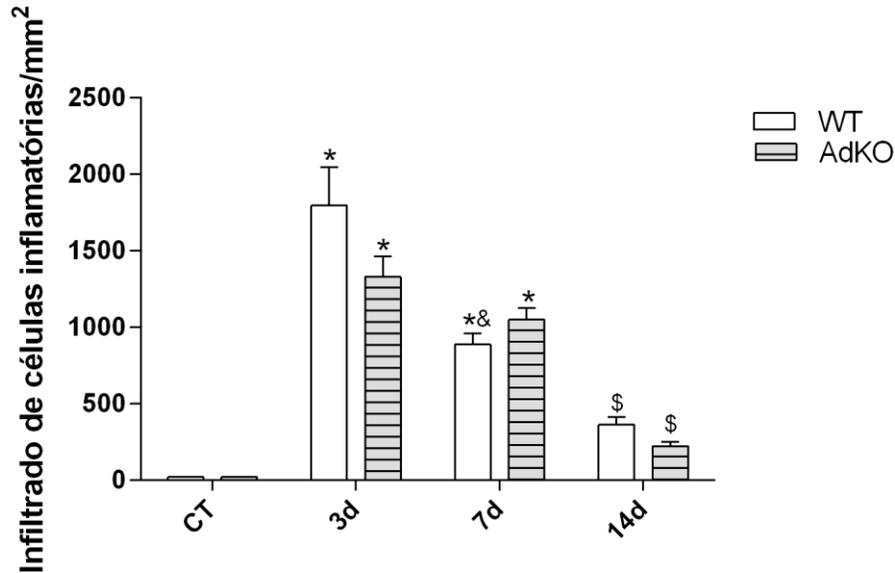


Figura 7. Infiltrado de células inflamatórias após lesão muscular. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; \$ diferença significativa comprado com o grupo 7d.

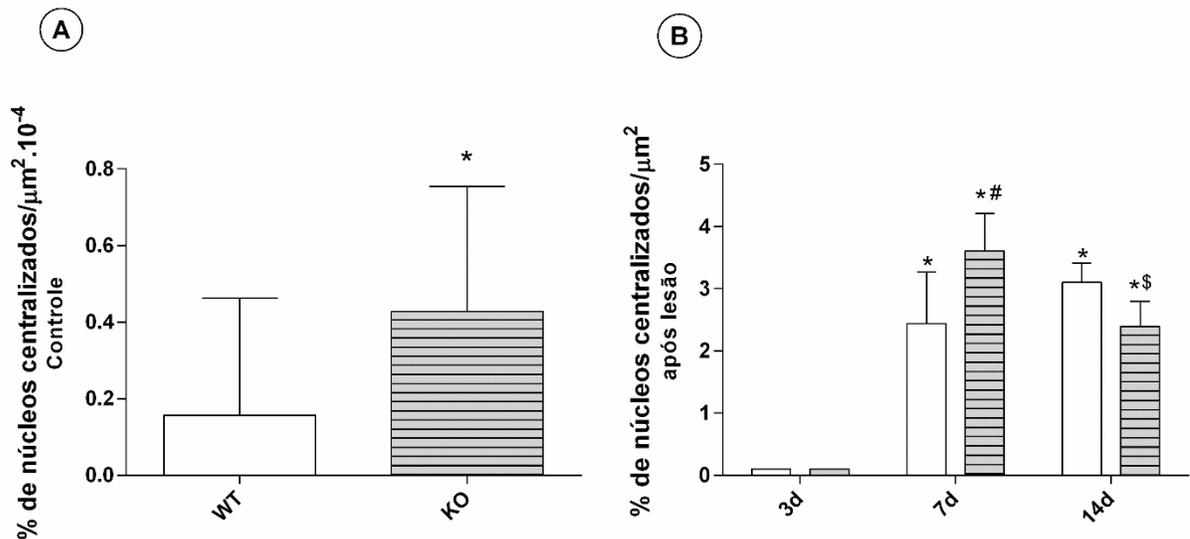


Figura 8. Porcentagem de núcleos centralizados nos grupos CT (A) e 3, 7 e 14 dias após lesão (B) em animais WT e AdKO. A) teste t; B) $n=6$ para WT e $n=5$ para AdKO. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; \$ diferença significativa comprado com o grupo 7d. Valores expressos em média \pm DP.

Após a fase de degeneração, o processo de reparação do tecido muscular é iniciado com a ativação das CS e deposição de colágeno na área a ser reparada, pelos fibroblastos que migram até o dano. Ambos genótipos apresentaram aumento na porcentagem de colágeno total após 3 dias da lesão, quantidade essa que reduz após 7 e 14 dias, sem diferença significativa entre si (Figura 9 e 10). A figura 10 indica que o aumento dessa deposição com 3 dias não é decorrente da deposição de colágeno I e III, uma vez que a luz polarizada apresenta fraca intensidade.

Apesar de não haver diferença significativa entre os genótipos, é perceptível que o grupo AdKO apresenta uma extensão de área regenerada com pouca deposição de colágeno enquanto que o grupo WT possui áreas ainda em regeneração com maior deposição de colágeno e outras áreas regeneradas com menor quantidade de colágeno (Figura 10).

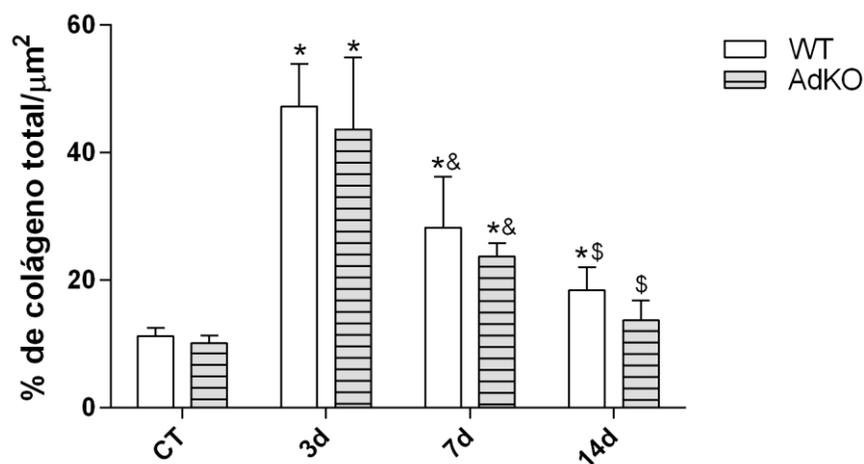


Figura 9. Porcentagem de colágeno total nos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. Foi utilizado n= 6/período para WT e n=5/período para AdKO. Valores expressos em média ± DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, p<0,05. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; \$ diferença significativa comprado com o grupo 7d.

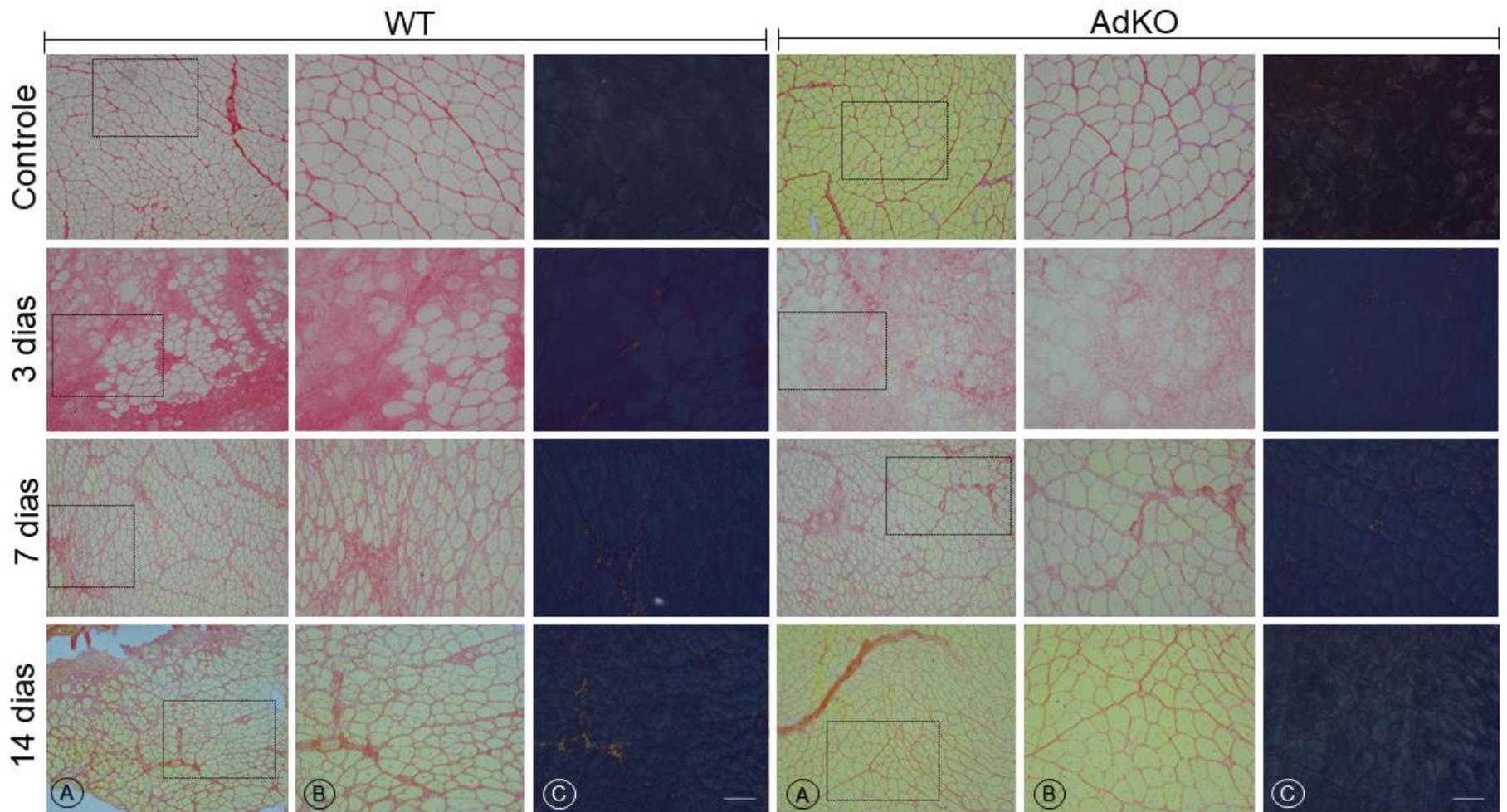


Figura 10. Cortes transversais de músculos tibiais anteriores do grupo controle e lesionados após 3, 7 e 14 dias de animais WT e AdKO submetidos a coloração de Picrosirius red. **A)** Aumento de 10x. **B)** Aumento de 20x na área destacada em A. **C)** Imagem de B sob luz polarizada. Foi utilizado n=6/período para WT e n=5/período para AdKO. As barras correspondem a 100µm.

