AILMA OLIVEIRA DA PAIXÃO

MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À ATROFIA INDUZIDA POR PALMITATO EM CÉLULAS C2C12.

AILMA OLIVEIRA DA PAIXÃO

Mecanismos moleculares associados à atrofia induzida por palmitato em células C2C12.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

AILMA OLIVEIRA DA PAIXÃO

Mecanismos moleculares associados à atrofia induzida por palmitato em células C2C12.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Alice Cristina Rodrigues

Versão original

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)

Oliveira da Paixão, Ailma
Mecanismos moleculares associados à atrofia induzida por palmitato em células C2C12. / Ailma Oliveira da Paixão; orientadora Alice Cristina Rodrigues. -- São Paulo, 2018.
83 p.

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

1. Obesidade. 2. músculo esquelético. 3. atrofia. 4. microRNAs. I. Rodrigues, Alice Cristina , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ailma Oliveira da Paixão

Título da Dissertação: Mecanismos moleculares associados à atrofia induzida por palmitato em células C2C12.

Orientador: Prof(a). Dr(a). Alice Cristina Rodrigues

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, 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: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **812/2016** referente ao projeto intitulado: "***Análise do mecanismo de ação molecular pelo qual os miomiRs estão associados à resistência à insulina em linhagens de células C2C12***" sob a responsabilidade de ***Ailma Oliveira da Paixão*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Alice Cristina Rodrigues***, do Departamento de Farmacologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, meus heróis vivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Santa Terezinha por nunca me desampararem, por toda saúde e persistência para concluir meu trabalho.

Ao meus pais, Ari e Wilma, por todo amor, compreensão e incentivo, por cada palavra de conforto, eu jamais chegaria aqui sem vocês. Obrigada!

Aos meus irmãos e cunhadas meus grandes incentivadores.

A minha Orientadora Alice Cristina Rodrigues pelos ensinamentos, paciência, e por toda confiança depositada em mim.

A irmã que São Paulo me deu, Ligia (Liiii) você é a melhor housemate que alguém pode ter.

Aos meus amigos do lab. Farmacogenômica; Alexandre, Beatriz, Bruna, Erica, Karina, Lucas, Mariana com toda certeza deixaram essa caminhada menos árdua.

Aos melhores técnicos que um laboratório pode ter; Adilson e Sidney, muito obrigada por tudo, aprendi muito com vocês.

Aos amigos João Guilherme e Flavinha por toda ajuda oferecida.

Aos professores Luiz Roberto Britto, Lucia Lopes e Anselmo Moriscot que gentilmente cederam seus laboratórios para a realização de experimentos.

A Fapesp (**2016/09173-3**) e CAPES pelo apoio financeiro para a realização do presente projeto.

‘’Enfim, pus mão à obra e tinha tanta boa
vontade que consegui perfeitamente’’

Santa Terezinha do Menino Jesus.

RESUMO

PAIXÃO, A. O. **Mecanismos moleculares associados à atrofia induzida por palmitato em células C2C12,** 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O presente estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos pelo qual o ácido palmítico induz atrofia muscular ou prejudica a regeneração em células C2C12. Para avaliar o efeito do AP na formação dos miotubos, células C2C12 foram diferenciadas e tratadas com ácido palmítico (AP: 0, 100 e 150 μM) por 0-5 dias. Para indução *in vitro* de atrofia muscular os miotubos foram diferenciados por 5 dias e tratados com AP 100 μM ou veículo por 48h. Nos mioblastos em proliferação foram realizados os ensaios de MTT, LDH, TUNEL e curvas de crescimento para avaliar o efeito do AP na citotoxicidade e proliferação celular e ensaio de cicatrização para avaliar se o AP prejudica a regeneração de mioblastos. Após 1 a 5 dias de diferenciação e tratamento com AP, as concentrações de 100 e 150μM induziram nas células C2C12 redução no diâmetro e tamanho das fibras tipo 1 e tipo 2 formados sem afetar a viabilidade celular ou induzir apoptose na linhagem C2C12 em comparação ao controle. Entretanto, o tratamento com AP induziu a formação de um maior números de fibras MyHC tipo 2 e menor do tipo 1. Enquanto o AP na concentração de 100μM não afeta a proliferação celular, na concentração de 150μM o AP parece prejudicar a proliferação, e após lesão, não há cicatrização completa mesmo 16 horas da lesão. A expressão de RNAm dos marcadores miogênicos (MyoD, Mstn, Myf5, MyH7 e miomesina) e dos microRNAs específicos de músculo esquelético também foram avaliadas em miotubos diferenciados e tratados ou não com AP (1 - 5 dias). Observou-se que um padrão temporal alterado de expressão dos marcadores miogênicos e dos miR-1, miR-133a e miR-206, que, provavelmente, ocorre para manter a diferenciação celular. Após 1 dia de diferenciação e tratamento com AP 100 e 150μM, observou-se um amento na expressão de atrogin-1, possivelmente indicando uma maior degradação proteica. Já nas células diferenciadas por 5 dias e tratadas com AP por 48h, observamos redução do diâmetro dos miotubos, caracterizando o processo de atrofia, aumento no perfil de expressão dos miR-133a e 206 e não observamos alterações nas proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica analisadas. Em conclusão, Concluímos que a atrofia muscular esteja sendo mediada pelos microRNAs alterados entretanto não é mediada pela via ubiquitina-proteassoma.

Palavras-chave: Obesidade; músculo esquelético; atrofia; microRNAs

ABSTRACT

PAIXÃO, A. O. **Molecular mechanisms associated with palmitate-induced atrophy in C2C12 cells,** 2018. 82f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The present study aims to evaluate the mechanisms by which palmitic acid induces atrophy or affects regeneration of C2C12 cells. The effect of AP (0, 100 and 150 μM) on myotube formation of C2C12 cells were evaluated 0-5 days of differentiation. In order to induce muscular atrophy *in vitro,* myotubes were differentiated for 5 days and treated with AP 100 μM or vehicle for 48h. In proliferating myoblasts MTT, LDH and TUNEL assays and cellular growth curves were performed in AP or vehicle-treated C2C12 cells so as to evaluate cytotoxicity and cell proliferation and the healing assay to analyze myoblasts regeneration. After 1 to 5 days of differentiation and treatment with AP, 100 and 150μM concentrations induced a reduction in the size and diameter of type 1 and 2 fibers formed without affecting cell viability or induce aopotosis in C2C12 cell line in comparison to the control. However, AP induced an increase in MyHC type 2 fibers whether reduced MyHC type 1 fibers. While 100 μM AP did not affect cell proliferation, 150μM AP reduces C2C12 cellular proliferation, and after injury, the healing is not complete after 16h of the injury. mRNA expression of the myogenic markers (MyoD, Mstn, Myf5, MyH7 and miomesine) and of the muscle-specific microRNAs were evaluated in differentiated myotubes treated or not with AP (0-5 days). We observed an altered time pattern of expression of myogenic markers and of miR-1, miR-133a and miR-206, which probably occurs to maintain cell differentiation. After 1 day of differentiation and treatment with AP 100 and 150μM, it was observed an increased expression of atrogin-1, possibly indicating a greater protein degradation. After 5 days of differentiation and 48h-treatment with AP, we observed reduction of myotube diameter, characterizing the atrophy process, increased expression of miR-133a and 206, and no changes were observed in the proteins related to protein synthesis and degradation analyzed. In conclusion, AP reduces myotube differentiation inducing myotube atrophy by decreasing myogenic markers and accelerating protein degradation and promotes a change in type 1 and 2 fibers proportion. In myotubes, the mechanisms by wich AP induces myotube atrophy seems to involve an increase in miR-133a and miR-206 expression.

Keywords: Obesity; fatty acids; skeletal muscle; atrophy; microRNAs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da linhagem do musculo esquelético. 19
Figura 2. Organização do tecido muscular esquelético. 21
Figura 3. Organização do sarcômero. 22
Figura 4. Sistema actina/miosina. 23
Figura 5. Via de sinalização da insulina e IGF-1. 30
Figura 6. Biogênese dos microRNAs. 32
Figura 7. Esquema demonstrando a ligação do miRNA maduro ao RNAm alvo. 33
Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental e dos métodos que foram utilizados. 38
Figura 9. Ensaio de MTT (A) e LDH (B) em células C2C12 em proliferação por 72h. 45
Figura 10. Efeito de variáveis concentrações de ácido palmítico na proliferação celular de células C2C12 no período de 24-72h. 47
Figura 11. Efeito de variáveis concentrações de ácido palmítico na proliferação celular de células C2C12 no período de 24-72h. 47
Figura 12. Curva de crescimento das células C2C12 com ou sem tratmento com ácido palmítico. 48
Figura 13. Ensaio de cicatrização em C2C12 em meio de proliferação. 50
Figura 14. Ensaio de TUNEL em C2C12 tratadas por 24h em meio de proliferação. ... 51
Figura 15. Cultura de células C2C12 indiferenciadas (0d) e após 5 dias de diferenciação (5d) imunomarcadas com anti-MyHC-1 e MyHC-2. 52
Figura 16. Cultura de células C2C12 tratadas com ácido palmítico 0 a 150 µM e diferenciadas por 1-5 dias. 53
Figura 17. Miotubos tratados por 5 dias com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM), imunomarcados com anti-MyHC-1. 54
Figura 18. Miotubos tratados por 5 dias com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM), imunomarcados com anti-MyHC-2. 55
Figura 19. Diâmetro e comprimento dos miotubos das células tratadas com 5 dias de diferenciação e imunomarcadas com MyHC1. 56
Figura 20. Abundância de atrogin 1 em células C2C12. 59
Figura 21. Proteínas envolvidas com a síntese proteica. 59
Figura 22. Expressão mRNA dos marcadores de diferenciação tardia Myh7 e Miomesina em células diferenciadas por 5 dias e tratadas com ácido palmítico (100µM-150µM) ou veículo (0µM). 61
Figura 23. Expressão de mRNA dos fatores miogênicos em células diferenciadas por 5 dias e tratadas com ácido palmítico (100µM-150µM) ou veículo (0µM). 62
Figura 24. Expressão gênica dos miR-1, -133a e -206. 64
Figura 25. Esquema representativo do protocolo experimental e dos métodos que foram utilizados. 65

Figura 26. Miotubos diferenciados por 5 dias e tratados com ácido palmítico (100µM) ou veículo (etanol 0,19%) por 48h seguintes do quinto dia de diferenciação e imunomarcadas com anti-MyHC-1. 66
Figura 27. Miotubos diferenciados por 5 dias e tratados com ácido palmítico (100µM) ou veículo (etanol 0,19%) por 48h seguintes do quinto dia de diferenciação e imunomarcadas com anti-MyHC-2. 66
Figura 28. Comprimento e diâmetro dos miotubos diferenciados por 5 dias e posteriormente tratados por 48h com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100 µM).....68
Figura 29. Proteínas envolvidas com a degradação proteica..... .....**Erro! Indicador não definido.**
Figura 30. Proteínas envolvidas com a síntese proteica. 71
Figura 31. Expressão dos miR-1, -206, -208b, -133a, -499 e 23a**Erro! Indicador não definido.**3

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ActRI-Receptor activina tipo I

ActRII - Receptor activina tipo II

AKT-Protein kinase B

AP - Ácido palmítico

ATCC- American Type Culture Collection

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Bovine serum albumin

cDNA - DNA complementar

CR - Ceramida

DAG - Diacilglicerol

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - *Dulbecco'sModifiedEagleMedium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DM1-*Diabetes mellitus 1*

DM2 - *Diabetes mellitus 2*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FoxO -Forkhead box O3

IGF-1 - Insulin-like growth factor 1

IGF1-R - Insulin-like growth factor 1 receptor

IGF-2 - Insulin-like growth factor 2

IRS-1 - Insulin receptor substrate 1

LDH - Lactato desidrogenase

mA - Miliampère

MAFbx - muscle atrophy F-box

MD - Meio de diferenciação

MEf2-*Myocyteenhancer factor 2*

miRNAs- microRNAs

mL- Mililitro

mM- Milimolar

MP-Meio de proliferação

mTOR - Mammalian target of rapamycin

MRFs - Myogenic regulatory factors

Mstn- Miostatina

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio

MuRF1-muscle RING finger 1

MyF5 - *Myogenic factor 5*

Myf6- *Myogenic factor 6*

MyHC1 - myosin heavy chain 1

MyHC2 - myosin heavy chain 2

MyoD-Myogenic Differentiation 1

MyoG- Miogenina

ng- Nanograma

nm - Nanómetro

PBS - phospahte-buffered saline

PI3K – Fosfatidilinositol 3 kinase

PKB – Protein kinase B

Pri-miRNAs -microRNAs primários

Pré-miRNA - microRNA precursor

qPCR -PCR quantitativo

RI - Resistência à insulina

RISC - Complexo de Inativação Induzido por RNA

RNA -Ácido ribonucléico

SC -Soro de cavalo

SFB- Soro Fetal Bovino

SRFs- Fatores de resposta a soro

TA -Temperatura ambiente

TG - Triacilglicerol

TGF-β- Fator de crescimento tumoral β

UCP2 - uncoupling protein 2

µM- Micromolar

3' UTR- Região não traduzida 3'

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 ATROFIA MUSCULAR 24
1.2 FATORES TRANSCRICIONAIS REGULADORES DA MIOGÊNESE 27
1.3 VIAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO PROTEICA 28
1.4 MICRORNAS 30
1.5 MIOMIRS 33

2 OBJETIVO GERAL 36

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 36
2.1.1 AVALIAR SE O ÁCIDO PALMÍTICO NAS CONCENTRAÇÕES DE 100µM E 150µM ALTERA O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS C2C12. AVALIAMOS NAS CÉLULAS INDIFERENCIADAS (TEMPO 0) E DIFERENCIADAS COM 1 DIA, 2 DIAS, 3 DIAS, 4 DIAS E 5 DIAS, A EXPRESSÃO DE MIOMIRS, (MIR-1A, MIR-133A E MIR-206) POR PCR EM TEMPO REAL. E MARCADORES MIOGÊNICOS POR WESTERN BLOTTING NOS DIAS 1 E 5 E IMUNOFLUORESCÊNCIA NO DIA 5. 36
2.1.2 AVALIAR SE O ÁCIDO PALMÍTICO NAS CONCENTRAÇÕES DE 100µM E 150µM ALTERA NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO EM MIOBLASTOS C2C12. AVALIAMOS PELO ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO IN VITRO. 36
2.1.3 AVALIAR SE O ÁCIDO PALMÍTICO NA CONCENTRAÇÃO DE 100µM EM CÉLULAS JÁ DIFERENCIADAS ALTERA A EXPRESSÃO DE MICRORNAS E MARCADORES MIOGÊNICOS. AVALIAMOS EM CÉLULAS DIFERENCIADAS POR CINCO DIAS E TRATADAS NAS 48H SEGUINTES A EXPRESSÃO DOS MICRORNAS (MIR-1, MIR-133A, MIR-206, MIR-208B, MIR-499 E MIR-23A) POR PCR EM TEMPO REAL. MARCADORES MIOGÊNICOS WESTERN BLOTTING E IMUNOFLUORESCÊNCIA. 36

3 METODOLOGIA 37

3.1 CULTURA DE CÉLULAS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL 37
3.2 VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E CITOTOXICIDADE CELULAR 39
3.2.1 Curva de Crescimento 39
3.2.2 MTT 39
3.2.3 Citotoxicidade celular através do ensaio de LDH 40
3.3 MORFOLOGIA CELULAR 40
3.4 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO 40
3.5 ENSAIO DE TUNEL 41
3.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA 41
3.7. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA TOTAL 42

3.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS POR RT-PCR EM TEMPO REAL . 42
3.9 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNAM POR PCR EM TEMPO REAL 43
3.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING 44
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

4.1 ENSAIOS NO PROCESSO DE PROLIFERAÇÃO E CITOTOXICIDADE. 45
4.2 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO 49
4.3. ENSAIO TUNEL 50
..... 51
4.4 EFEITO DO ÁCIDO PALMÍTICO NA FORMAÇÃO DE MIOTUBOS 51
4.5 EFEITO DO ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE AS PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO IGF158
4.6 EFEITO DO ÁCIDO PALMÍTICO NOS MARCADORES MIOGÊNICOS 60
4.7 EFEITO DO ÁCIDO PALMÍTICO NA EXPRESSÃO DE MICRORNAS 62

5 RESULTADOS – PARTE II 65

5.1 EFEITO DO ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE AS PROTEÍNAS EM CÉLULAS DIFERENCIADAS POR CINCO DIAS 69
5.2 EFEITO DO ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE OS MICRORNAS EM CÉLULAS DIFERENCIADAS POR CINCO DIAS 72

6 CONCLUSÕES..... 75

REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

O caráter epidêmico que a obesidade adquiriu nas últimas décadas, vem levantando debates importantes, acerca dessa condição, devido à sua influência em diversas comorbidades encontradas na população (FINKELSTEIN *et al*., 2012; FINUCANE *et al*., 2011).

A obesidade é uma doença multifatorial e complexa que é definida como excesso de gordura no corpo (CONSTANTIN *et al*., 2010; FAROOQUI 2011). Além da expansão de tecido adiposo, ocorre acúmulo ectópico de gordura em tecidos não-adiposos, como músculo esquelético.

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano, cada músculo é formado por um grande número de fibras em contração, essas fibras são altamente heterogêneas devido às suas diferentes características bioquímicas, fisiológicas e anatômicas; as mesmas são formadas pela fusão de inúmeros progenitores miogênicos (BIRESSI *et al*., 2007).

A maior parte do músculo esquelético com exceção de alguns músculos craniofaciais deriva de progenitores presentes nos somitos. Somitos são estruturas segmentadas que se formam a partir do mesoderma paraxial, que se localizam em ambos os lados do tubo neural, cada somito se diferencia rapidamente em um esclerotómo ventral e um dermomiotomo dorsal (BIRESSI *et al*., 2007; SILVA & CARVALHO2007;SIEIRO-MOSTI *et al*., 2014).

O tecido muscular esquelético é determinado em etapas que envolvem diferentes tipos celulares; mioblastos embrionários, mioblastos fetais e células satélites **(Figura 1).** Essas células são liberadas durante o desenvolvimento por células que expressam Pax3 e Pax7. Em uma dessas etapas, conhecida como miogênese primária, progenitores miogênicos (mioblastos embrionários) migram do dermomiotomo e começam a se diferenciar em fibras musculares multinucleadas; as fibras primárias. Durante essa fase, os músculos consistem em um pequeno número de miotubos que aumentam progressivamente de tamanho e adquirem uma forma redonda (BIRESSI *et al*., 2007; LIEBER 2002).

Em um segundo estágio, os mioblastos fetais se fundem entre si, como também com fibras primárias, dando origem as fibras secundárias, essa fase é conhecida como miogênese secundária. Inicialmente, as fibras secundárias se formam no local de inervação da fibra primária e são circundadas pela mesma lâmina basal. As fibras secundárias permanecem ligadas às fibras primárias e, posteriormente, essas fibras alongam-se e tornam-se fibras independentes, que podem ser diferenciadas das fibras primárias pelo seu tamanho relativamente pequeno (BIRESSI *et al*., 2007; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO2007).

Em adultos, a classificação das fibras musculares baseia-se na velocidade de contração que depende principalmente da atividade ATPásica da isoforma de miosina predominante. As fibras primárias e secundárias diferem na expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC). As fibras primárias expressam MyHC1 originando fibras com fenótipo predominantemente lento enquanto que as fibras secundárias expressam MyHC2 originando fibras com fenótipo de contração rápida (BIRESSI *et al*., 2007; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO2007).

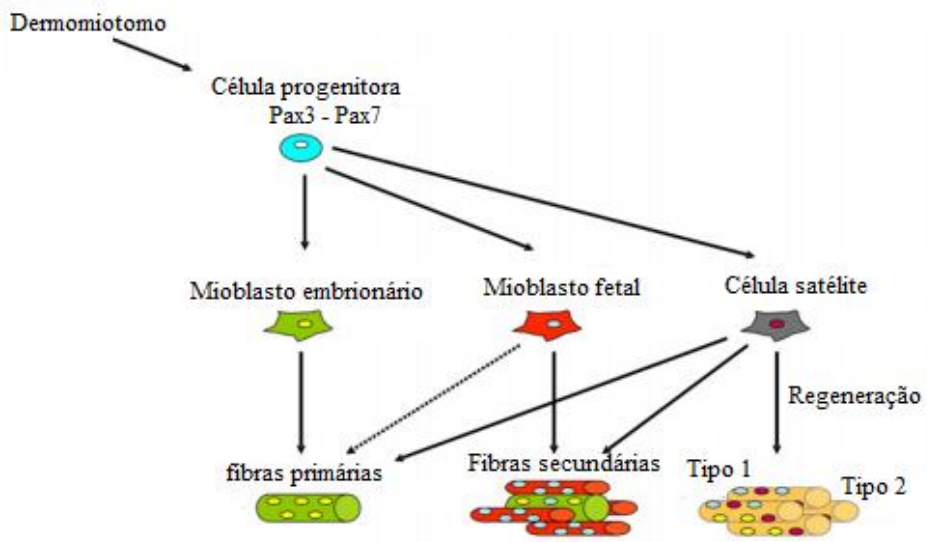


Figura 1. Representação da linhagem do musculo esquelético.
O dermomiotomo dá origem as células que expressam Pax3 / Pax7, estas por sua vez, liberam precursores musculares durante o desenvolvimento (mioblastos embrionários, fetais e células satélites). Os mioblastos embrionários e fetais dão origem a fibras do tipo 1 e 2, respectivamente. As células satélites são identificadas no final da miogênese secundária, e são responsáveis pelo crescimento pós-natal e regeneração. Adaptado de (BIRESSI *et al*., 2007).

É no final da miogênese secundária, que as células satélites podem ser identificadas morfologicamente. As células satélites são progenitores mononucleados que se localizam entre a lâmina basal e o sarcolema. Durante o desenvolvimento pós-natal estas células se dividem lentamente, uma parte da progênie se funde com fibras adjacentes contribuindo com novos núcleos para o crescimento das fibras, entretanto, no final do crescimento pós-natal essas células entram em fase de quiescência. Em casos de lesões tecidual ou em resposta a novas demandas de crescimento, essas células são ativadas e sofrem inúmeras divisões celulares e fundem-se com as fibras danificadas participando assim da regeneração celular, ou formam novas células. Uma fração dessas células retornam à quiescência, mantendo assim o pool progenitor (BIRESSI *et al*., 2007; SILVA &CARVALHO 2007).

Morfologicamente, o tecido muscular esquelético é constituído por feixes de células alongadas e multinucleadas, com 10 a 100 micrômetros de diâmetro e com variações no seu comprimento. As fibras musculares possuem numerosos núcleos que estão localizados na periferia da célula, abaixo da membrana plasmática e são ricas em filamentos proteicos, as chamadas miofibrilas, que conferem capacidade de contração ao músculo esquelético (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 202; SILVA & CARVALHO 2007).

No que se refere a sua organização, o tecido muscular esquelético possui três camadas de tecido conjuntivo; o epimísio que é a camada mais externa e recobre todo músculo por inteiro, o perimísio; que envolve o conjunto de feixes de fibras e o endomísio; camada mais interna que envolve individualmente cada fibra muscular (**Figura 2**). Essas camadas de tecido conjuntivo são de extrema importância para o músculo esquelético pois, são elas que mantem as fibras musculares unidas fazendo com que a contração consiga se propagar por todo músculo e outras estruturas como tendões e ossos (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

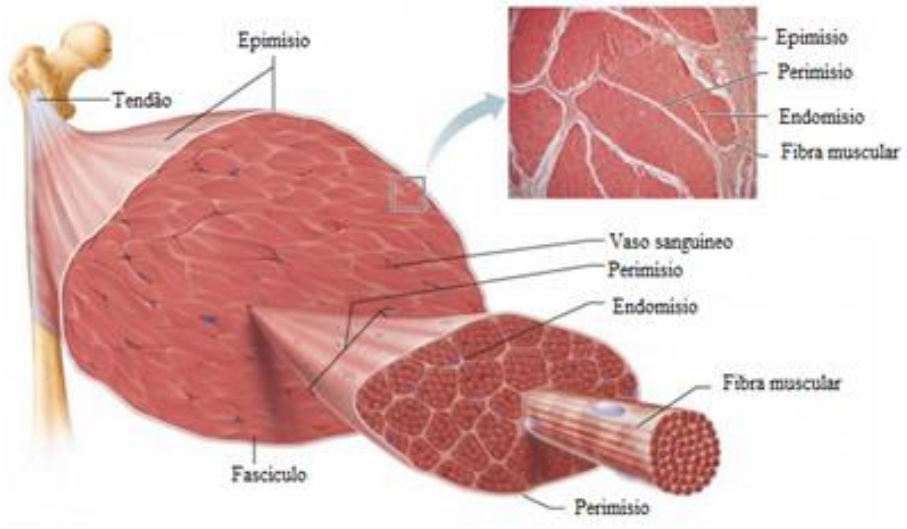


Figura 2. Organização do tecido muscular esquelético.
Ilustração de um tecido muscular adulto.
Fonte:http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap09/lecture1.html(5)

Em torno do endomísio, se encontram as inúmeras fibras musculares, cada fibra é composta por muitos feixes de filamentos, as miofibrilas, que estão dispostas paralelamente ao eixo da fibra muscular. Esses filamentos são compostos por proteínas contráteis e estruturais, tais como; troponina, tropomiosina, miosina, titina, nebulina, distrofina e principalmente pelas proteínas de actina (filamento fino) e miosina (filamento grosso) proteínas responsáveis pela contração e relaxamento do músculo esquelético (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO 2007).