5.2 Resposta inflamatória

Para avaliar os aspectos inflamatórios da regeneração em animais WT e AdKO foi analisado a expressão proteica de IL-1 β , TNF- α , IL-17, IFN γ , MCP-1, IL-10, IL-4 e IL-6, além da expressão gênica de marcadores macrofágicos, como NF κ B, F4/80, CD206 E CD11c.

IL-1 β apresentou aumento em ambos genótipos com 3 dias após lesão comparados com seus controles. Diferentemente do grupo KO que manteve a concentração semelhante ao controle após 7 dias, os animais KO mostraram aumento nessa citocina comparado com o grupo 3 dias, concentração essa que reduziu apenas após 14 dias. Em nenhum período experimental indicou diferença significativa entre os genótipos (Figura 11A).

O grupo controle dos animais KO apontam concentração menor de TNF- α no músculo comparado com os animais WT. Com a lesão, esses animais exibiram aumento de TNF- α somente aos 7 dias, enquanto que os animais WT apresentam queda na concentração ao terceiro dia seguido de aumento no dia 7. No período de 7 dias houve diferença significativa entre WT e KO, com menor concentração nos animais nocautes. Ao 14^o dia da lesão, os animais KO se mostraram capazes de restaurar a concentração inicial, com redução comparado ao 7^o dia. Porém, os animais WT reduzem ainda mais ao 14^o comparado com o seu controle inicial (Figura 11B).

Assim como para TNF- α , os animais KO também apontam concentração menor de IL-17 no grupo não lesionado comparado com WT. Com 3 dias, houve aumento nos animais WT, com diferença significativa entre WT e KO, que apontou níveis reduzidos semelhante ao seu controle. Após 7 dias, os níveis proteicos de IL-17 aumentaram nos KO em comparação com seu controle (Figura 11C).

A expressão encontrada para IFN γ foi bastante semelhante à de IL-17. Com níveis reduzidos no controle, KO apresentou aumento somente ao sétimo dia seguido de redução no 14^o dia. Enquanto que os animais WT apontaram alta concentração aos 3 dias comparados com o controle, seguido de normalização da expressão ao 7^o dia (Figura 11D).

MCP-1 apresentou altos níveis após 3 dias comparado com controle não lesionado, em ambos genótipos, porém o aumento foi maior no AdKO comparado com WT. Ao 7º dia, a concentração de MCP-1 reduziu aos níveis basais para ambos genótipos (Figura 12).

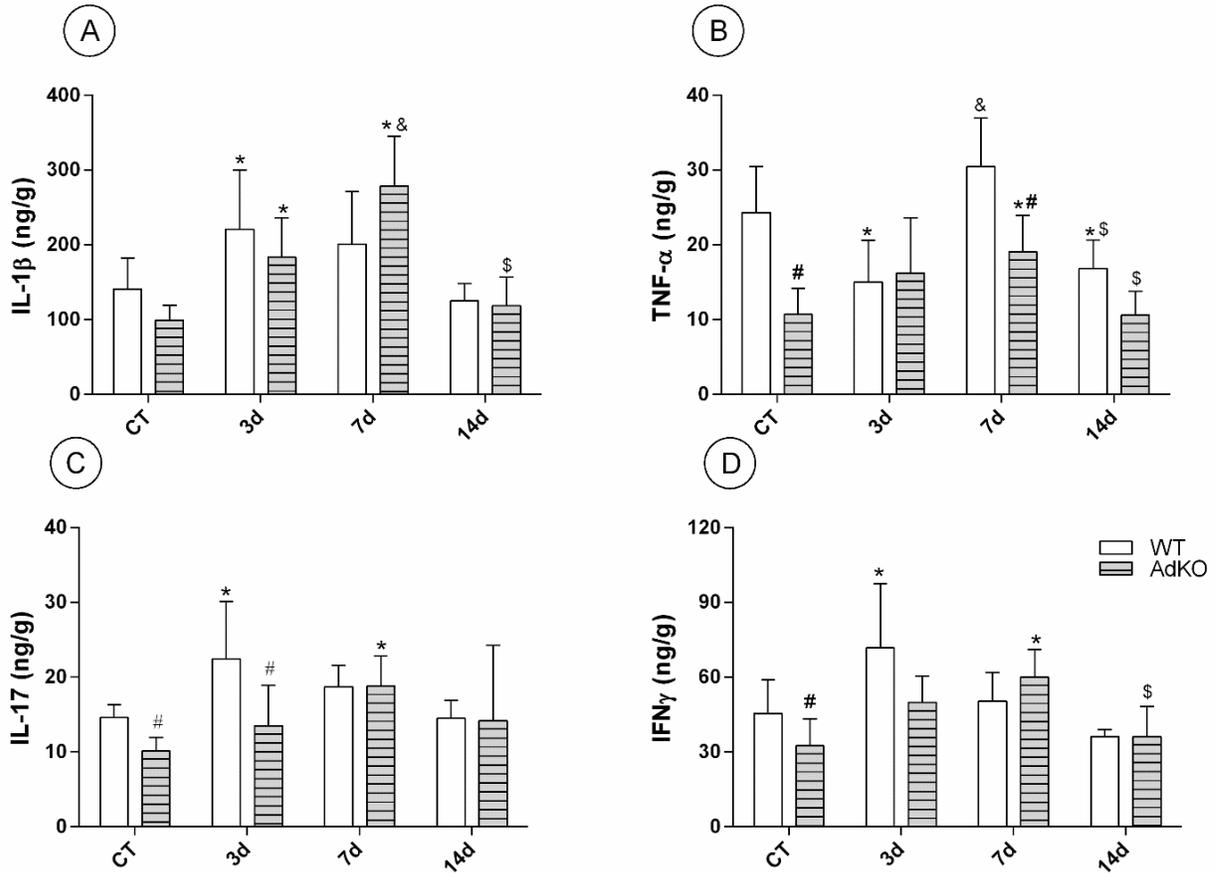


Figura 11. Níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. A) WT: n=17/control e n= 6/período; KO: n=21/control e 7,7 e 8 para os respectivos períodos. B) WT: n=9/control e n= 6/período; KO: n=22/control e 7,7 e 8 para os respectivos períodos. C) WT: n=10/control e n= 6/período; KO: n=21/control e 7,8 e 6 para os respectivos períodos. D) WT: n=18/control e n= 6/período; KO: n=22/control e 7,7 e 8 para os respectivos períodos. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; \$ diferença significativa comprado com o grupo 7d; # diferença significativa comparado com WT.

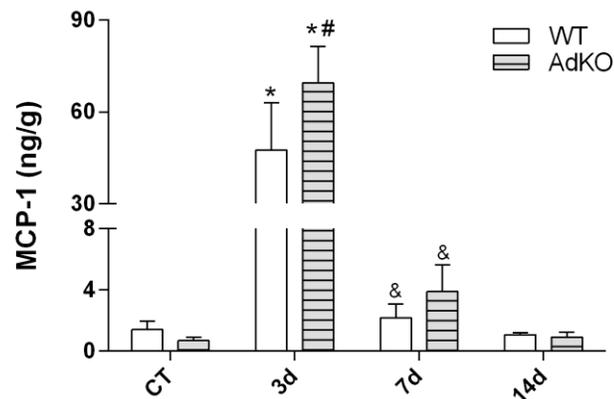


Figura 12. Nível proteico de MCP-1 dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. Foi utilizado n=17 e n=22 para os grupos controles de WT e AdKO, respectivamente e n=6/período para ambos genótipos. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; # diferença significativa comprado com WT.

Os animais KO apresentaram aumento de IL-4 após 7 dias comparado com seu controle, enquanto os animais WT não mostraram alteração nos níveis dessa citocina com a lesão (Figura 13A)

Os animais WT controles evidenciaram níveis maiores de IL-10 comparados aos controles de KO, o mesmo observado para outra citocinas deste trabalho. Enquanto os KO apresentaram aumento de IL-10 após a lesão, tanto no grupo 3 como no de 7 dias, acompanhado de redução aos 14 dias, os WT demonstraram uma expressão variada após a lesão, mas com diferença estatística ao 14^o dia, com uma redução comparado ao grupo de 7 dias (Figura 13B).

A figura 13 também traz a expressão proteica de IL-6. Assim como o observado para IL-10, IL-17, TNF- α e IFN γ , os animais KO controles também apresentaram níveis reduzidos comparados com os controles de WT. Para essa citocina, houve redução após 14 dias da lesão no WT comparado com o grupo de 7 dias. Porém, podemos notar que o a expressão para KO tende a aumentar após 3 e 7 dias com leve redução no 14^o dia (Figura 13C).