Quando observado por microscopia óptica o músculo esquelético apresenta estriações transversais com alternâncias de camadas claras e escuras, essas estriações são resultado de repetições de unidades funcionais do músculo, os sarcômeros (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO 2007).

Cada sarcômero é composto pelas bandas A (faixas escuras/anisotrópica) e banda I (faixas claras/isotrópica). A banda A está localizada no centro do sarcômero e ainda nessa banda observa-se a zona H, uma região mais clara localizada no centro dessa banda. Nas extremidades do sarcômero estão localizadas as bandas I, uma em cada lado, e no meio da banda I observa-se a linha Z, que limita um sarcômero a outro. Da linha Z partem os filamentos finos de actina que estão dispostos até a extremidade da zona H, enquanto que os filamentos grossos de miosina ocupam a região central do sarcômero (banda A/zona

H) (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; SILVA & CARVALHO 2007; SCHAPPACHER-T. G. *et al*., 2015) (**Figura 3**).

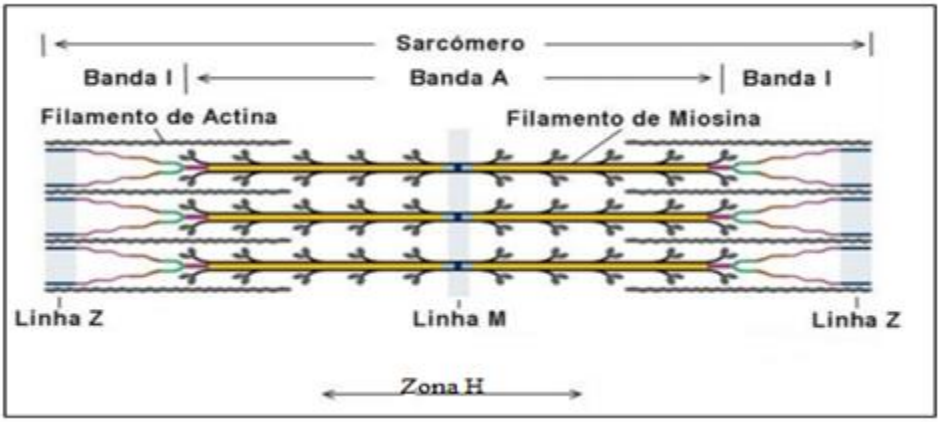


Figura 3. Organização do sarcômero.
Adaptado de (FERREIRA *et al*., 2011)

Para a contração e relaxamento do músculo, quatro proteínas possuem um papel fundamental, são elas; troponina, tropomiosina, actina e miosina (**Figura 4**). A troponina é uma proteína que é composta por três subunidades; a TnT, subunidade que interage com a tropomiosina, a TnC, subunidade que tem afinidade pelo cálcio e a TnI, subunidade responsável por cobrir o sitio ativo da actina, impossibilitando a ligação da actina com a miosina (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

A tropomiosina é uma molécula longa e fina que é constituída por duas cadeias polipeptídicas que se unem entre si pelas suas extremidades. A actina, principal proteína que forma os filamentos finos, é formada a partir da polimerização de monômeros globulares, quando esses monômeros globulares se polimerizam, formam duas cadeias que são torcidas uma sobre a outra dando origem a actina que se apresenta em forma de polímeros longos(JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

Já a miosina é uma molécula que se apresenta em forma de bastão, em uma de suas extremidades é possível observar uma saliência globular; (cabeça da miosina) é nessa região onde se localiza os locais específicos para a combinação com a molécula de ATP e consequentemente a liberação de energia responsável pela contração muscular (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

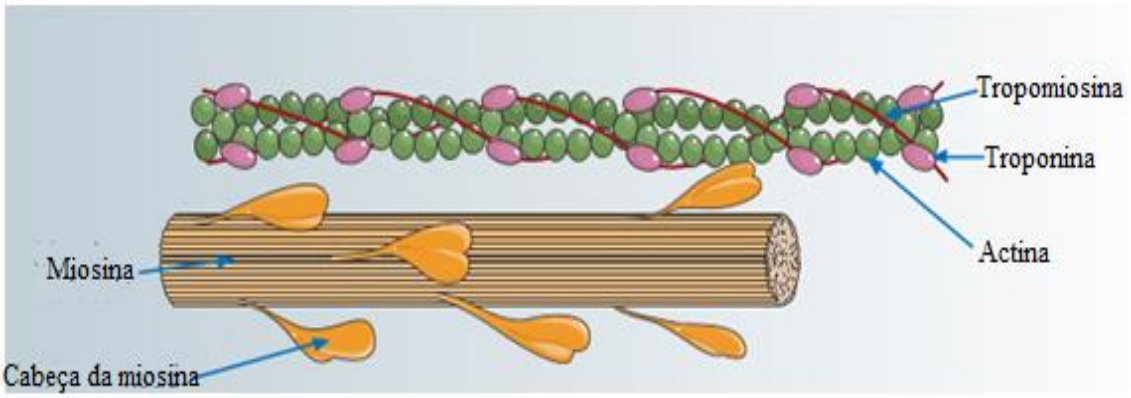


Figura 4. Sistema actina/miosina.
Fonte: Adaptado de (SERVIER Medical Art).

No momento da contração muscular, os íons de cálcio que estão armazenados no retículo sarcoplasmático são liberados no sarcoplasma, esses íons são captados pela subunidade C da troponina (TnC), no momento em que esses íons interagem com essa subunidade, ocorre uma alteração na conformação das três subunidades de troponina, dessa forma, a subunidade TnT da troponina que estava ligada a tropomiosina no sitio ativo da actina é deslocada, liberando esse sitio de ligação, dessa forma, ocorre a interação da actina com as cabeças da miosina. Em consequência a essa ligação, o ATP que estava ligado na cabeça da miosina é liberado dando origem a ADP + P (fosfato) e energia. O movimento da cabeça da miosina empurra a actina, promovendo o deslizamento dos filamentos uns sobre os outros (actina/miosina) (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2013; LIEBER 2002).

O músculo esquelético constitui cerca de 40% do total do peso corpóreo e é responsável por cerca de 80% da utilização da glicose pós-prandial estimulada pela insulina (OLEFSKY & NOLA 1995). A insulina é um hormônio sintetizado e secretado pelas células β-pancreáticas, essencial na homeostase do corpo, estando envolvido com diversas funções metabólicas e importantes processos biológicos como síntese do DNA, *turnover* proteico, crescimento, proliferação e diferenciação celular (CARVALHEIRA *et al*., 2002; COLETTA *et al*., 2008; FELIX 2012). Em situações fisiológicas normais as células incluindo o músculo esquelético utilizam a glicose inibindo a oxidação de ácidos graxos, entretanto, em situações de resistência à insulina (RI) em que há privação de glicose, a oxidação de ácidos graxos é ativada (SABOURIN *et al*., 1999). O comprometimento da utilização da glicose e a sensibilidade à insulina no tecido muscular

têm sido relacionados à presença de altas quantidades de ácidos graxos livres no plasma (LI *et al*., 2011).

O acúmulo de ácidos graxos e/ou de seus derivados podem induzir resistência à insulina no musculo esquelético, como também ser a razão para o declínio da massa muscular na obesidade. A morfologia do músculo, tamanho e função também podem ser alteradas devido à alta captação e armazenamento de ácidos graxos (SU *et al*., 2015; UMEGAKI 2015).

Na teoria de lipotoxicidade, os ácidos graxos são armazenados no músculo para servir de fonte de energia em situações necessárias, como no exercício físico. Entretanto, após algumas horas, esse acúmulo de lipídeos (triglicerídeos) tornam-se tóxicos e diminui a secreção de insulina (JANSSON *et al*., 1994). Além disso, estudos (CARVALHEIRA *et al*., 2002; ZHANG *et al*., 2010) apontam, que o acúmulo de metabólitos de lipídicos intermediários tais como diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TG), ceramida (CR), entre outros, interferem na ação da insulina devido a ativação de diferentes serinas quinases envolvidas na regulação negativa da insulina.

O acúmulo de DAG no músculo esquelético de indivíduos obesos e diabéticos está relacionado com o aumento na atividade de PKC-θ, pela via de fosforilação da serina dos IRS-1, e que este metabólito lipídico dá início ao estado de RI. A ceramida também inibe a via de sinalização da insulina, através da inibição da fosforilação da AKT (CARVALHEIRA *et al*., 2002; ZHANG *et al*., 2010).

1.1 Atrofia muscular

A atrofia muscular é caracterizada por uma diminuição no tamanho das fibras musculares pré-existentes e da massa muscular. A massa muscular é mantida pelo equilíbrio entre a síntese e degradação proteica, um desequilíbrio nesse balanço contribui para a perda de proteínas musculares (LAGIRAND-CANTALOUBE *et al*., 2008).

A atrofia é observada em processos fisiológicos e patológicos. Em processos fisiológicos (envelhecimento) é observado redução de fibras musculares, principalmente do tipo II, no músculo de idosos as fibras são gradualmente substituídas por adipócitos e tecido conjuntivo. Os lipídeos intramiocelulares estão associados à disfunção mitocondrial, a qual é um fator essencial na patogênese da sarcopenia (REZNICK *et al*.,

2007). As consequências da sarcopenia tem um importante significado clínico, pois além de contribuir para uma fragilidade física geral devido à redução na força, ainda ocasiona uma diminuição na expectativa de vida. (SANDRI *et al*., 2004; SU *et al*., 2015).

Uma progressiva perda de músculo esquelético é observada em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) com controle glicêmico inadequado e em idosos com DM2 (JAKOBSEN & RESKE-NIELSEN 1986; KIM *et al*., 2010; PARK *et al*., 2009; UMEGAKI, 2015). A redução de massa muscular encontrada em pacientes diabéticos ocorre muito provavelmente devido ao fato da insulina atuar promovendo a síntese de proteínas, e, portanto, na RI a síntese dessas proteínas é diminuída e sua degradação aumentada, consequentemente reduzindo a massa muscular (atrofia) e sua função (fraqueza muscular) (SU *et al*., 2015; UMEGAKI 2015). O tratamento com insulina (SALA & ZORZANO 2015) ou com sensibilizadores de insulina atenuam a progressão ou previnem a sarcopenia (UMEGAKI 2015).

Em músculo de modelos de obesidade genética como o camundongo db/db, a degradação proteica e a atividade dos dois principais sistemas proteolíticos estão aumentadas devido à supressão da via IRS-1/PI3K/AKT, aumento de glicocorticóides plasmáticos e baixas concentrações de adiponectina. O tratamento com o sensibilizador de insulina, rosiglitazona, reverteu a perda de massa muscular e restaurou a via PI3K/AKT (WANG *et al*., 2006). Do mesmo modo, em modelos experimentais de diabetes tipo 1, o aumento da proteólise muscular foi causado por uma menor atividade da PI3K, a qual reduz a fosforilação da AKT que indiretamente aumentam a expressão das enzimas E3- ligases (MuRF1 e MAFbx/atrogin-1), levando, portanto, a perda de massa muscular (DU *et al*., 2004; LEE *et al*., 2004).

As células de mamíferos, possuem vários sistemas proteolíticos para regular este processo de degradação, dentre elas duas vias são destacadas; a via lisossomal, e a via da ubiquitina-proteassoma.

A via lisossomal está presente em praticamente todas as células estando envolvida principalmente na degradação de proteínas de membrana de superfície, proteínas extracelulares endocíticas e glicoproteínas. O lisossomo contém várias proteases que são ativas no pH ácido dessas organelas como as catepsinas B, H e D. Este processo de degradação é acelerado na maioria das células pela falta de insulina ou aminoácidos essenciais, e no fígado pelo glucagon (BECHET *et al*., 2005; LECKER *et al*., 1999).

Já a via ubiquitina-proteassoma foi demostrada inicialmente na década de 1970, esta via desempenha um importante papel na degradação de proteínas, visto que, a maior parte de todas as proteínas intracelulares são degradadas por esta via. A mesma também possui um papel especial na degradação acelerada de proteínas miofibrilares tanto em jejum como em estados de doença (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER*et al*., 1999).

Para que haja ativação da via, primeiramente a ubiquitina; um polipeptídeo de 76 aminoácidos deve ser ativado em seu resíduo de glicina C-terminal. Para que isso aconteça é necessário a ação da primeira enzima envolvida no processo de ubiquitinação, a enzima E1 (enzima ativadora de ubiquitina), esta enzima utiliza ATP para gerar uma forma altamente reativa de ubiquitina, a hidrólise de ATP conduz a liberação de AMP. Esta forma de alta energia da ubiquitina é essencial para a eventual ligação a proteína substrato. Uma vez ativada, a ubiquitina ligada a enzima E1 é transferida para proteínas carreadoras de ubiquitina (E2). A grande quantidade de enzimas E2 ajuda a gerar a especificidade do sistema de ubiquitinação, uma vez que determinadas enzimas E2 atuam na degradação de diferentes tipos de substratos (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER *et al*., 1999).

Por fim, a enzima E3 (enzima ubiquitina-ligase) seleciona a proteína que está marcada e segue para a degradação no proteassoma. A proteína é marcada devido a ligação de várias ubiquitinas ligadas formando cadeias multi-Ub, na proteína alvo (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER *et al*., 1999).

A proteólise é então catalisada pelo complexo proteassoma 26S. Esse complexo dividido no proteossoma 20s e em uma partícula reguladora de 19S que fica localizada em cada extremidade do proteassoma 20S, degrada as proteínas em pequenos peptídeos. O proteossoma 20s é uma estrutura em forma de barril de quatro anéis empilhados, os dois anéis internos envolvem uma câmara central onde a proteína é degradada, enquanto os dois anéis externos circundam uma pequena abertura através da qual os substratos protéicos devem entrar. A partícula reguladora 19s fornece especificidade à proteólise e catalisa a entrada do alvo no proteossoma 20S (HERSHKO & CIECHANOVER 1998; LECKER *et al*., 1999).

1.2 Fatores transcricionais reguladores da miogênese

O desenvolvimento do músculo esquelético é um processo que envolve proliferação, diferenciação, migração e morte celular (TOWNLEY-TILSON *et al*., 2010), o mesmo é regulado por fatores regulatórios miogênicos (MRFs) os quais incluem *Myogenic differentiation 1* (MyoD), Miogenina (MyoG), *Myogenic factor 5* (MyF5) e *Myogenic factor 6 (*Myf6 ou MRF4). Os MRFs em conjunto com proteínas da família *Myocyteenhancer factor 2* (MEf2) regulam atividades de co-ativadores e co-repressores durante a miogênese (DEDIEU *et al*., 2002; BERKES *et al*., 2005; ROSENBERG *et al*., 2006).

A fusão de mioblastos é essencial para a diferenciação muscular, gerando fibras musculares multinucleadas a partir de mioblastos mononucleados. Em cultura, os mioblastos proliferam, então migram e se alinham para a fusão. (HOLTZER *et al*., 1958; KALDERON & GILULA 1979).

DEDIEU e cols. (2002) estudaram o processo de diferenciação de miotubos a partir de mioblastos da linhagem celular C2C12. Em meio de diferenciação, as células C2C12 começam a se fundir a partir do segundo dia. Eles observaram a expressão dos MRFs durante a fusão e diferenciação dos miotubos. Enquanto MyoD, miogenina e MyF5 estavam presentes durante o processo de fusão dos mioblastos, o MRF4 foi indetectável até os dez primeiros dias de diferenciação. Ainda durante o processo eles perceberam que MyoD exibiu um estado estacionário, a partir do segundo dia, enquanto que a expressão de MyF5 aumentou até o quarto dia, e posteriormente sua expressão foi diminuída e se apresentou estacionária. Já a miogenina aumenta progressivamente a partir do segundo dia até por volta do sexto dia, quando a fusão cessa e começa a cair progressivamente até o décimo dia, último dia observado. Utilizando oligonucleotídeos antisenso contra esses MRFs no processo de fusão e diferenciação em linhagem C2C12, demonstrou que a inibição de qualquer um desses fatores miogênicos é capaz de prevenir ou diminuir o processo de fusão, prejudicando a formação de miotubos.

Além dos MRFs, um membro da família dos fatores de crescimento tumoral β (TGF-β), a miostatina (Mstn) é de extrema relevância na regulação do crescimento muscular. A Mstn se liga ao receptor activina tipo II (ActRII) localizado na membrana plasmática. O ActRII associa-se ao seu correspondente receptor de activina tipo I (ActRI)

formando um complexo receptor heterotetramérico ativado, o qual trans-fosforila o ActRII ativando a kinase latente deste complexo. O complexo do receptor ativado fosforila as proteínas Smad2 e Smad3 que se unem a co-smad denominada Smad4. O oligômero de Smads transloca-se para o núcleo da célula onde interage com fatores transcricionais tais como os MRFs; diminuindo a ativação e proliferação celular e com os genes de degradação Murf1 e atrogin-1 aumentando a degradação proteica. A via da Mstn ativada acarreta na inibição da via PI3K/AKT responsável pela síntese proteica (ELKINA *et al*., 2011; SILVA 2014) (**Figura 5**).

1.3 Vias de síntese e degradação proteica

Vários estímulos extracelulares e distintas vias de sinalização podem modular a expressão desses fatores miogênicos. No entanto, no que se refere a proliferação, crescimento e diferenciação do músculo esquelético, a via de sinalização envolvida é a do fator de crescimento similar a insulina (IGF-1), a via IGF1-R/PI3K/AKT/MTOR. A sinalização celular promovida por IGF1 e IGF-2 é mediada pelo receptor de IGF-1, um receptor de tirosina quinase. Após ligação ao receptor o mesmo se autofosforila e induz a ativação da PI3K/AKT, AKT fosforilada ativa mTOR; que é responsável pela síntese proteica e inativa FoXO3 que está fosforilada e retida no citoplasma, dessa forma, inibe a degradação proteica, uma vez que a FoXO3 não consegue ir para o núcleo ativar os atrogenes (atrogin 1/MuRF1), promovendo a síntese proteica e inibindo a degradação (ROMMEL *et al*., 2001; SANDRI *et al*., 2004; BODINE *et al*., 2001) (**Figura 5**). Portanto, a diminuição da sinalização por IGF-1 leva ao aumento da degradação proteica. A superexpressão de IGF1 ou de AKT em músculo esquelético é suficiente para reduzir perda muscular, induzir hipertrofia e aumentar força (SACHECK *et al*., 2004; LAI *et al*., 2004).

A participação da sinalização por IGF1-R na via de sinalização da insulina foi demonstrada em camundongos geneticamente modificados que expressam Igf-1R mutante. Esses indivíduos são diabéticos e apresentam resistência à insulina no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, todos alvos primários da ação da insulina (FERNANDEZ *et al*., 2001).

No que se refere à degradação proteica, uma via em particular é de extrema importância; a via proteolítica da ubiquitina-proteassoma dependente de ATP (LATRES*et al*., 2005). Durante a atrofia, há um aumento nos conjugados de ubiquitina-proteína (LATRES *etal*., 2005). A ubiquitina é um pequeno peptídeo que pode ser conjugado com substratos protéicos específicos, uma cadeia de poliubiquitina é construída e esta cadeia é alvo do substrato para uma estrutura chamada proteassoma, onde o substrato é lisado em pequenos peptídeos (GLASS 2003).

O aumento da transcrição dos genes MAFBx/atrogin-1 e Murf1, componentes envolvidos na via de degradação da ubiquitina, é essencial na perda de proteínas musculares, pois estes codificam as proteínas ligases que atuam para conjugar a ubiquitina em substratos de proteínas, assim sendo consideradas marcadores no processo de atrofia muscular (LATRES *et al*., 2005).

BODINE e cols. (2001) mostraram que camundongos com deficiência em MAFBx/Atrogin-1 são resistentes a atrofia por desnervação do músculo esquelético e SACHECK e cols. (2004) apontam que esse gene é essencial para a perda de proteínas em modelos experimentais incluindo o diabetes.

No músculo esquelético, o sistema ubiquitina-proteassoma, é regulado por fatores de transcrição da família *forkhead* e subfamília O (FoxO) que é regulado pela proteína quinase B (PKB/Akt). A FoxO foi relatada com um regulador da transcrição de MAFBx em resposta ao estresse celular e atuando na atrofia muscular (LAGIRAND-CANTALOUBE *et al*., 2008). A AKT regula negativamente os fatores de transcrição FoxO que por sua vez induz a ativação de MAFBx/atrogin-1 e MuRF1 (**Figura 5**).

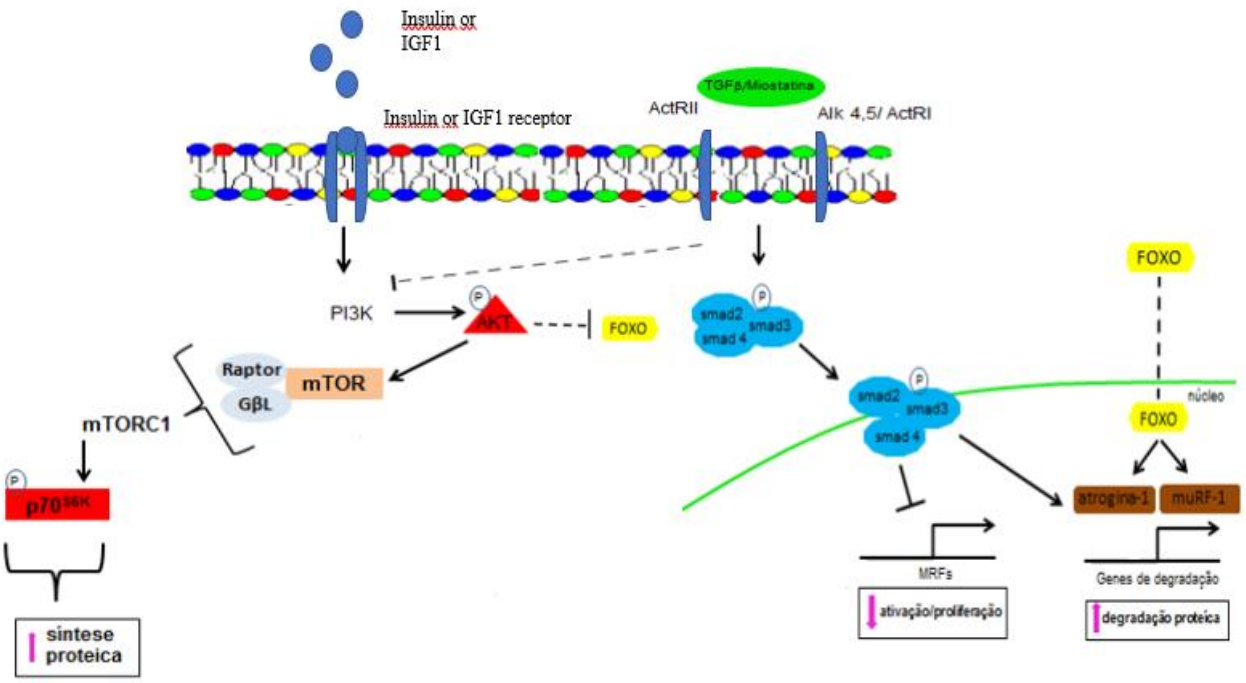


Figura 5. Via de sinalização da insulina e IGF-1.
A insulina ou IGF-1 ativa seu receptor que se autofosforila e ativa PI3K/AKT/mTOR que se associa a raptor e GβL formando o complexo mTORC1 que ativa S6K induzindo o aumento da síntese proteica. A redução dessa via resulta em inibição da mTOR e síntese proteica. Enquanto que o aumento na expressão da Miostatina além de inativar a via PI3K, induz a formação de um complexo que fosforila as proteínas Smad2, Smad3 que se unem a Smad4. Esse conjunto de Smads translocam-se para o núcleo da célula onde interagem com fatores que regulam a transcrição (atrogin-1 e Murf1) culminando no aumento da degradação proteica. IGF-1, fator de crescimento similar à insulina 1; FOXO, *forkhead box protein* O; MURF-1, *muscle-specific RING-finger 1*. Modificado de (SILA 2014).

Além da miogênese ser regulada pelos fatores transcricionais, os microRNAs também desempenham uma importante função no desenvolvimento do músculo esquelético.

1.4 MicroRNAs

Os miRNAs foram inicialmente descritos por LEE e cols. (1993) enquanto estudavam o desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, onde verificaram que uma pequena molécula de RNA (lin-4) era responsável pela regulação negativa da expressão da proteína lin-14, essencial ao primeiro estágio larval do nematódeo.