A análise da expressão gênica de CD11c demonstrou aumento para WT e AdKO após 3 dias comparado com seus controles (músculos não lesionados de ambos genótipos), seguido de redução ao 7^o dia comparado com o período de 3 dias. Ao 14^o dia, os animais AdKO apresentaram ainda redução significativa comparado com o grupo

de 7 dias. Não houve diferença significativa entre os genótipos em nenhum dos períodos analisados (Figura 14A)

Comparado com os grupos controles, ambos genótipos apresentaram aumento de CD206 após 3 dias. Entretanto, os animais AdKO indicaram expressão maior comparado com os animais WT. Ao longo da regeneração, houve redução da expressão gênica do marcador de M2 (Figura 14B).

O número de macrófagos no músculo aumentou com 3 dias de lesão, evidenciado pelo aumento da expressão de F4/80 tanto para WT como AdKO. Após 7 e 14 dias, a expressão reduziu em ambos genótipos. Porém, os animais WT ainda mantiveram expressão maior comparado com seu controle ao 7º dia. Não houve diferença significativa entre os genótipos nos períodos analisados (Figura 14C).

Não foram observadas alterações na expressão de NFkB em nenhum dos períodos e genótipos (Figura 14D).

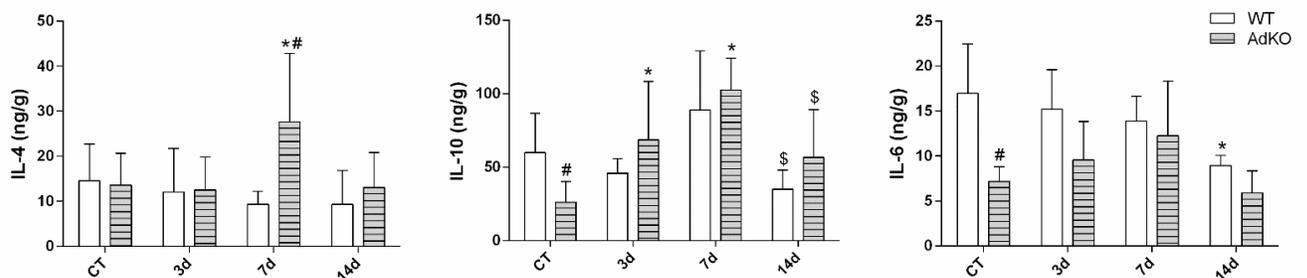


Figura 13. Níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. A) WT: n=16/control e n=5,6 e 5 para os respectivos períodos experimentais; KO: n=20/control e n=4/período. B) WT: n=17/control e n=5, 6 e 6 para os respectivos períodos experimentais; KO:18/control e n=7, 7 e 8 para os respectivos períodos experimentais. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; \$ diferença significativa comprado com o grupo 7d; # diferença significativa comparado com WT.

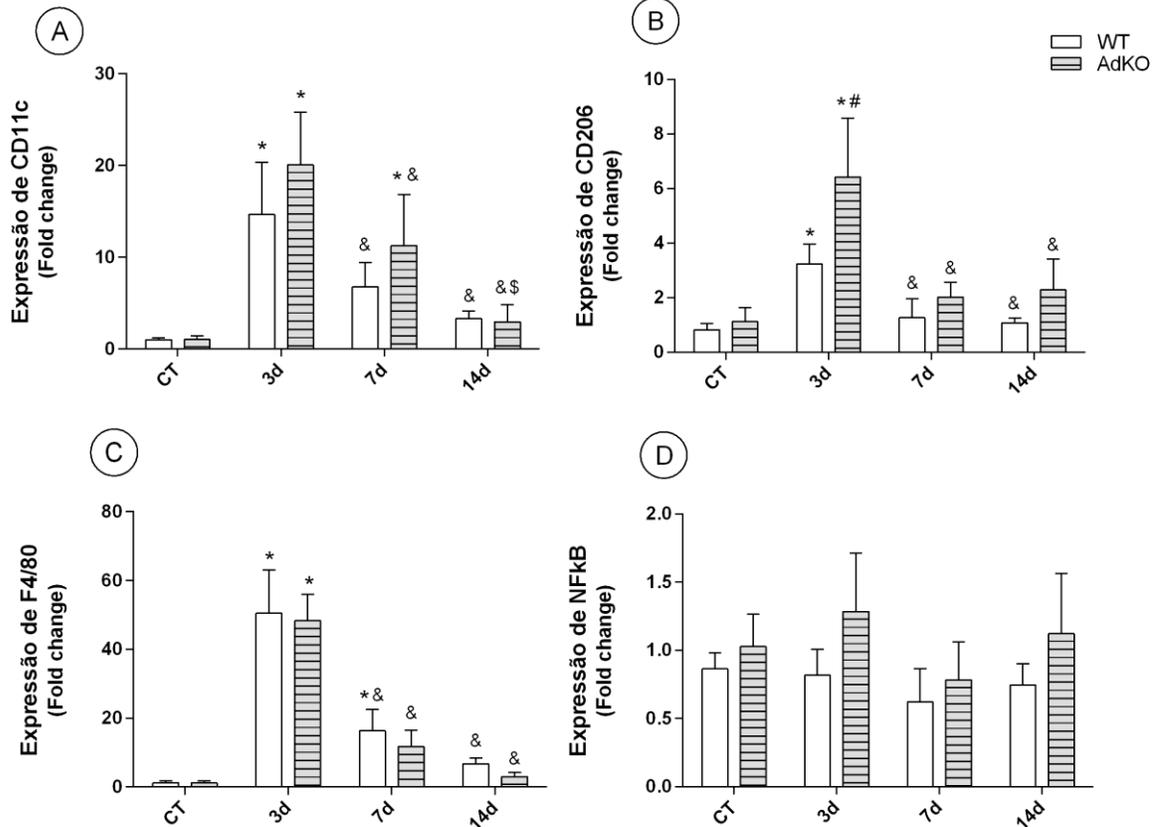


Figura 14. Expressão gênica de marcadores inflamatórios dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. A) CD11c; B) CD206; C) F4/80; D) NFkB. Foi utilizado n=6/período/genótipo. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; \$ diferença significativa comparado com o grupo 7d; # diferença significativa comprado com WT

5.3 Potencial miogênico

Para avaliar o potencial de proliferação e diferenciação das CS e comparar o processo de regeneração nos animais WT e AdKO foi analisado a expressão gênica de Pax7, MyoD, MyF5, Miogenina e MRF4.

Os animais WT apresentaram aumento na expressão de Pax7 após 3 dias da lesão, seguido de redução nos períodos de 7 e 14 dias. Nos animais AdKO a expressão de Pax7 manteve-se semelhante ao controle (músculo não lesionado), não indicando alteração em nenhum dos períodos analisados (Figura 15).

A expressão do fator de regulação MyoD apresentou aumento após a lesão, entretanto os animais AdKO demonstraram menor expressão comparado com os animais WT. Com o avanço do processo regenerativo, houve redução de MyoD em ambos os genótipos (Figura 16A).

Myf5 mostrou aumento progressivo ao longo dos períodos analisados, apresentando diferença significativa entre os respectivos grupos controles (músculo não lesionado de ambos os genótipos) e 14 dias após lesão em ambos genótipos (Figura 16B).

Miogenina e MRF4 apresentaram expressão inversa. Enquanto miogenina aumenta após 3 dias, a expressão de MRF4 reduz bruscamente. Com 3 dias, houve diferença significativa entre os genótipos na expressão de miogenina, que apresentou níveis menores nos animais AdKO comparado com WT. Ao longo do tempo, a expressão de miogenina reduziu (Figura 16C).

Após a queda aos 3 dias, os animais WT apresentaram aumento de MRF4 ao 7º dia e, apesar de não haver diferença significativa, pode ser observado que os animais AdKO também tiveram pequeno aumento em comparação com o grupo 3 dias (Figura 16D).

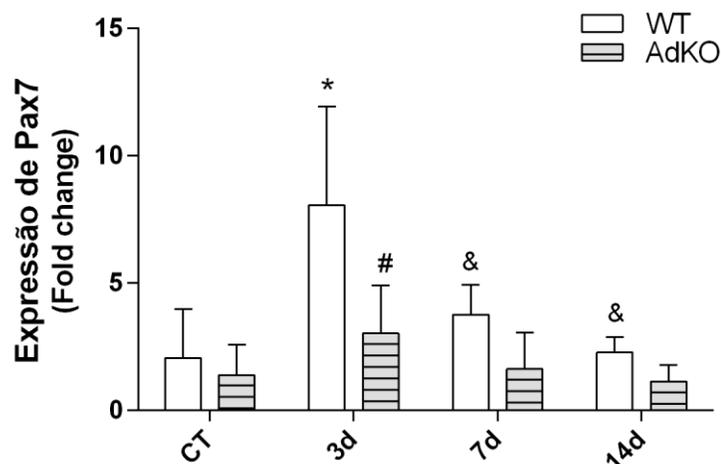


Figura 15. Expressão gênica de Pax7 dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. Foi utilizado n=6/período/genótipo. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; # diferença significativa comprado com WT.

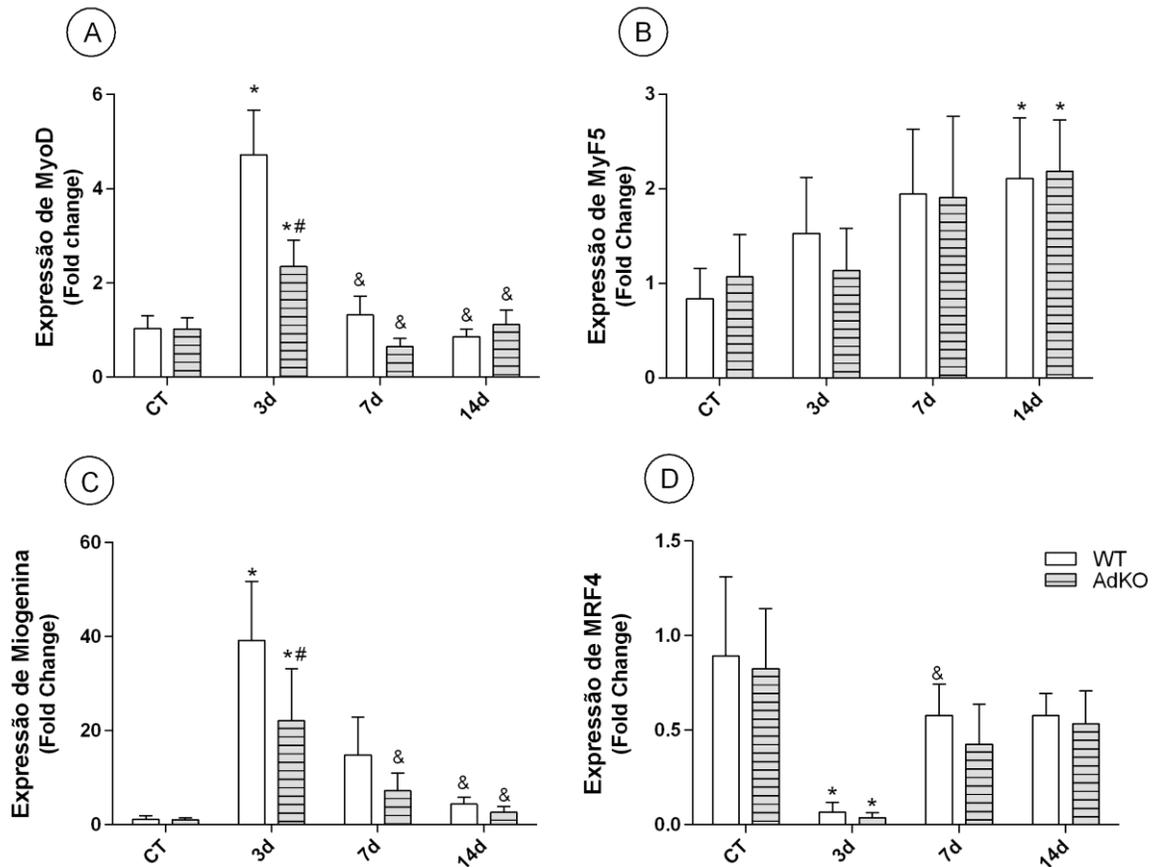


Figura 16. Expressão gênica dos MRFs dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. A) MyoD; B) MyF5; C) Miogenina; D) MRF4. Foi utilizado n=6/período/genótipo. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; # diferença significativa comparado com WT.

5.4 Maturação da fibra muscular

Para determinar a maturação das fibras musculares foi avaliado o peso do músculo, a AST, os níveis proteicos de TGF- β 1 e VEGF e a expressão gênica de desmina. Após 3 dias da lesão, houve redução da massa muscular relativa para ambos os genótipos comparados com os controles. Com 7 dias, o peso muscular no WT é recuperado em relação ao CT, enquanto que o AdKO segue com massa reduzida. Ao final dos 14 dias, ambos grupos apresentaram aumento no peso muscular em relação aos seus controles. Com exceção do CT, não houve diferença significativa entre WT e AdKO nos períodos analisados (Figura 17).

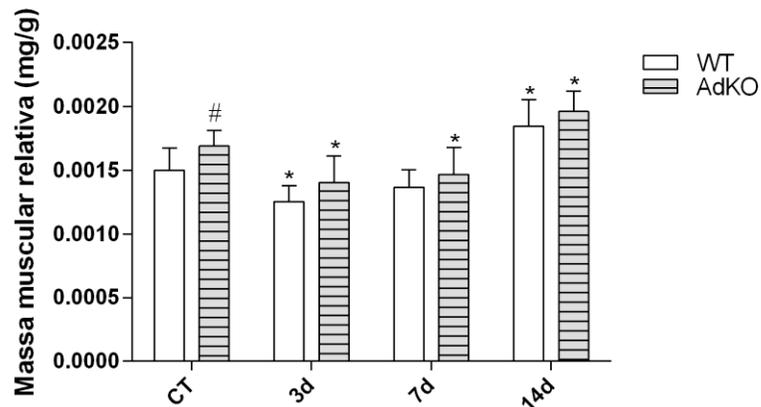


Figura 17. Massa muscular relativa dos grupos CT e 3, 7 e 15 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. Todos os animais coletados foram representados no gráfico. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey. * diferença significativa comparado com o grupo CT; # diferença significativa comparado com o grupo WT ($p < 0,05$).

A lesão muscular acarretou na redução da AST tanto em WT como AdKO comparado com seus controles, que é recuperada após 14 dias. A distribuição de frequência por tamanhos indica que a redução da AST após 7 dias é decorrente da maior presença de fibras menores. Apesar de não haver diferença entre WT e AdKO quanto a AST, pela frequência relativa é possível observar maior quantidade de fibras menores no WT após 7 e 14 dias comparado com AdKO (Figura 18 e 19).

De modo curioso, os animais não lesionados do grupo KO possuem mais fibras pequenas enquanto os animais WT apresentam um pouco mais de fibras maiores que $9000\mu\text{m}^2$ (Figura 18).

Não foi possível mensurar a AST do grupo de 3 dias para ambos genótipos devido a perda da definição do limite da fibra muscular decorrente da lesão no sarcoplasma.

Após 3 dias da lesão, houve queda na expressão gênica da desmina em ambos genótipos. Apesar de não haver diferença comparado com o grupo 3 dias, os animais AdKO apresentam pequeno aumento aos 7 dias, assim como os animais WT, que também demonstraram aumento com diferença significativa entre os grupos. Entretanto, os níveis de expressão de desmina são menores nos nocautes em comparação com os WT (Figura 20).

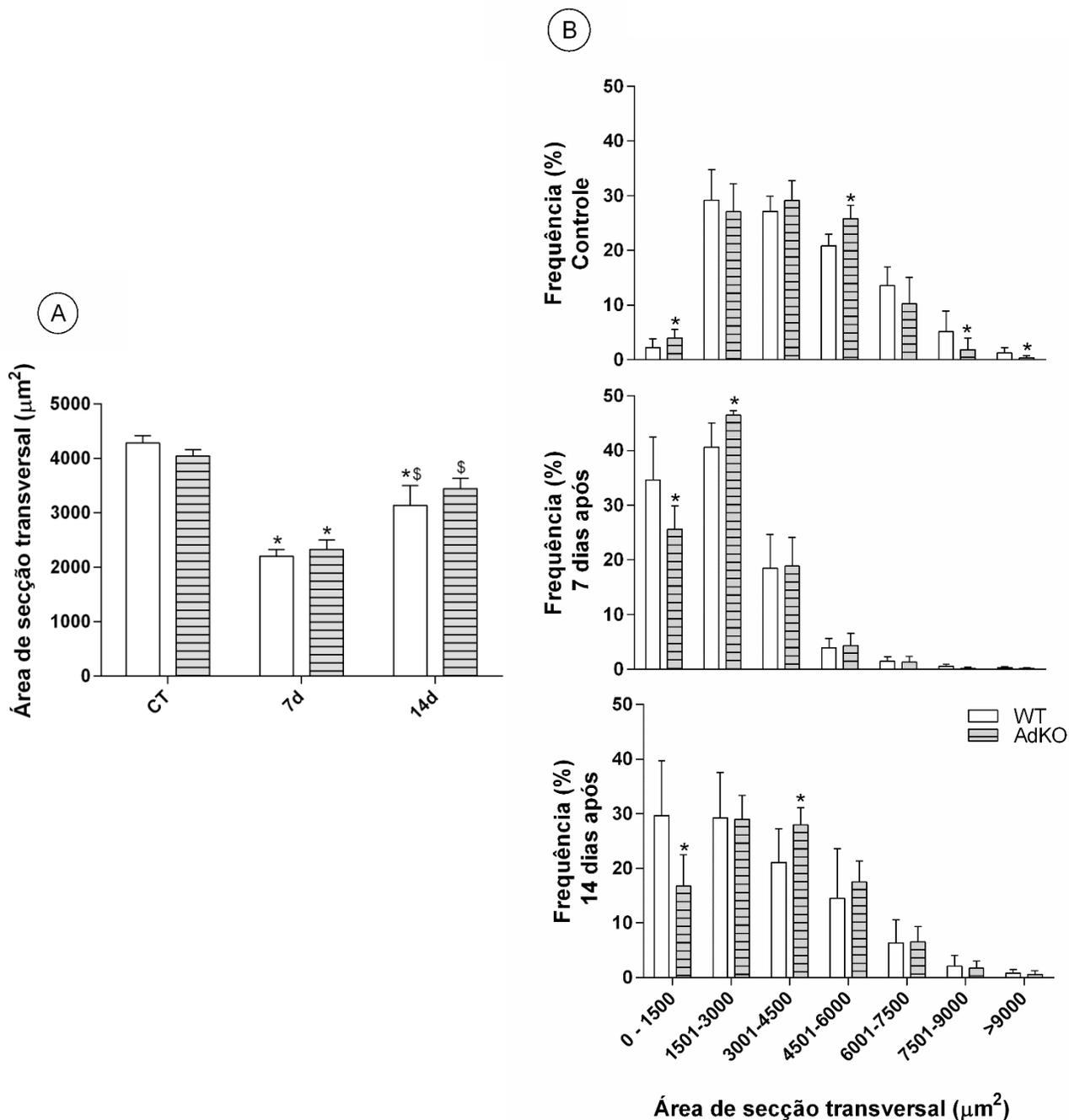


Figura 18. Área de secção transversal das fibras musculares (A) e distribuição de frequência (B) dos grupos CT, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. Valores expressos em média \pm DP. A) Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; § diferença significativa comparado com o grupo 7d B) Teste t entre cada classe determinada. * diferença significativa comparado com WT.