Esses pequenos RNAs (miRNAs) de aproximadamente 22 nucleotídeos, desempenham um importante papel na regulação pós-transcricional da expressão gênica através da ligação na região 3' UTR (Região não traduzida 3') de mRNAs alvos,

degradando-os ou impedindo a sua tradução (KIM *et al*., 2002; ELGHEZNAWY *et al*., 2015).

Os miRNAs estão envolvidos na regulação de diversos processos celulares e alterações na sua expressão são observadas em diversas patologias. Em mamíferos, os miRNAs podem regular aproximadamente 30% de todos os genes codificadores de proteínas (KIM & NAM, 2006).

A localização genômica dos genes dos miRNAs é variada. Nos seres humanos eles encontram-se distribuídos em todos os cromossomos exceto no cromossomo Y, e podem se apresentar das seguintes formas: intergênicos, intrônicos ou exônicos, sendo que os miRNAs intergênicos e intrônicos podem formar clusters ou não (KIM & NAM, 2006; OLENA & PATTON, 2010). A formação de clusters geralmente envolve miRNAs relacionados, possuindo sequências quase idênticas, embora isso nem sempre seja uma regra, e o fato de os miRNAs poderem ser originados de uma região intergênica faz com que possam ter promotores específicos (LAU *et al*., 2001) ou serem transcritos a partir dos promotores de seus genes hospedeiros. Supõe-se que os miRNAs agrupados almejem o mesmo gene ou diferentes genes na mesma via (KIM & NAM, 2006).

Os genes de miRNAs são transcritos a miRNAs primários (pri-miRNAs) mais frequentemente pela Polimerase II, os quais contêm 7-metilguanosina (m7G cap) na extremidade 5’ e uma cauda poli-A na extremidade 3’. Esses pri-miRNAs possuem uma estrutura em grampo que é clivada ainda no núcleo da célula, pela enzima Drosha em complexo com a proteína DGCR8, formando o pré-miRNA (miRNA precursor), de aproximadamente 70nt de comprimento. Com isso, o pré-miRNA é reconhecido pela exportina 5, um fator de transporte nuclear, a qual transporta o pré-miRNA do núcleo para o citoplasma. Nesse local, o pré-miRNA sofre ação da enzima Dicer, transformando-se em um duplex de miRNA. Geralmente, a fita do duplex com maior instabilidade na região 5’ será adicionada ao complexo RISC (Complexo de Inativação Induzido por RNA), formando, assim, o miRNA maduro de aproximadamente 22nt de comprimento, sendo a outra fita degradada (KIM & NAM, 2006) (**Figura 6**).

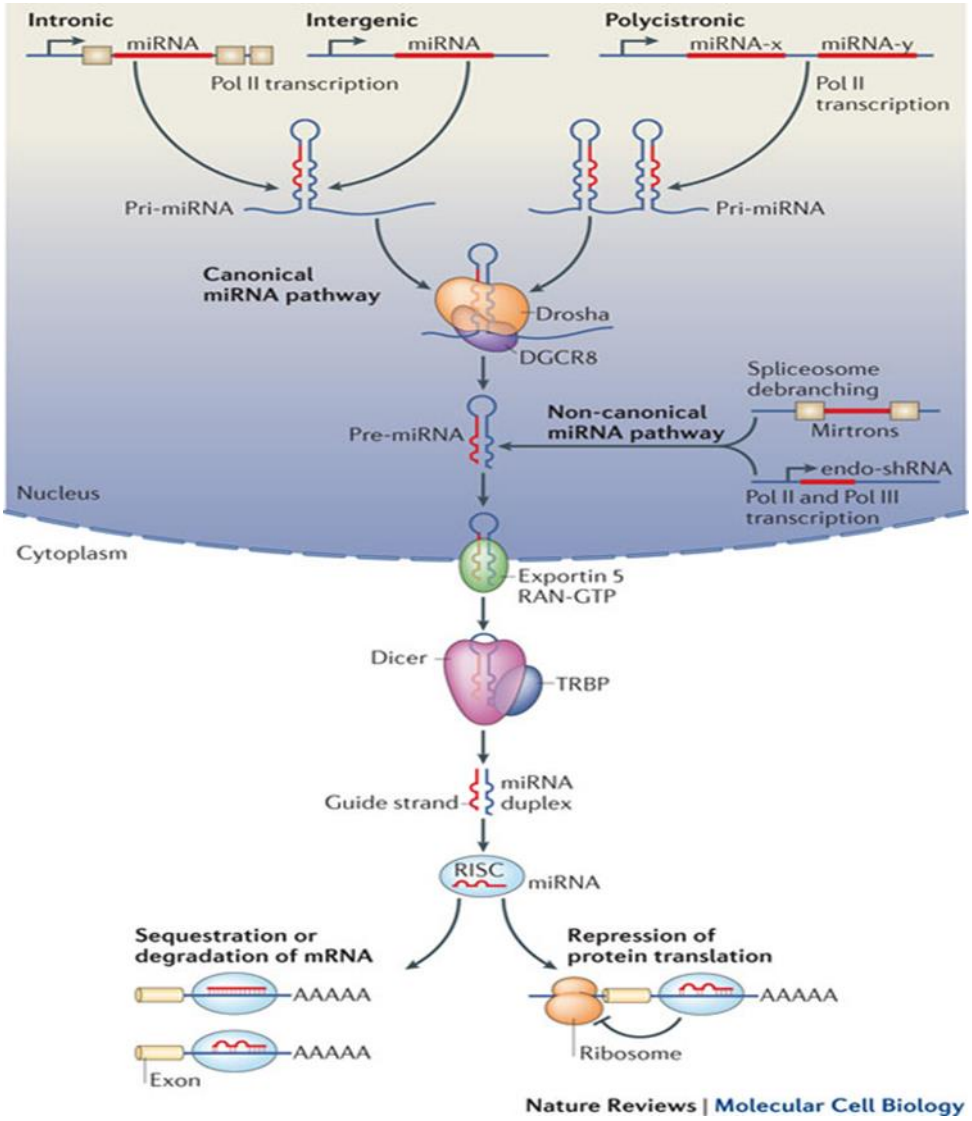


Figura 6. Biogênese dos microRNAs.
FONTE: (CHELOUFI *et al*., 2010)

Após a sua adição ao complexo RISC, o miRNA maduro, em várias cópias, exercerá sua função de regulador da expressão gênica através da degradação do RNAm alvo ou através do impedimento da sua tradução. Esse segundo mecanismo parece ser o mais característico em animais. Na maioria dos casos, o pareamento miRNA-RNAm é imperfeito. Porém, o mais importante para a função do miRNA é que haja um pareamento perfeito de seus nucleotídeos da região *seed* com a região 3'UTR (Região não traduzida 3') da molécula de RNAm (FILIPOWICZ *et al*., 2008) (**Figura 7**).

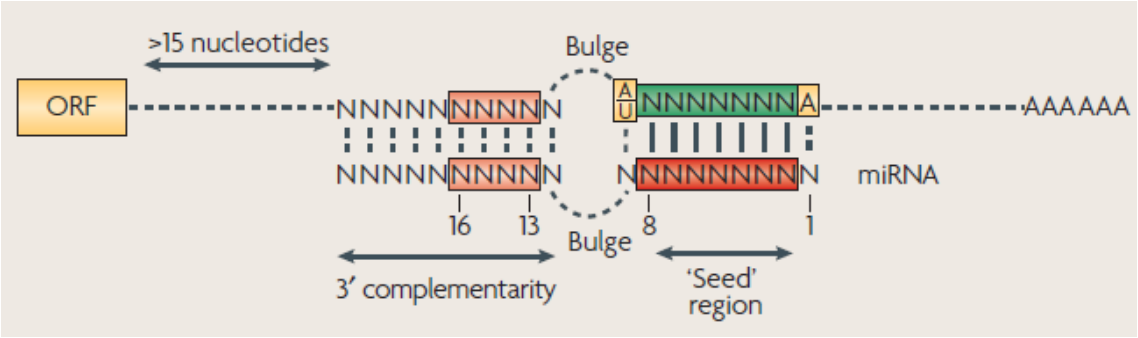


Figura 7. Esquema demonstrando a ligação do miRNA maduro ao RNAm alvo.
Em vermelho pode-se observar a região *seed* do miRNA e suas bases complementares em verde no RNAm alvo. Em rosa são destacadas algumas bases entre as posições 13-16 do miRNA, as quais ajudam a manter a estabilidade da ligação e, de preferência, também devem ser complementares ao RNAm alvo. A região em arco (Bulge) também contribui na função dos miRNAs pois impede a ação da enzima Argonauta 2, que faz parte do complexo RISC, a qual tem atividade de endonuclease, podendo clivar o RNAm. Bulge, Arco; Complementarity, Complementariedade; Nucleotides, Nucleotídeos; ORF, Open Reading Frame; Seed Region, Região Seed. FONTE: adaptado de (Filipowicz *et al*., 2008).

1.5 MiomiRs

Em especial os microRNAs miR-1a, miR-133 e miR-206 são expressos especificamente em músculo na forma de clusters. Em camundongos, os clusters miR-1a-1/miR-133a-2 estão localizados no cromossomo 2, o miR-1a-2/miR-133a-1 no cromossomo 18 e o cluster miR-206/miR-133b no cromossomo 1 (GOLJANEK-WHYSALL *et al*., 2012), este último cluster é predominantemente expresso em músculos com alto teor de miofibras do tipo I oxidativas.

As funções desses miomiRs no processo de miogênese são reconhecidas e bem estabelecidas, atuando durante o desenvolvimento inicial de miocitos até a manutenção do musculo esquelético. Enquanto que o miR-1 e 133são encontrados nos músculos esquelético e cardíaco, o miR-206 é específico para o músculo esquelético (TOWNLEY-TILSON *et al*., 2010).

Os microRNAs miR-1, 133 e 206 são especificamente induzidos durante a miogênese, os miR-1 e -206 estão intimamente relacionados no que se refere a expressão e função. O miR-1a e miR-206 promovem a diferenciação do mioblasto pela repressão pós-transcricional da HDAC4 e da subunidade p180 da DNA polimerse alfa, respectivamente (CHEN *et al*., 2006, CHEN *et al*2010; HAK *et al*., 2006). Por outro lado, o miR-133a promove a proliferação pela repressão de fatores de resposta a soro (SRFs) em células C2C12 (CHEN *et al*., 2006). Acredita-se que o miR-1 e -133 sejam expressos

precocemente no desenvolvimento embrionário atuando em atividades proliferativas e apoptóticas, porém com funções opostas no decorrer do desenvolvimento embrionário.

A inibição endógena de miR-1 e miR-206 de células em diferenciação utilizando antimiRs bloqueia a diminuição da expressão da maioria dos genes envolvidos na diferenciação, indicando que a interação microRNA – RNA alvo é essencial para esse processo (GOLJANEK-WHYSALL *et al*., 2012). Assim, os miRs-1 e -206 estão intimamente relacionados com a diferenciação de mioblastos, e o miR-133 promove a proliferação de mioblastos e inibe a diferenciação.

Utilizando células C2C12 demonstrou-se que o Igf-1R é alvo do miR-133 que regula negativamente a via de sinalização do Igf-1. Além disso, a presença extracelular de Igf-1 aumenta a expressão de miR-133 durante a diferenciação celular via aumento de miogenina (HUANG *et al*., 2011).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (FRIAS *et al*., 2016), identificou que os microRNAs miR-1, 133a e 206 músculo-específico possuem expressão diminuída em camundongos C57BL/6 com RI induzida por dieta hiperlipídica quando comparado aos animais controle e que por sua vez esses animais apresentaram um aumento da expressão de genes e proteínas relacionadas com a biogênese e função mitocondrial.

Considerando que há diminuição dos miomiRs no músculo esquelético de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e que esses mesmos microRNAs participam da miogênese através do controle da via de sinalização IGF1/PI3K/AKT/MTOR, acreditamos que esses microRNAs devem estar envolvidos com a perda de massa muscular associada ao diabetes.

De fato, utilizando um modelo de perda muscular induzido por diabetes tipo1, SU e cols. (2015) mostraram que o tratamento com acupuntura associado a estimulação elétrica de baixa frequência (Acu-LFES) diminui a perda muscular, promovendo a regeneração muscular, a qual foi alcançada tanto regulando positivamente a via de sinalização do IGF-1, bem como aumentando a expressão dos microRNAs miR-1a e miR-206. Já em relação ao diabetes tipo 2, resultados do nosso grupo mostram diminuição da expressão do miR-1 e aumento do miR-133a em músculos de camundongos obesos após 12 semanas de dieta hiperlipídica, a qual foi relacionada a menor miogênese e perda de massa muscular (FRIAS *et al*., 2016).