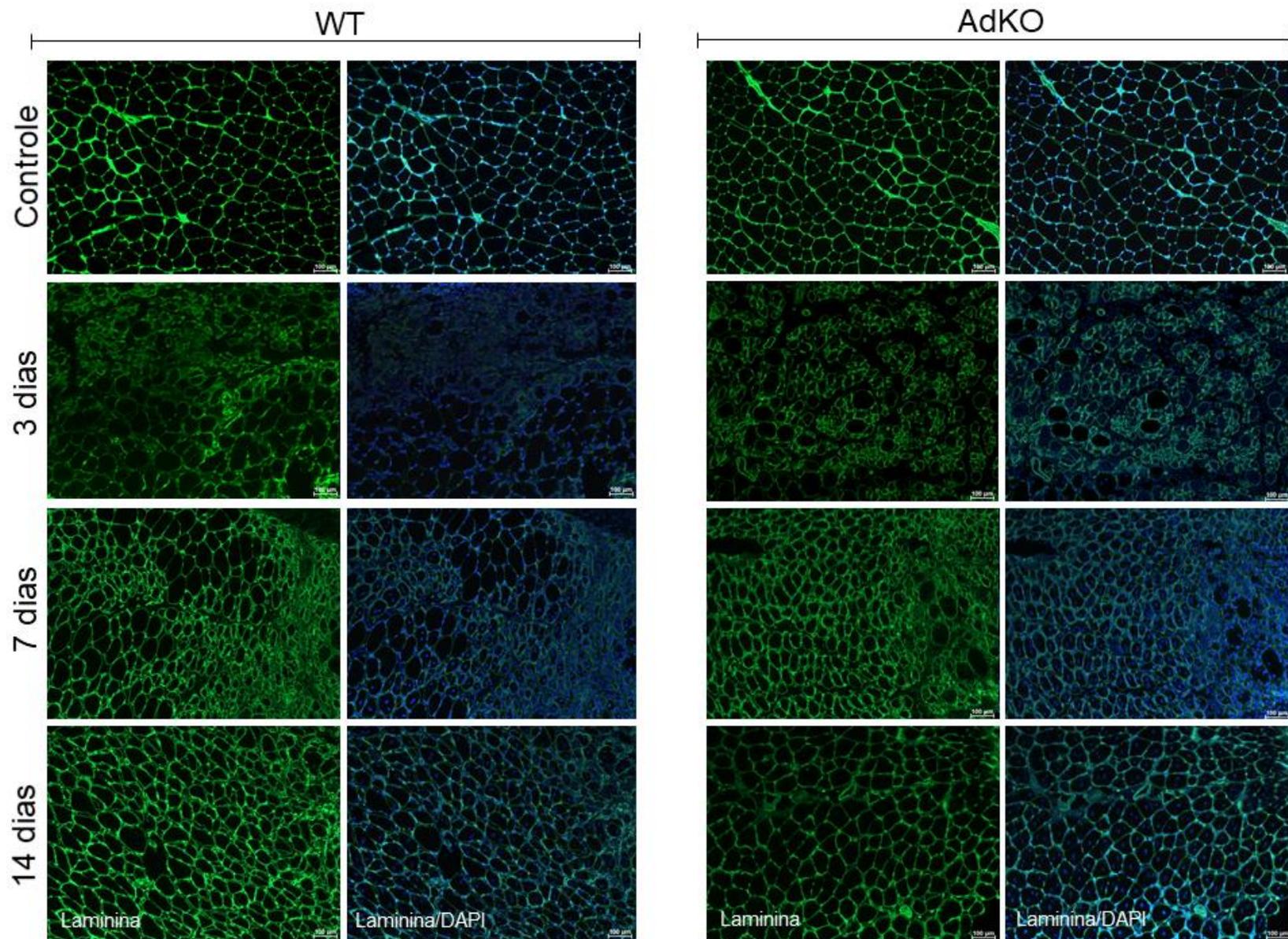


Figura 19. Imunofluorescência para laminina em cortes transversais dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após a lesão em animais WT e AdKO. Não foi possível mensurar a AST do grupo de 3 dias devido a perda do limite da fibra muscular. Foi utilizado n=6 para WT e n=5 para AdKO. A barra corresponde a 100µm e se aplica a todas as fotos

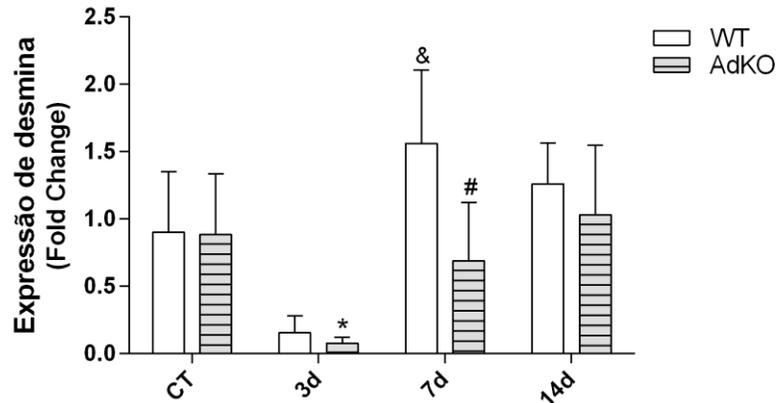


Figura 20. Expressão gênica de desmina nos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. Foi usado n=6/período/genótipo. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; # diferença significativa comprado com WT.

Além desses, a extensão de área regenerada, demonstrada pela coloração de Picrosirius Red, colabora na análise da capacidade de maturação, já que a deposição de colágeno deve ser temporária, devendo ser degradado para que as fibras sejam recuperadas. Nesse sentido, não houve alteração nos níveis basais de TGF- β 1 após lesão nos animais AdKO, porém os animais WT apresentaram aumento na concentração desse fator de crescimento ao 3º dia com queda nos outros períodos (Figura 21A).

Em relação ao VEGF, os animais AdKO mantiveram as concentrações basais após a lesão, que foi sempre menor comparada com o WT, com exceção do grupo de 3 dias. Nesse período experimental em questão, os animais WT apresentaram queda nos níveis se equiparando com os níveis dos AdKO (Figura 21B).

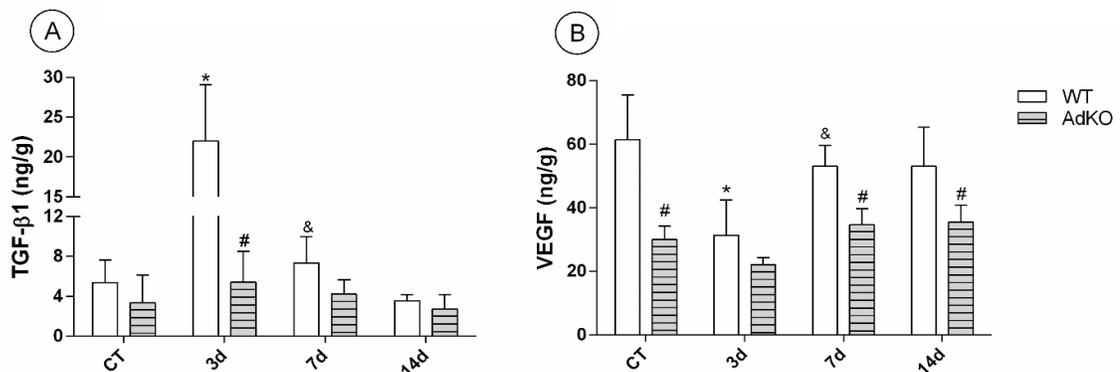


Figura 21. Níveis proteicos de TGF- β 1 e VEGF dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. A) WT: n=8/controlado e n=6,6 e 5 para os respectivos períodos experimentais; KO: n=22/controlado e n=7,8 e 7 para os respectivos períodos experimentais. B) WT: n=18/controlado e n=6/período; KO: n=21/controlado e n=7, 7 e 8 para os respectivos períodos experimentais. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; # diferença significativa comparado com WT.

5.5 *Expressão de adiponectina*

Para verificar a importância da presença da adiponectina na regeneração muscular foram analisados sua expressão gênica e do receptor AdipoR1 em todos os períodos experimentais, além da análise sérica de adiponectina.

Em todos os períodos analisados não houve diferença significativa na expressão do receptor AdipoR1 entre os genótipos, entretanto a expressão nos AdKO apresentou tendência de ser maior comparado com WT. Após 3 e 7 dias, ambos genótipos evidenciaram redução na expressão, não diferindo entre si (Figura 22A). No 7º dia a expressão gênica de adiponectina no músculo dos animais WT aumentou e se manteve alta 14 dias após a lesão. Nos animais AdKO não houve alteração da expressão, se mantendo praticamente nula em todos os períodos analisados (Figura 22B). Enquanto os animais WT apresentaram adiponectina no soro, os animais AdKO demonstraram níveis nulos dessa adipocina (Figura 23).