O aumento de ácido graxos circulantes está associado com várias doenças crônicas (ABDELMAGID *et al*., 2015). Em soro de animais alimentados com dieta balanceada os níveis de ácido palmítico é de 0,099 ± 0,038g/100mL, enquanto que em animais alimentados com dieta hiperlipídica esses níveis são de 0,104 ± 0,006g/100mL (MAIS *et al*., 2014). ABDELMADIG e cols. (2015) determinaram concentrações de ácidos graxos dos lipídios totais plasmáticos de indivíduos saudáveis e a concentração de ácido palmítico foi em média 1631,1µmol/L. Essa concentração se correlacionou positivamente com o colesterol da LDL, triglicerídeos e colesterol total.

A quantidade elevada de lipídeos na dieta, contendo principalmente AG saturados e poliinsaturados ômega-6, leva ao desenvolvimento da obesidade e consequentemente resistência à insulina (ASTRUP *et al*., 2000; WEST&YORK, 1998). Sendo o ácido palmítico o ácido graxo mais prevalente no músculo esquelético (CHAVEZ & SUMMERS 2003), é imperativo exploramos o efeito desse ácido graxo na diferenciação de mioblastos, visto que tanto obesos como diabéticos idosos evoluem mais rápido para sarcopenia (BRYNER *et al*., 2012) e a causa primária poderia ser uma reduzida síntese proteica em resposta a estímulo hormonal ou de nutrientes.

Nossos achados podem contribuir para elucidação dos mecanismos inerentes da atrofia induzida pela obesidade.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ácido palmítico, o ácido graxo saturado mais abundante no corpo, sobre a atrofia muscular e regeneração em células C2C12.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Avaliar se o ácido palmítico nas concentrações de 100µM e 150µM altera o processo de diferenciação celular das células C2C12. Avaliamos nas células indiferenciadas (tempo 0) e diferenciadas com 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias e 5 dias, a expressão de miomiRs, (miR-1a, miR-133a e miR-206) por PCR em tempo real. E marcadores miogênicos por Western Blotting nos dias 1 e 5 e imunofluorescência no dia 5.

2.1.2 Avaliar se o ácido palmítico nas concentrações de 100µM e 150µM altera no processo de regeneração em mioblastos C2C12. Avaliamos pelo ensaio de cicatrização *in vitro*.

2.1.3 Avaliar se o ácido palmítico na concentração de 100µM em células já diferenciadas altera a expressão de microRNAs e marcadores miogênicos. Avaliamos em células diferenciadas por cinco dias e tratadas nas 48h seguintes a expressão dos microRNAs (miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208b, miR-499 e miR-23a) por PCR em tempo real. Marcadores miogênicos Western Blotting e imunofluorescência.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultura de Células e protocolo experimental

A linhagem celular C2C12 (ATCC no: CRL-1772) é um subclone da linhagem celular de mioblastos C2, células derivadas de células-satélite de camundongos adultos. Essa linhagem foi utilizada como modelo de músculo esquelético de camundongos. As células C2C12 foram cultivadas de acordo com o método proposto por (SCHMITZ-PEIFFER *et al*., 1999).

Os mioblastos foram cultivados em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com baixa concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco™) e 1% de antibiótico (50 UI/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina) assim, denominado de Meio de Proliferação (MP) e posteriormente incubado à 37º C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO2.

Para diferenciação dos mioblastos em miotubos, 100.000 células ou 50.000 células/poço foram plaqueadas em placas de 6 ou 24 poços, respectivamente, e após atingirem 100% de confluência, as células foram lavadas 1 vez com PBS estéril e o MP foi trocado por meio de meio de diferenciação (MD), o qual consiste de meio DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo (SC) e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram diferenciadas de 1 a 5 dias, e o meio foi trocado a cada 48 horas.

Para investigar o efeito do ácido palmítico no processo de proliferação foi adicionado ácido palmítico 0µM, 100µM,150µM, 250µM, 500µM ou 750µM em MP aos mioblastos e para investigar o efeito do ácido graxo na diferenciação em miotubos, aos mioblastos foi adicionado ácido palmítico em MD no tempo 0. Às células controle foi adicionado álcool etílico 0,19%, veículo do ácido palmítico.

O ácido palmítico foi preparado da seguinte maneira: ácido palmítico foi solubilizado em etanol absoluto, e foi diluído a proporção de 1:25 em solução contendo MP (10% de SFB) ou MD (2% SC) com 2% de BSA, para que o ácido palmítico pré-conjugasse ao BSA, obtendo-se uma concentração de 3mM de ácido palmítico. Posteriormente essas diluições foram incubadas por 10 min a 55ºC e esfriadas a temperatura ambiente. Finalmente, outra diluição foi feita na proporção de 1:30 ou 1:60 em MP ou MD com 2% de BSA e filtradas antes de administradas as células, para que a

concentração final de ácido palmítico adicionada fosse de 0,1mM ou 0,15mM respectivamente. O ácido palmítico e o álcool etílico foram reposto a cada 48 horas. (CHAVEZ *et al*., 2005).

Para quantificação da expressão de mRNA dos MRFs e microRNAs, as células foram coletadas nos dias: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 e o RNA total foi extraído, conforme item 3.7 a 3.9. Para avaliação da expressão dos MRFs por Western Blotting, foram coletados os dias 0, 1, 3 e 5 e as proteínas totais foram extraídas, conforme item 3.10. Para avaliação de atrofia celular foi feita imunomarcação para miosina de cadeia pesada no 5º dia de diferenciação e em seguida os miotubos foram medidos, conforme o item 3.3. Para avaliação de viabilidade, proliferação e citotoxicidade em mioblastos foram feitos ensaios de MTT, curva de crescimento e LDH, conforme descrito no item 3.2. Conforme esquema simplificado na **figura 8.** A seguir estão detalhados os métodos de cada ensaio.

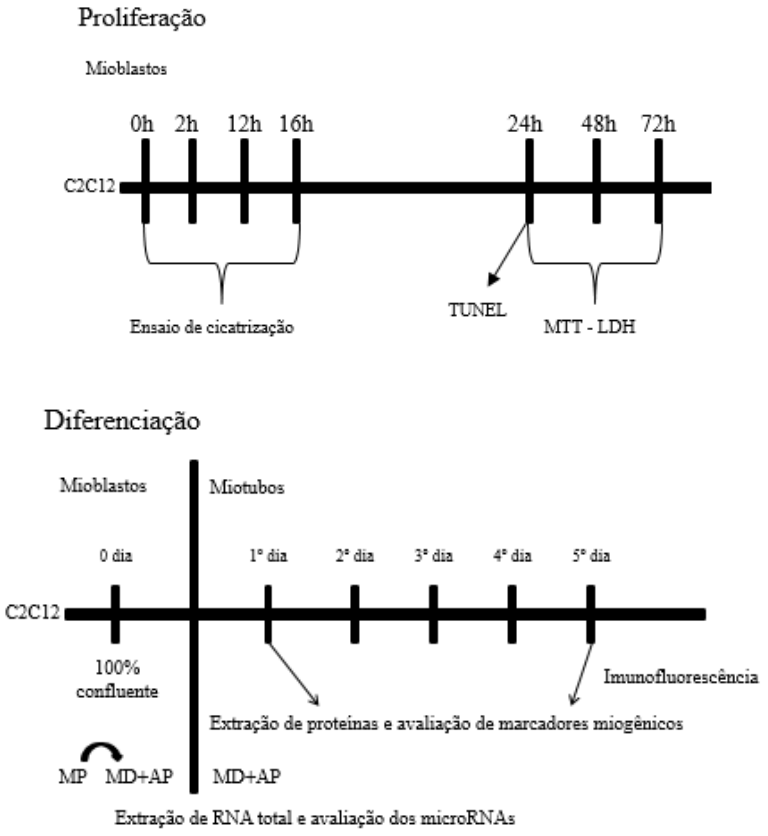


Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental e dos métodos que foram utilizados. MP: meio de proliferação (DMEM+10% soro fetal bovino); MD: meio de diferenciação (DMEM+2% de soro de cavalo). *Para avaliação da diferenciação de miotubos as células foram diferenciadas com 80% de confluência e coletadas nos dias 0, 1, 2, 3, 4 e 5 para análise de expressão de microRNAs. Para análise de proteína e marcadores miogênicos as células foram coletadas nos dias 1e 5. Para ensaio de MTT e LDH as células foram coletadas em 24h, 48h e 72h. Para o ensaio de cicatrização as células foram analisadas nos tempos 0h, 2h, 12h e 16h.

3.2 Viabilidade, proliferação e citotoxicidade celular

3.2.1 Curva de Crescimento

Para curva de crescimento, 10.000 células/poço foram cultivadas em placas de 6 poços (média de 3 poços/grupo). Os mioblastos foram plaqueados juntamente com seus respectivos grupos, ou seja, as células aderiram na placa juntamente com seu tratamento (ácido palmítico ou etanol ou C2C12 sem tratamento) e a cada 24h o meio foi retirado e as células foram lavadas com 2x com PBS estéril, tripsinizadas, incubadas por 5 minutos a 37ºC, e em seguida a tripsina foi inativada em MP. Posteriormente as células foram contadas em câmara de Neubauer. O crescimento celular foi acompanhado por 1 até 6 dias, e o tratamento foi reposto a cada 48 horas.

3.2.2 MTT

O MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio) é um ensaio colorimétrico extensivamente utilizado para determinação da viabilidade e proliferação celular desde seu desenvolvimento por Mosmann (1980) (BERRIDGE & TAN, 1993) (TONDER *et al*., 2015).

O ensaio tem por finalidade avaliar a viabilidade celular através da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais presentes nas células metabolicamente ativas, essas enzimas reduzem o sal tetrazólio um composto de coloração amarelo, em cristais de formazan que apresentam coloração azul e são solúveis em DMSO, possibilitando que o ensaio seja analisado através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 550nm (BERRIDGE & TAN, 1993)(TONDER *et al*., 2015).

As células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo aproximadamente $0{,}75x10^4$ células/poço, após 3 dias o MP foi coletado (para determinação da atividade enzimática da lactato desidrogenase) e os poços foram lavados com solução de PBS estéril (1x), foram adicionados 400µl da solução de MTT (diluído em meio de cultura DMEM) em cada poço e em seguida, as placas foram incubadas a 37º C em estufa de CO2.

Após o período de 2:30h de incubação, foi retirado cuidadosamente o meio contendo MTT e foram adicionados 700µl de DMSO nos poços, afim de solubilizar o sal

de formazan. Em seguida, as soluções foram homogeinizadas e transferidas para uma placa de 96 poços para análise em espectrofotometria e lidas a um comprimento de onda de 550nm.

3.2.3 Citotoxicidade celular através do ensaio de LDH

O ensaio de LDH foi utilizado como um indicador de citotoxicidade. O teste baseia-se na mediação da atividade da lactato desidrogenase, enzima citosólica liberada no meio extracelular devido a danos irreversíveis na membrana celular (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006).

O ensaio de LDH foi realizado a partir da coleta de células que ficaram em suspensão no MP, durante o ensaio de MTT. O meio coletado foi utilizado para medição da atividade enzimática utilizando o *Citotoxicity Detection Kit* (LDH)(Roche). Esse meio coletado foi transferido para uma placa de 96 poços e foi adicionado à solução do LDH (Catalyst + Dye Solution) em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida lida em espectrofotômetro (Biotek) a um comprimento de onda de 492nm.

3.3 Morfologia Celular

Os miotubos tratados na ausência e presença de ácido palmítico por 5 dias foram visualizados em objetiva 40xutilizando um microscópio de luz invertida (Zeiss), e as imagens foram capturadas com uma câmera (AxioCam MR Rev3) acoplada ao microscópio. O tamanho e o diâmetro dos miotubos foram medidos utilizando o software AxioVison4.8.

3.4 Ensaio de Cicatrização

O ensaio de cicatrização é uma técnica padrão *in vitro* que consiste em analisar a migração de células após danos mecânicos, térmicos ou químicos. Nesse teste é criado uma área livre de células induzida por um dano em uma camada inicialmente confluente de células.

As células foram cultivadas em placas de 6 poços (n=3/grupo) e quando as placas estavam com 100% de confluência foi realizado o dano com uma ponta de pipeta amarela estéril (p200). Foi medido inicialmente (tempo 0h) a área proporcionada pela ponta da ponteira e posteriormente a migração foi monitorada por 2h, 12h e 16h e fotografada usando uma câmera acoplada a um microscópio de luz invertida (JONKMAN *et al*., 2014).