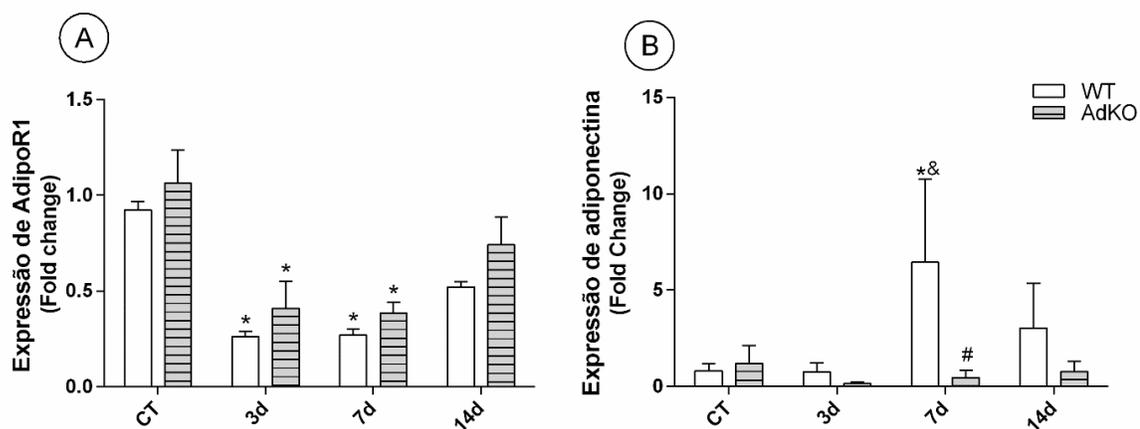


Figura 22. Expressão gênica de adiponectina (B) e seu receptor AdipoR1 (A) dos grupos CT, 3, 7 e 14 dias após lesão muscular em animais WT e AdKO. Foi utilizado n=6/período/genótipo. Valores expressos em média \pm DP. Anova 2-way, post-hoc Tukey, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com o grupo CT; & diferença significativa comparado com o grupo 3d; # diferença significativa comprado com WT.

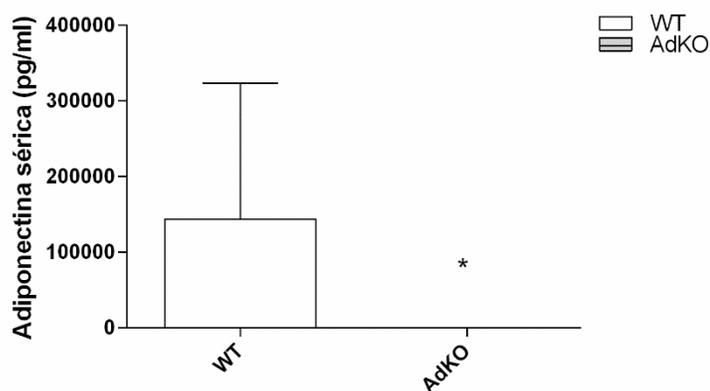


Figura 23. Nível sérico de adiponectina nos animais WT e AdKO. A análise foi realizada para todos os animais coletados ao longo do experimento. Teste t, $p < 0,05$. * diferença significativa comparado com WT.

6 DISCUSSÃO

Para compreender os efeitos *in vivo* da deficiência de adiponectina sobre o processo de regeneração muscular, administramos cloreto de bário na musculatura esquelética de camundongos deficientes em adiponectina. Nosso estudo mostrou que a deficiência em adiponectina não altera a maturação das fibras musculares após lesão, apesar de modificar a expressão de genes miogênicos e a cinética da reação inflamatória, além de demonstrar que em animais selvagens, essa adipocina é uma proteína importante no processo de regeneração principalmente na etapa de remodelamento do tecido.

Os músculos controles (não lesionados) exibiram diferenças na quantidade de núcleos centralizados e nas concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias, considerando os genótipos analisados. *In vitro*, a adiponectina demonstrou que apresenta papel no estímulo da diferenciação e fusão dos miotubos, principalmente na forma gAd (FIASCHI et al., 2009). Possivelmente, parte importante está relacionado a ativação da autofagia, já que *in vitro*, (GAMBERI et al., 2016) verificaram que animais deficientes em adiponectina apresentavam núcleos centralizados e fibras de tamanhos heterogêneos. Esses dados indicavam que a ausência da adiponectina acarretava um processo de diferenciação muscular prejudicada decorrente de um prejuízo na ativação da autofagia, processo importante na diferenciação dos mioblastos. Portanto, a adiponectina pode exercer papel fundamental na manutenção e homeostasia muscular, sendo sua ausência prejudicial ao tecido, com comprometimento da reação inflamatória.

Quanto aos dados morfométricos, os animais AdKO não apresentaram alterações significativas no processo de regeneração, já que tinham massa muscular, área de secção transversa, número de núcleos centralizados semelhantes aos animais WT. Isso na verdade pode indicar que *in vivo*, a falta de adiponectina desencadeia alterações celulares, como vimos na própria produção de citocinas, mas há uma adaptação desses animais para alcançar uma resposta semelhante após um insulto agudo. Interessante notar, que em uma linhagem especial de camundongos, que sofrem um processo de envelhecimento precoce e apresentam como consequência uma diminuição do número de células satélites, assim como na sua capacidade miogênica, os efeitos benéficos do

treinamento aeróbio sobre esses parâmetros foram severamente reduzidos quando o eixo adiponectina-adipoR1-AMPK foi inibido (INOUE et al., 2017). Isto pode indicar que em condições crônicas (como envelhecimento ou outras distrofias) a falta de adiponectina pode resultar em piora da resposta miogênica.

Além de atuar nos estágios iniciais da miogênese *in vitro*, verificamos ainda que a adiponectina pode ser essencial durante o processo regenerativo *in vivo*, demonstrado pela modulação da expressão gênica após lesão, com aumento nos períodos de 7 e 14 dias, indicando uma possível atuação nos estágios tardios da regeneração.

O dano muscular acarreta na ativação de uma cascata complexa de reações pelo sistema imunológico, culminando em um processo inflamatório inicial, seguido da fase de resolução da inflamação (PERANDINI et al., 2018). Após a lesão, ambos genótipos indicaram presença de infiltrado inflamatório, conforme descrito na literatura (FORBES; ROSENTHAL, 2014; SAINI et al., 2016). Apesar dos animais AdKO apresentarem níveis maiores de proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), ambos genótipos exibiram elevada expressão gênica de F4/80, marcador de macrófagos em geral, além de aumento observado no número de células infiltradas pelo HE.

Nossos resultados mostram que 72 horas após a lesão os animais selvagens apresentaram aumento de IL-1 β , IL-17 e IFN γ . Esses resultados estão de acordo com a literatura que estabelecem entre 48 a 72 horas o fim da fase inflamatória, começando então a fase de remodelamento, sendo responsável pela fase de ativação das células satélites (LI, 2003). Até por este efeito do TNF- α sobre a proliferação, autores sugerem que esse aumento ocorra na fase inicial do processo de regeneração (WARREN et al., 2002). O aumento do TNF- α nos animais selvagens aconteceu um pouco mais tardiamente do que o observado por Liu et al. (2018), que observaram a maior concentração de TNF- α no terceiro dia pós lesão. Dois motivos podem ter causado essas diferenças, a primeira é que ambos estudos medem a expressão gênica de TNF- α e o nosso a expressão proteica, além disso, no nosso modelo a lesão, como observado histologicamente é muito intensa. Já nos animais AdKO observamos diferenças substâncias na produção de citocinas, já que o pico da produção de citocinas inflamatórias se dá no sétimo dia, e os níveis basais de IL-17, IFN γ e TNF- α são menores nesses animais.

Ainda sobre essa primeira fase inflamatória, observamos um alto número de células imunitárias infiltradas na musculatura estriada esquelética, como fica evidenciado pelo corte histológico, assim como pelos marcadores de macrófagos, CD11c, F4/80 e CD206, além do aumento significativo na produção de MCP-1, 3 dias após a lesão, em ambos os grupos. Cabe ressaltar que tanto MCP-1, assim como o marcador de macrófago alternativo M2 foram maiores no grupo AdKO, 3 dias após a lesão. Esses resultados vão ao encontro da literatura que demonstram esse ponto temporal como sendo o início da transição entre a resposta inflamatória e a fase de resolução da inflamação (CHAZAUD, 2016).

Mesmo com as possíveis interferências na capacidade pró-inflamatória, os animais deficientes em adiponectina mostraram elevada expressão gênica de CD206, marcador específico para macrófagos M2, no período de 3 dias, com pico de IL-4 com 7 dias, secretada por essa população de macrófago. A IL-4 é uma citocina extremamente importante no processo de diferenciação das células satélites, este marcado aumento nos animais AdKO pode sugerir um processo de diferenciação até mais eficiente, já que esta citocina pode aumentar a expressão de miogenina (ARNOLD et al., 2007; DENG et al., 2012). Além desse aumento da IL-4, a IL-10 que tem um papel sinérgico a IL-4 sobre a diferenciação, também se encontra significativamente aumentada apenas no grupo AdKO no dia 7. No entanto, a concentração de IL-10 inicial era menor em relação aos animais selvagens, o que pode justificar o fato do grupo WT não ter apresentado aumento significativo no dia 7.

As razões destes achados podem estar na maior infiltração de macrófagos M2 que têm papel central no processo de diferenciação das células satélites em miofibras, por recrutar e participar da diferenciação de células T, como as Treg, responsáveis pela secreção de fatores de crescimento importantes para as CS (DOMINGUES-FARIA et al., 2016). Não podemos afirmar que, mesmo com uma resposta anti-inflamatória antecedente, a resposta pró-inflamatória ocorra em período anterior sem danos na capacidade fagocítica, entretanto podemos inferir que, no mínimo, esse mecanismo pró-inflamatório esteja descompensado pela ausência da adiponectina.