3.5 Ensaio de TUNEL

A apoptose celular foi avaliada pela técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling*) que avalia o processo de fragmentação de DNA, característica encontrada em células apoptóticas (FAYZULLINA& MARTIN 2014).

As células foram plaqueadas e ao atingirem 100% de confluência, os mioblastos foram tratados com veículo ou ácido palmítico (100µM e 150µM) em meio de proliferação por 24h. Em seguida, as células foram fixadas com PFA 4%, permeabilizadas em solução gelada de PB 0,05M com Triton X-100 0,1% e com citrato de sódio 0,1% por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora a 37°C com a enzima TdT e com dATP, marcados com Tetrametil rodamina (1:5 GIBCO-Invitrogen) e DAPI. As células foram então lavadas com PBS 1x e visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss) usando o software AxioVison4.8.

3.6. Imunofluorescência

A detecção de miosina de cadeia pesada tipo 1 e tipo 2 foi avaliada por imunofluorescência das células diferenciadas por 5 dias, na presença e ausência de ácido palmítico (veículo ou C2C12 sem tratamento) com finalidade de avaliar a capacidade de diferenciação da nossa linhagem. As células foram imunomarcadas no quinto dia de diferenciação com os anticorpos anti-miosina tipo 1, lenta (MyHC-1) e anti-miosina tipo 2, rápida (MyHC-2); anticorpos específicos para células diferenciadas.

Para isso, células C2C12 (50.000/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços na ausência e presença de ácido palmítico e no quinto dia de diferenciação foram lavadas

1 vez com PBS e fixadas com metanol 100% por 20 min. As células foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 min à TA, depois incubadas com solução bloqueadora 5% (PBS 1x + 5% de soro + 0,05% Triton X-100) por 2h à TA. Em seguida, as células foram incubadas com solução contendo o anticorpo primário (MyHC-1 e 2, diluição 1:500) em câmara úmida, overnight a 4°C. Após lavagem com PBS (3x por 10min) foram incubadas com solução contendo o anticorpo secundário por 2h à TA. Após nova lavagem as placas de cultura de células foram marcadas com DAPI e visualizadas em microscópio de fluorescência (Zeiss).

Foram obtidas 13 imagens de 26 campos e o diâmetro e tamanho das fibras foram mensurados pelo software AxioVison4.8.

3.7. Extração e quantificação de RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir da homogeneização das células diferenciadas por 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias com o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Após extração foi determinada a pureza obtida pela razão 260/280 e 260/230 e a concentração de RNA total obtido em espectrofotômetro BioDrop (Analítica).

3.8 Quantificação da expressão de microRNAs por RT-PCR em tempo real

A quantificação relativa dos miRNAs e pequenos RNAs nucleolares (sno), utilizados como controle endógeno, foram feitas por RT-PCR em tempo real pelo sistema Taqman® microRNA assay (Applied Biosystems) para o miR-1, miR-206, miR-133a, miR-208b, miR-499, sno202 e sno234. A síntese do cDNA universal foi realizada a partir de 50ng de RNA total, utilizando-se o kit Taqman® microRNA assay (Applied Biosystems). Os reagentes foram misturados e incubados em termociclador Veriti (Life Technologies) por 30min a 16ºC, 30min a 42ºC e 5min a 85ºC. O cDNA obtido foi diluído 15x em água livre de nucleases e armazenado a –20ºC. A expressão dos miRNAs foi realizada por qPCR com detecção por Taqman®, utilizando-se o equipamento ABI Prism 7500 (Life Technologies), seguindo o protocolo universal de amplificação: 95°C 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C 1min, seguido de curva de dissociação. Para

a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa, utilizando um gene constitutivoU6 ou sno202 como referência para os mioblastos e miotubos, respectivamente.

3.9 Quantificação da expressão de RNAm por PCR em tempo real

A expressão de RNAm dos genes *Mstn*, *MyoD*, *MyF5*, Miomesina e *MyH7*, foi quantificada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR (RT-PCR) em tempo real. Resumidamente, a síntese do cDNA foi realizada com 500ng de RNA total, utilizando a enzima SuperScript^{TM} III RT RNase H^{-} (Invitrogen-Life Technologies, Gathersburg, MD, EUA). O cDNA obtido foi armazenado a –20ºC.

A quantificação de RNAm dos genes estudados foi realizada por PCR em tempo real, com detecção por SYBR Green (Thermo Scientific), utilizando os primers descritos na **tabela 1**. A reação de amplificação foi realizada no aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para normalização da expressão foi utilizado o gene constitutivo 36B4.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para determinação do conteúdo de mRNA para os genes de interesse no homogenato de células C2C12.

Gene	Sequência Senso	Sequência Antisenso
Mstn	GCAAAATTGGCTCAAACAGCC	AGGGATTCAGCCCATCTTCTC
Myf5	TGACGGCATGCCTGAATGT	GCTGGACAAGCAATCCAAGC
MyoD	GCCCGCGCTCCAACTGCTCTGAT	CCTACGGTGGTGCGCCCTCTGC
MyH7	GCCAACTATGCTGGAGCTGATGCCC	GGTGCGTGGAGCGCAAGTTTGTCATAAG
Miomesina 2	GATCAACAGGGCCAACTTTGA	TGGTAGACACTTGTTCATGGGAAT
36b4	TAAAGACTGGAGACAAGGTG	GTGTACTCAGTCTCCACAGA

Descrição dos genes utilizados seguindo sua ordem do quaro: Miostatina; *Myogenic fator 5*; M*yogenic differentiation 1; Myosin heavy chain 7;* Miomesina; 36B4.

3.10 Quantificação de proteínas por Western blotting

Os miotubos diferenciados (1 e 5 dias) foram homogeneizados em tampão de lise RIPA gelado contendo 1% de coquetel de inibidor de protease e as proteínas totais foram extraídas. O conteúdo de proteínas será quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma alíquota com 50 µg de proteínas em tampão de amostra foi submetida à eletroforese SDS-PAGE 8% em condições desnaturantes. As proteínas fracionadas em gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose em cuba de eletroforese (250 mA por 2 h). A eficiência de transferência foi avaliada pela coloração da membrana de nitrocelulose em Ponceau S 0,2% por 10 min. A detecção das proteínas de interesse (p-AKT ser 473, p-P70^{S6K}, P70^{S6K}, MurF1 e atrogin-1) e da proteína controle GAPDHfoi realizada inicialmente por bloqueio da membrana por 1h a temperatura ambiente, com leite desnatado a 5% em TBST [Tris-HCl 20 mM, (pH 7,5), NaCl 0,9%, 0,1% de Tween 20] para minimizar as ligações inespecíficas. Posteriormente, as membranas foram incubadas, sob agitação, em TBST (TBS com 0,1% de Tween 20) contendo o respectivo anticorpo primário, por 16 h, à 4ºC. Após 3 lavagens por 10 min com TBST, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase (diluído 1:10000 em TSBT) por 2h a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com TBST. As bandas marcadas com anticorpo foram visualizadas utilizando “Pierce ECL western blotting substrate” (Thermo Scientific).

Tabela 2. Informações sobre anticorpos utilizados no presente estudo.

Anticorpo	Marca	Código	Diluição	Diluente
Atrogin-1	ECM Biosciences	Cat. # AP2041	1:1000	5% BSA
GAPDH	Abcam	ab181602	1:5000	3% Leite
MuRF1	ECM Biosciences	Cat. # MP3401	1:1000	3% BSA
p-Akt (Ser473)	Cell Signaling	# 4060	1:2000	5% BSA
p-FoxO3a (S253)	Abcam	Ab47285	1:200	3% BSA
p-p70^{s6k}	Santa Cruz	sc-7984-R	1:4000	3% Leite
p70^{s6k}	Santa Cruz	sc-8418	1:4000	3% Leite

3.11 Análise Estatística

Os dados foram apresentados com média ± erro padrão da média (EPM) e analisados por teste-"t" de Student ou análise multivariada como Two-Way ANOVA, conforme o caso, seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido como $p<0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios no processo de proliferação e citotoxicidade.

Inicialmente foi realizado um ensaio de MTT com finalidade de avaliar a viabilidade e proliferação celular em mioblastos tratados ou não por 72 horas. Como controle de morte celular foi utilizado 1% de Triton-100x para tratar as células (**Figura 9A e B**). Durante as 72h de experimento o MP não foi trocado para não afetar posteriormente o ensaio de LDH, o qual utiliza o sobrenadante celular para análise de citotoxicidade celular.

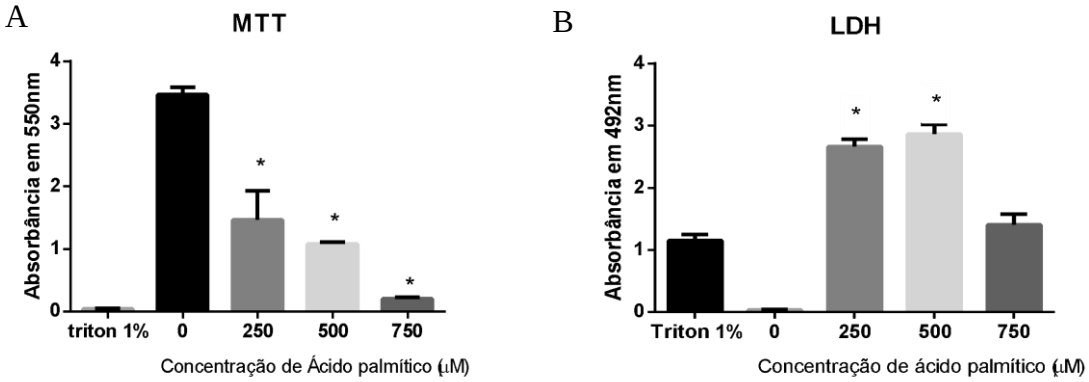


Figura 9. Ensaio de MTT (A) e LDH (B) em células C2C12 em proliferação por 72h.
Grupos: Controle positivo (álcool etílico 0,19%), controle negativo (DMEM + 1% de Triton X-100), tratados (ácido palmítico 250µM, 500µM, 750µM). *P<0,05 em relação ao controle, avaliado por One-Way ANOVA, seguido do pós-teste de Kruskal-Wallis. (n=4 para cada grupo).

Nas **figuras 9A e 9B** estão representados os resultados obtidos nos ensaios de MTT e LDH, respectivamente. Inicialmente foi estabelecido a concentração de 750µM de ácido palmítico para utilização no decorrente projeto, pois estudo anterior mostrava que essa concentração induzia em células C2C12, diminuição de PGC1α, acúmulo de lipídeos intramiocelulares e diminuição do diâmetro dos miotubos em 25% após 48h de tratamento

(BRYNER *et al*., 2012). Entretanto, como pode ser visto na **figura 9A** as três concentrações de ácido palmítico escolhidas para induzir a atrofia mostraram-se ser tóxicas no processo de proliferação de células C2C12. Uma vez que o ensaio de MTT tem por objetivo avaliar a viabilidade/proliferação celular, uma diminuição significativa de células nos grupos tratados com relação ao grupo controle (0µM), nos mostra que esses grupos não conseguem ter um crescimento eficaz, afetando com isso, a proliferação celular. Complementando esses dados, o ensaio de LDH (**Figura 9B**) que consiste na liberação da enzima lactato desidrogenase, e portanto indicaria extravasamento celular, mostrou um aumento relevante nos grupos tratados com ácido palmítico 250µM e 500µM quando comparados com o grupo controle e triton 1%, evidenciando uma possível toxicidade (morte) celular nesses grupos, em contrapartida, as células tratadas com ácido palmítico 750µM mostrou uma toxicidade menor, possivelmente por esse grupo não conseguir ter um crescimento dinâmico como obtiveram os outros grupos tratados (**Figura 9A**) e devido a isso, sua toxicidade aparentemente torna-se menor em relação aos outros.

Com os resultados obtidos nesses ensaios, torna-se evidente que persistir nessas concentrações de ácido palmítico como tratamento é inviável no presente estudo. Devido a isso, repetimos os ensaios com concentrações diferentes do ácido palmítico, a fim, de estabelecer concentrações viáveis para a realização do projeto.

A partir disso, foram adicionadas as seguintes concentrações; 50µM, 100µM e 150µM de ácido palmítico. Foi cultivado uma densidade celular menor com a finalidade de avaliar melhor a proliferação, sendo assim, foram cultivadas aproximadamente 0,4 $x10^4$ células/poço em placas de 24 poços e após 2 dias em MP os ensaios de MTT e LDH foram realizados seguindo o mesmo protocolo que os anteriores (**Figuras 10 e 11**).