Macrófagos M2 também são responsáveis por suprimir a inflamação, através da liberação de IL-10 e TGF- β , e promover o remodelamento da MEC e a angiogênese

(DOMINGUES-FARIA et al., 2016; DUMONT et al., 2015; TIDBALL, 2011). Observamos que nos animais selvagens estes apresentaram um aumento de TGF- β , já no terceiro dia, além do aumento da expressão gênica de adiponectina no sétimo dia. Vale ressaltar que este aumento de TGF- β é essencial para o processo de remodelamento e este aumento pode explicar porque os animais selvagens tiveram seus níveis de citocinas pró-inflamatórias mais elevados no terceiro dia enquanto nos AdKO isso foi observado apenas no sétimo, já que o TGF- β exerce um papel inibitório na secreção de citocinas inflamatórias, acelera o processo fibrótico e de remodelamento (PERANDINI et al., 2018).

Em conjunto, esses dados da resposta inflamatória podem indicar que os animais AdKO possuem alteração da resposta inflamatória durante a regeneração muscular, com possível comprometimento da resposta inicial M1, porém essa não é suficiente para prejudicar o processo regenerativo final.

O aumento de adiponectina no grupo selvagem ocorre no sétimo dia, e como já demonstrado *in vitro*, esta adipocina apresenta papel importante na regulação da autofagia, que por sua vez leva ao aumento da diferenciação e fusão dos miotubos (FIASCHI et al., 2009, 2014). É interessante notar que os efeitos da adiponectina parecem ser sinérgicos a IL-4 e IL-10 e aconteceram na mesma etapa que os animais AdKO apresentaram o aumento destas citocinas (IL-4 e IL-10). Com isso, podemos inferir que os animais com deleção de adiponectina encontraram uma possível adaptação, com aumento do recrutamento de macrófagos M2 e produção de IL-4 e IL-10 para realizar com eficiência o processo de regeneração.

Curiosamente, a expressão gênica de Pax, MyoD e Miogenina mostram baixo potencial proliferativo e de diferenciação das CS nos camundongos AdKO. Entretanto, o número de núcleos centralizados observado com 7 dias pode indicar que a expressão gênica desses marcadores ocorre antecipadamente a 3 dias, levantando a hipótese de que células satélites são ativadas e se tornam exageradamente proliferativas num momento anterior a dos animais WT. Essa hipótese é apoiada pela semelhança na expressão de MRF4 e MyF5 em ambos genótipos.

Com base na recuperação de massa muscular após lesão, mesmo com as alterações ao longo do processo regenerativo, este ocorre sem grande comprometimento na deficiência de adiponectina. Após 7 e 14 dias, os camundongos AdKO apresentaram

menor frequência de fibras consideradas pequenas, ao contrário do observado para WT, indicando que a maturação nesses animais ocorre sem atrasos e sem aumento de fibrose tecidual, demonstrado pela deposição de colágeno reduzida. Porém, a expressão gênica reduzida de desmina nos AdKO comparado com WT pode indicar comprometimento na organização estrutural do sarcômero.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados encontrados neste trabalho demonstram que animais deficientes em adiponectina não apresentam comprometimento na regeneração muscular, apesar de demonstrarem possível comprometimento da resposta pró-inflamatória. É interessante notar que a falta de adiponectina subverteu a produção de citocinas pelo músculo esquelético, no entanto, ao contrário da nossa hipótese inicial, não houve uma exacerbação do processo inflamatório com atraso da regeneração, mostrando que possivelmente o aumento de macrófagos do tipo M2, permitiu esta adaptação, sem comprometer o processo final de regeneração, apesar da expressão gênica de marcadores de proliferação assim como de diferenciação, apresentarem uma resposta diferente do grupo selvagem.

ANEXOS

Para facilitar a visualização dos dados, foram esquematizadas tabelas com todos os resultados obtidos neste trabalho. As informações em azul representam os animais WT e as vermelhas indicam os animais AdKO. O tamanho das setas é proporcional a diferença encontrada entre os genótipos.

Tabela 1. Representação dos resultados sobre maturação das fibras musculares

Dados	Grupos		
	3 dias	7 dias	14 dias
Massa muscular			
AST			
Frequência relativa		+ fibras menores + fibras maiores	+ fibras menores + fibras maiores
Desmina			
TGF- β			
Deposição de colágeno			
VEGF			

Tabela 2. Representação dos resultados sobre potencial miogênico

Dados	Controle	Grupos		
		3 dias	7 dias	14 dias
Núcleos centralizados				
Pax-7				
Proliferação das CS	MyoD			
	MyF5			
Diferenciação das CS	Miogenina			
	MRF4			

Tabela 3. Representação dos resultados sobre a inflamação

Dados	Grupos		
	3 dias	7 dias	14 dias
IL-1 β			
TNF-			
IL-17			
IFN			
MCP-1			
IL-4			
IL-10			
IL-6			
CD11c			
CD206			
F4/80			

REFERÊNCIAS*

ALMEIDA, C. F. et al. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–14, 2016.

AMIN, R. H. et al. Selective activation of PPAR in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 1, p. 28–37, 2010.

ARNOLD, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 5, p. 1057–1069, 2007.

ASFOUR, H. A.; ALLOUH, M. Z.; SAID, R. S. Myogenic regulatory factors: The orchestrators of myogenesis after 30 years of discovery. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 2, p. 118–128, 2018.

AURORA, A. B.; OLSON, E. N. Immune modulation of stem cells and regeneration. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 1, p. 14–25, 2014.

BARBERI, L. et al. Age-dependent alteration in muscle regeneration: The critical role of tissue niche. **Biogerontology**, v. 14, n. 3, p. 273–292, 2013.

BEAUCHAMP, J. R. et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 6, p. 1221–1233, 2000.

BRACK, A. S. et al. Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 807–810, 10 ago. 2007.

BRACK, A. S. et al. A Temporal Switch from Notch to Wnt Signaling in Muscle Stem Cells Is Necessary for Normal Adult Myogenesis. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 1, p. 50–59, 2008.

BRAY, S. J. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2006.

BROOKS, S. V. Current Topics for Teaching Skeletal Muscle Physiology. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 171–182, 2003.

CANTINI, M. et al. Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 202, n. 3, p. 1688–1696, 1994.

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

* De acordo com; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

CHAZAUD, B. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: Application to exercise-induced muscle damage management. **Immunology and Cell Biology**, v. 94, n. 2, p. 140–145, 2016.

CHENG, K. K. Y. et al. Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 3–13, 2014.

CHEUNG, T. H. et al. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. **Nature**, v. 482, n. 7386, p. 524–528, 2012.

CONBOY, I. M.; RANDO, T. A. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination on postnatal myogenesis. **Developmental Cell**, v. 3, p. 397–409, 2002.

CORNELISON, D. D. W. et al. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. **Developmental Biology**, v. 224, n. 2, p. 122–137, 2000.

COSTAMAGNA, D. et al. Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

CRIST, C. G.; MONTARRAS, D.; BUCKINGHAM, M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 1, p. 118–126, 2012.

DELLAVALLE, A. et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 255–267, 2007.

DENG, B. et al. IL-10 Triggers Changes in Macrophage Phenotype That Promote Muscle Growth and Regeneration. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 7, p. 3669–3680, 2012.

DOMINGUES-FARIA, C. et al. Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. **Ageing Research Reviews**, v. 26, p. 22–36, 2016.

DUMONT, N. A. et al. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. July, p. 1027–1059, 2015.

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

FAVIER, F. B.; BENOIT, H.; FREYSSENET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 456, n. 3, p. 587–600, 2008.

FERNADES, T.; ALBUQUERQUE, R.; MOREIRA, A. Acções Cardiovasculares da Adiponectina: Implicações fisiopatológicas. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 27, n. 11, p. 1431–1449, 2008.

FERRARI, R. J. et al. Processo De Regeneração Na Lesão Muscular: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 18, n. 2, p. 63–71, 2005.

FIASCHI, T. et al. Globular adiponectin induces differentiation and fusion of skeletal muscle cells. **Cell Research**, v. 19, n. 5, p. 584–597, 2009.

FIASCHI, T. et al. Globular Adiponectin as a Complete Mesoangioblast Regulator: Role in Proliferation, Survival, Motility, and Skeletal Muscle Differentiation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 3, p. 848–859, 2010.

FIASCHI, T. et al. Globular adiponectin activates motility and regenerative traits of muscle satellite cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2012.

FIASCHI, T. et al. Adiponectin as a tissue regenerating hormone: More than a metabolic function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 10, p. 1917–1925, 2014.

FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 146, p. 159–216, 2003.

FORBES, S. J.; ROSENTHAL, N. Preparing the ground for tissue regeneration: From mechanism to therapy. **Nature Medicine**, v. 20, n. 8, p. 857–869, 2014.

FOSCHINI, R. M. S. A.; RAMALHO, F. S.; BICAS, H. E. A. Células satélites musculares. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 4, p. 681–687, 2004.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 45, n. 2, p. 183–195, 2014.

GAL-LEVI, R. et al. Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1402, n. 1, p. 39–51, 1998.

GAMBERI, T. et al. Activation of autophagy by globular adiponectin is required for muscle differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 4, p. 694–702, 2016.

GAMBLE, H. J.; FENTON, J.; ALLSOPP, G. Electron microscope observations on human fetal striated muscle. **J Anat**, v. 126, n. Pt 3, p. 567–589, 1978.

GAUTEL, M. The sarcomeric cytoskeleton: Who picks up the strain? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 39–46, 2011.

GAYRAUD-MOREL, B. et al. Myf5 haploinsufficiency reveals distinct cell fate potentials for adult skeletal muscle stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 7, p. 1738–1749, 2012.

GHADGE, A. A.; KHAIRE, A. A.; KUVALEKAR, A. A. Adiponectin: A potential therapeutic target for metabolic syndrome. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, p. 1–8, 2018.

GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 1974–1984, out. 2005.

GOPINATH, S. D. et al. FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal. **Stem Cell Reports**, v. 2, n. 4, p. 414–426, 2014.

HARDY, D. et al. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. 1–24, 2016.

HARTLEY, R. S.; BANDMAN, E.; YABLONKA-REUVENI, Z. Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis. **Developmental Biology**, v. 153, n. 2, p. 206–216, 1992.

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

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M. et al. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 72, p. 10–18, 2017.

HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 4–5, p. 575–584, 2005.

HOPPELER, H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. **Int J Sports Med**, v. 7, p. 187–204, 1986.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10697–10703, 1996.

INOUE, A. et al. Exercise restores muscle stem cell mobilization, regenerative capacity and muscle metabolic alterations via adiponectin/AdipoR1 activation in SAMP10 mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 3, p. 370–385, 2017.

IRINTCHEV, A. et al. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. **Developmental Dynamics**, v. 199, n. 4, p. 326–337, 1994.

JIMÉNEZ-AMILBURU, V. et al. Insulin-like growth factors effects on the expression of

myogenic regulatory factors in gilthead sea bream muscle cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 188, n. 1, p. 151–158, 2012.

JOANISSE, S. et al. Skeletal Muscle Regeneration, Repair and Remodelling in Aging: The Importance of Muscle Stem Cells and Vascularization. **Gerontology**, v. 63, n. 1, p. 91–100, 2016.

JONES, N. C. et al. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. **Journal of Cellular Physiology**, v. 186, n. 1, p. 104–115, 2001.

JONES, N. C. et al. The p38 MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. **The Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 1, p. 105–116, 2005.

JUNQUEIRA, J. C.; CARNEIRO, J. Tecido Muscular. In: **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 183–203.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 3, p. 439–451, 2005.

KAHN, E. B.; SIMPSON, S. B. Satellite cells in mature, uninjured skeletal muscle of the lizard tail. **Developmental Biology**, v. 37, n. 1, p. 219–223, 1974.

KÄSTNER, S. et al. Gene Expression Patterns of the Fibroblast Growth Factors and Their Receptors During Myogenesis of Rat Satellite Cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1079–1096, 2000.

KATSIKI, N.; MANTZOROS, C.; MIKHAILIDIS, D. P. Adiponectin, lipids and atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 28, n. 4, p. 347–354, 2017.

KHARRAZ, Y. et al. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. **Mediators of Inflammation**, p. 1–9, 2013.

KUANG, S. et al. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. **Cell**, v. 129, n. May, p. 999–1010, 2007.

LAGO, F. et al. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 3, n. 12, p. 716–724, 2007.

LANGE, S.; EHLER, E.; GAUTEL, M. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 11–18, 2006.

LI, Y.-P. TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. **AJP: Cell Physiology**, v. 285, n. 2, p. C370–C376, 2003.

LIU, M.; LIU, F. Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 25–

31, 2014.

LIU, X. et al. Changes in inflammatory and oxidative stress factors and the protein synthesis pathway in injured skeletal muscle after contusion. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 2, p. 2196–2202, 2018.

LIU, Y.; SWEENEY, G. Adiponectin action in skeletal muscle. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 33–41, 2014.

LUO, D.; RENAULT, V. M.; RANDO, T. A. The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 4–5, p. 612–622, 2005.

LUO, Y.; LIU, M. Adiponectin: A versatile player of innate immunity. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 120–128, 2016.

MAEDA, K. et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 221, n. 2, p. 286–289, 1996.

MAGAUDDA, L. et al. Effects of Physical Exercise on Skeletal Muscle Fiber: Ultrastructural and Molecular Aspects. **Journal of Basic Appl Myol**, v. 1, n. 14, p. 17–21, 2004.

MAURO, A. Satellite Cell of Skeletal Muscle Fibers. **Brief Notes**, p. 493–995, 1961.

MEGENEY, L. A.; RUDNICKI, M. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 17, n. 3, p. 203–9, 1995a.

MEGENEY, L. A.; RUDNICKI, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 73, n. 9–10, p. 723–732, 1995b.

MILLER, K. J. et al. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 278, p. 174–181, 2000.

MITCHELL, K. J. et al. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 257–266, 2010.

MOLKENTIN, J. D.; OLSON, E. N. Defining the regulatory networks for muscle development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 6, n. 4, p. 445–453, ago. 1996.

MOTOHASHI, N.; ASAKURA, A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal.

Frontiers in Cell and Developmental Biology, v. 2, n. January, p. 1–11, 2014.

MOURA, N.; RICCI, M. Estudo Teórico Do Processo De Regeneração Do Tecido Muscular Esquelético Lesionado. **X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, p. 764–767, 2006.

MURPHY, M. M. et al. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. **Development**, v. 138, n. 17, p. 3625–3637, 2011.

MURRE, C. et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell**, v. 58, n. 3, p. 537–544, 1989.

NAKANO, Y. et al. Isolation and Characterization Protein Purified from Human of GBP28 , Plasma a Novel. **Journal of Biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 803–812, 1996.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. **Clinical Science**, v. 110, n. 3, p. 267–278, 2006.

PALLAFACCHINA, G.; BLAAUW, B.; SCHIAFFINO, S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. S12–S18, dez. 2013.

PERANDINI, L. A. et al. Chronic inflammation in skeletal muscle impairs satellite cells function during regeneration: can physical exercise restore the satellite cell niche? **FEBS Journal**, v. 285, n. 11, p. 1973–1984, 2018.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 6, p. 500–509, 2000.

PETTO, J. et al. Adiponectina : Caracterização , Ação Metabólica e Cardiovascular. **Internacional Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 28, n. 3, p. 101–109, 2015.

PILLON, N. J. et al. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 5, p. E453–E465, 2013.

RELAIX, F. Skeletal muscle progenitor cells: from embryo to adult. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1221–1225, 2006.

RELAIX, F. et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. **Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 1, p. 91–102, 2006.

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

ROBERTSON, T. A. et al. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. **Experimental cell research**, v. 207, n. 2, p. 321–331, 1993.

SABOURIN, L. A.; RUDNICKI, M. A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical Genetics**, v. 57, n. 1, p. 16–25, 2000.

SADA, K.-E. et al. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **The Journal of rheumatology**, v. 33, n. 8, p. 1545–52, 2006.

SAINI, J. et al. Regenerative function of immune system: Modulation of muscle stem cells. **Ageing Research Reviews**, v. 27, p. 67–76, 2016.

SASSOON, D. A. **Myogenic regulatory factors: Dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis** **Developmental Biology**, 1993.

SCHERER, P. E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746–26749, 1995.

SCHMIDT, K. et al. Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 29769–29775, 2003.

SEALE, P. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, v. 102, n. 6, p. 777–786, 2000.

SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. **Dev Biol**, v. 218, n. 2, p. 115–124, 2000.

SERRANO, A. L. et al. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 33–44, 2008.

SHULMAN, G. I. On diabetes: insulin resistance Cellular mechanisms of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 171–176, 2000.

SILVA, F. O. C. DA; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 13, n. 4, p. 320–328, 2011.

SNIJDERS, T. et al. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–21, 2015.

SOLEIMANI, V. D. et al. 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, 2012.

SOWERS, J. R. Endocrine Functions of Adipose Tissue: Focus on Adiponectin. **Clinical Cornerstone**, v. 9, n. 1, p. 32–40, 2008.

SRIKUEA, R.; HIRUNSAI, M. Effects of intramuscular administration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ during skeletal muscle regeneration on regenerative capacity, muscular fibrosis, and angiogenesis. **Journal of Applied Physiology**, v. 120, n. 12, p. 1381–1393, 2016.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Neutrophils Do Not Contribute To Local Tissue Damage , But Play a Key Role in Skeletal Muscle Regeneration , in Mice. **Muscle Nerve**, v. 28, p. 449–459, 2003.

TIDBALL, J. G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 2029–2062, 2011.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1173-87, 2010.

TIERNEY, M. T.; SACCO, A. Satellite Cell Heterogeneity in Skeletal Muscle Homeostasis. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 6, p. 434–444, 2016.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, 2006.
TURER, A. T.; SCHERER, P. E. Adiponectin: Mechanistic insights and clinical implications. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2319–2326, 2012.

VILLARREAL-MOLINA, M. T.; ANTUNA-PUENTE, B. Adiponectin: Anti-inflammatory and cardioprotective effects. **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2143–2149, 2012.

VON MALTZAHN, J. et al. Wnt signaling in myogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 11, p. 602–609, 2012.

VON MALTZAHN, J. et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 41, p. 16474–16479, 2013.

WAKI, H. et al. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 790–796, 2005.

WANG, X. F. et al. Adiponectin treatment attenuates inflammatory response during early sepsis in obese mice. **Journal of Inflammation Research**, v. 9, p. 167–174, 2016.

WARREN, G. L. et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 12, p. 1630–1632, 2002.

WEN, Y. et al. MyoVision: Software for Automated High-Content Analysis of Skeletal Muscle Immunohistochemistry. **Journal of Applied Physiology**, n. 859, p. jap.00762.2017, 2017.

YABLONKA-REUVENI, Z. et al. The Transition from Proliferation to Differentiation Is

Delayed in Satellite Cells from Mice Lacking MyoD. **Developmental Biology**, v. 210, n. 2, p. 440–455, 1999.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941–946, 2001.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 15–23, 2014.

YANG, W.; HU, P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 13, p. 25–32, 2018.

YOKOYAMA, T. et al. DA-Raf1, a competent intrinsic dominant-negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 5, p. 781–793, 2007.

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**, v. 72, p. 19–32, 2017.