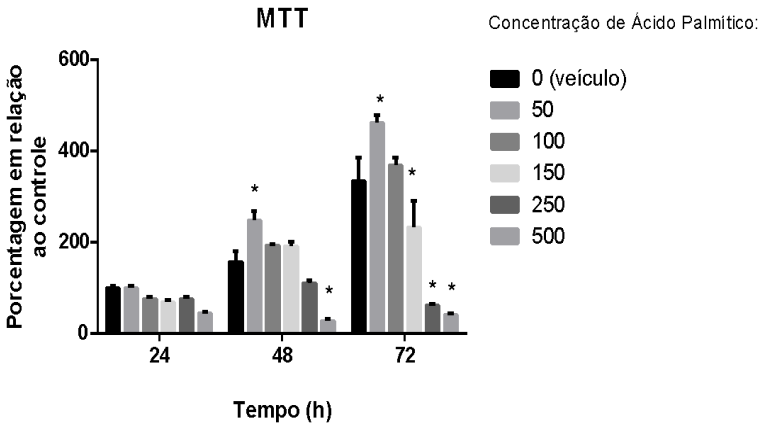


Figura 10. Efeito de variáveis concentrações de ácido palmítico na proliferação celular de células C2C12 no período de 24-72h.
A formação do sal formazan foi avaliada em espectrofotômetro, comprimento de onda 550nm e o resultado foi expresso em porcentagem relativo ao grupo controle. Controle (álcool etílico 0,19%) e tratados (ácido palmítico 50µM, 100µM, 150µM, 250µM, 500µM). *P<0,05 em relação ao controle, avaliado por Análise multivariada de 2 vias, seguido do pós-teste de Tukey. (n=4 para cada grupo).

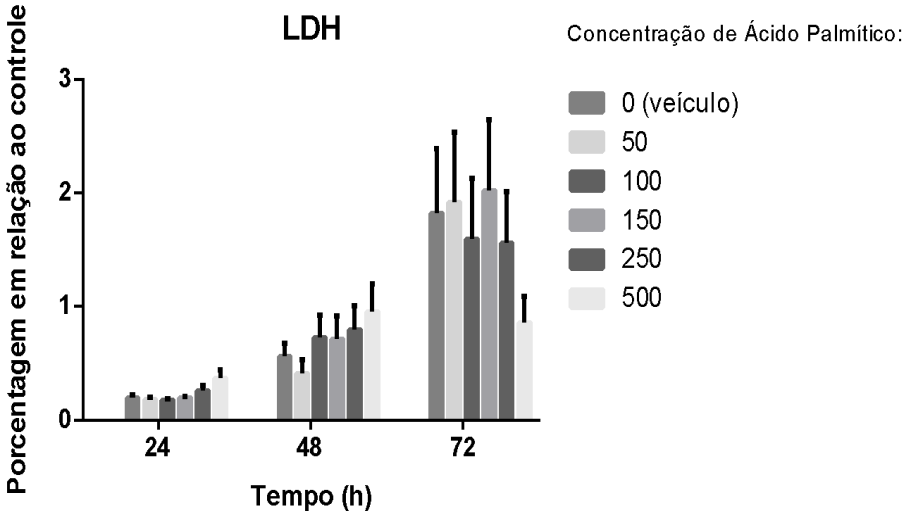


Figura 11. Efeito de variáveis concentrações de ácido palmítico na proliferação celular de células C2C12 no período de 24-72h.
A liberação da enzima Lactato desidrogenase foi avaliada em espectrofotômetro, comprimento de onda 492nm. Controle (álcool etílico 0,19%) e tratados (ácido palmítico 50µM, 100µM, 150µM, 250µM, 500µM). *P<0,05 em relação ao controle, avaliado por Análise multivariada de 2 vias, seguido do pós-teste de Tukey. (n=4 para cada grupo).

No que se refere ao MTT, em 24 horas todos os grupos apresentam uma viabilidade semelhante, entretanto, no período de 48h e 72h nota-se que as células tratadas com o

ácido palmítico a 50µM aumentam a taxa de proliferação, a concentração de 100µM não afeta o crescimento, a concentração de 150µM inibe a proliferação a partir de 72h e as concentrações de 250 e 500µM diminuem significativamente a proliferação celular em relação ao grupo controle, sugerindo uma toxicidade nesses tratamentos (**Figura 10**). Esses resultados corroboram com o ensaio de MTT apresentado na **Figura 9A.** No que se refere ao ensaio de LDH, não houve diferença significativa dos grupos em relação ao controle (**Figura 11**).

Simultaneamente, foi realizado uma curva de crescimento com o objetivo de avaliar a atividade proliferativa da linhagem celular na presença ou ausência de ácido palmítico.

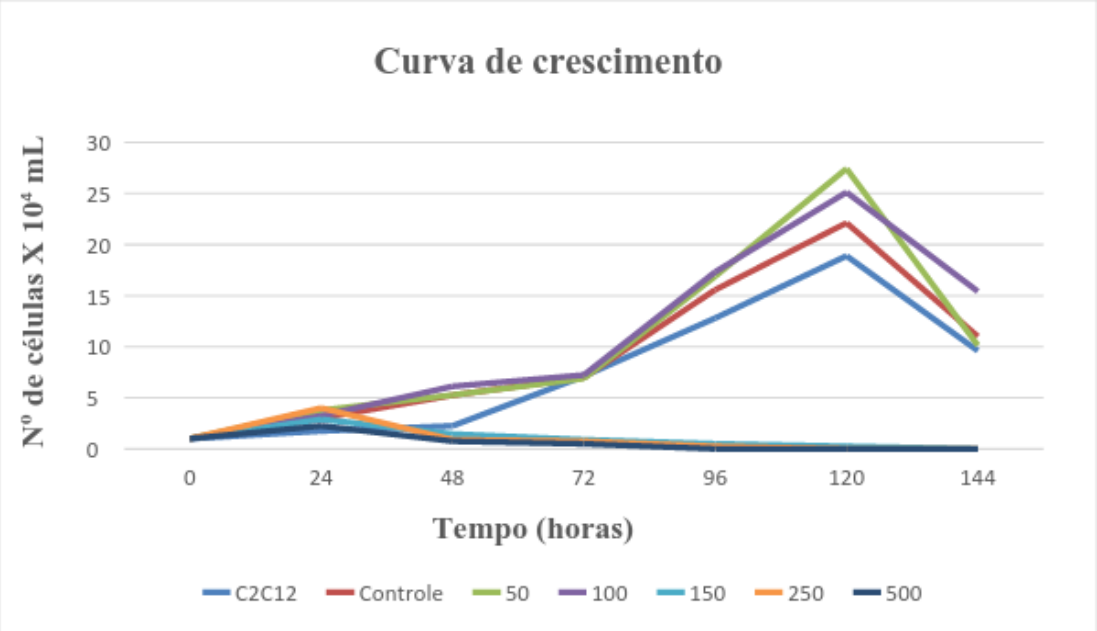


Figura 12. Curva de crescimento das células C2C12 com ou sem tratmento com ácido palmítico. As células C2C12 foram mantidas por 144h em cultura na ausência (0 M) e presença de ácido palmítico (50-500µM). Dados representam média (n = 3).C2C12: células mantidas em DMEM; controle: tratadas com veículo etanol 0,19%; 50, 100, 150, 250 e 500: concentrações de ácido palmítico em µM.

Na curva de crescimento obtida podemos observar três fases: nas primeiras 24h as células possuem uma atividade proliferativa menor, devido ao processo de adaptação que as células sofrem (Fase Lag). No período de 24-120h, as células dobram de número, apresentando um aumento crescente no número de células (fase Log), até atingirem seu estágio de *Plateau*, as células apresentam uma diminuição significativa em seu crescimento celular devido a morte celular. Com base no gráfico de crescimento celular (**Figura 12**), nota-se que não há diferenças significativas na proliferação celular da linhagem pura, sem nenhum tipo de tratamento (C2C12), em relação aos grupos controle

e as duas concentrações menores de ácido palmítico 50µM e 100µM e assim, essas concentrações não interferem na proliferação dos mioblastos. Em contrapartida, as concentrações 150µM, 250µM e 500µM de ácido palmítico não conseguiram ter uma atividade proliferativa normal, indicando que o ácido palmítico pode interferir no crescimento celular uma vez que o ácido palmítico foi posto no momento do plaqueamento celular. A partir de ensaios de viabilidade e citotoxicidade com diferentes concentrações de ácido palmítico, optamos pelas concentrações de 100µM e 150µM, pois além de induzirem atrofia celular em uso crônico, as mesmas conseguem manter a morfologia e viabilidade celular.

4.2 Ensaio de cicatrização

Foi feita uma lesão com auxílio de ponteira para pipeta automática (p200) para avaliarmos se o nosso tratamento afetaria a migração das células C2C12. É bem estabelecido que após um dano celular, a própria injúria estimula as células a entrarem em ciclo celular a fim de reparar/regenerar o dano celular. O ensaio consistiu em analisar o reparo após 2h, 12h e 16h após lesão de células C2C12 tratadas ou não com ácido palmítico. Na **figura 13**, podemos observar que o ácido palmítico na menor concentração não afeta a migração e proliferação celular, uma vez que após 2h, observa-se migração celular e após 16h, as células preenchem o local da lesão realizada. Entretanto, a concentração de 150µM de ácido palmítico, observamos um menor número de células que migram após 2h e após 16h ainda há espaços sem células, indicando uma menor capacidade de migrar e reparar a lesão ocasionada.

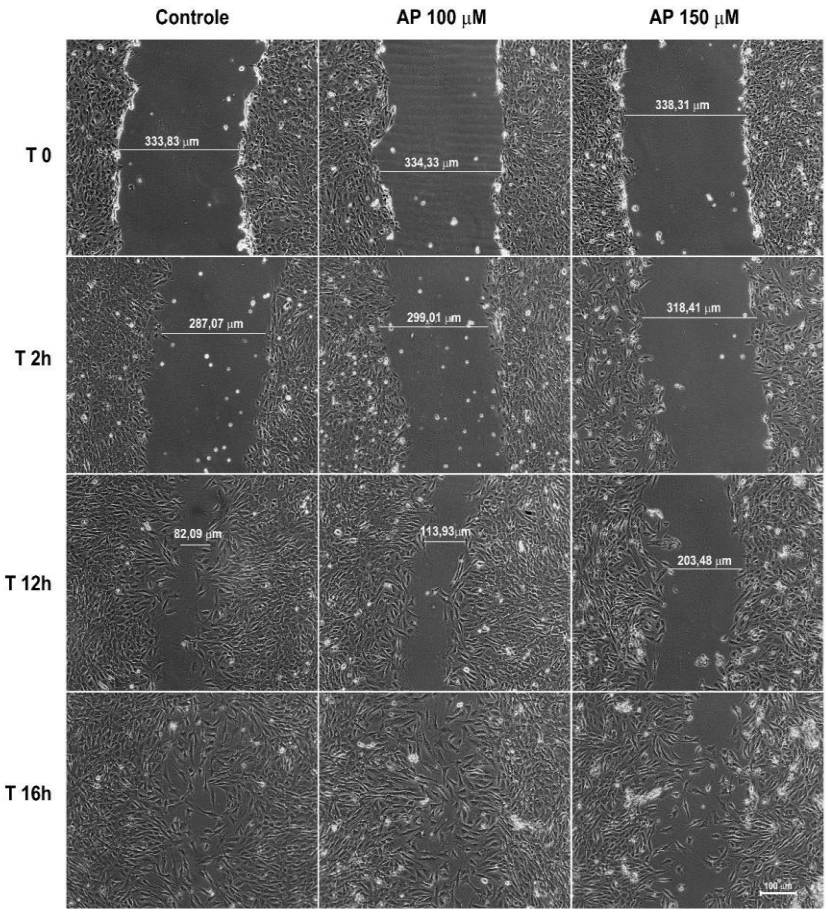


Figura 13. Ensaio de cicatrização em C2C12 em meio de proliferação.

4.3. Ensaio TUNEL

As células foram plaqueadas e quando atingiram 100% de confluência, os mioblastos foram tratados com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM) por 24h. Como controle negativo para a técnica foi utilizado células C2C12 sem nenhum tipo de tratamento.

O ensaio TUNEL foi realizado para avaliar processo de apoptose celular nos mioblastos tratados com veículo ou ácido palmitico (100µM e 150µM). Na **figura 14** podemos observar que tanto o grupo controle (**figura 14D**) como os tratados (**Figuras 14G e 14J**) não possuem células apoptóticas (marcadas em vermelho). Foram capturadas 4 fotos/poço (4 quadrantes), e um n=3 para cada grupo. Os mioblastos foram visualizados em objetiva de 20x. O ensaio TUNEL nos mostrou que nosso tratamento como também o próprio veículo não leva a morte celular por apoptose.

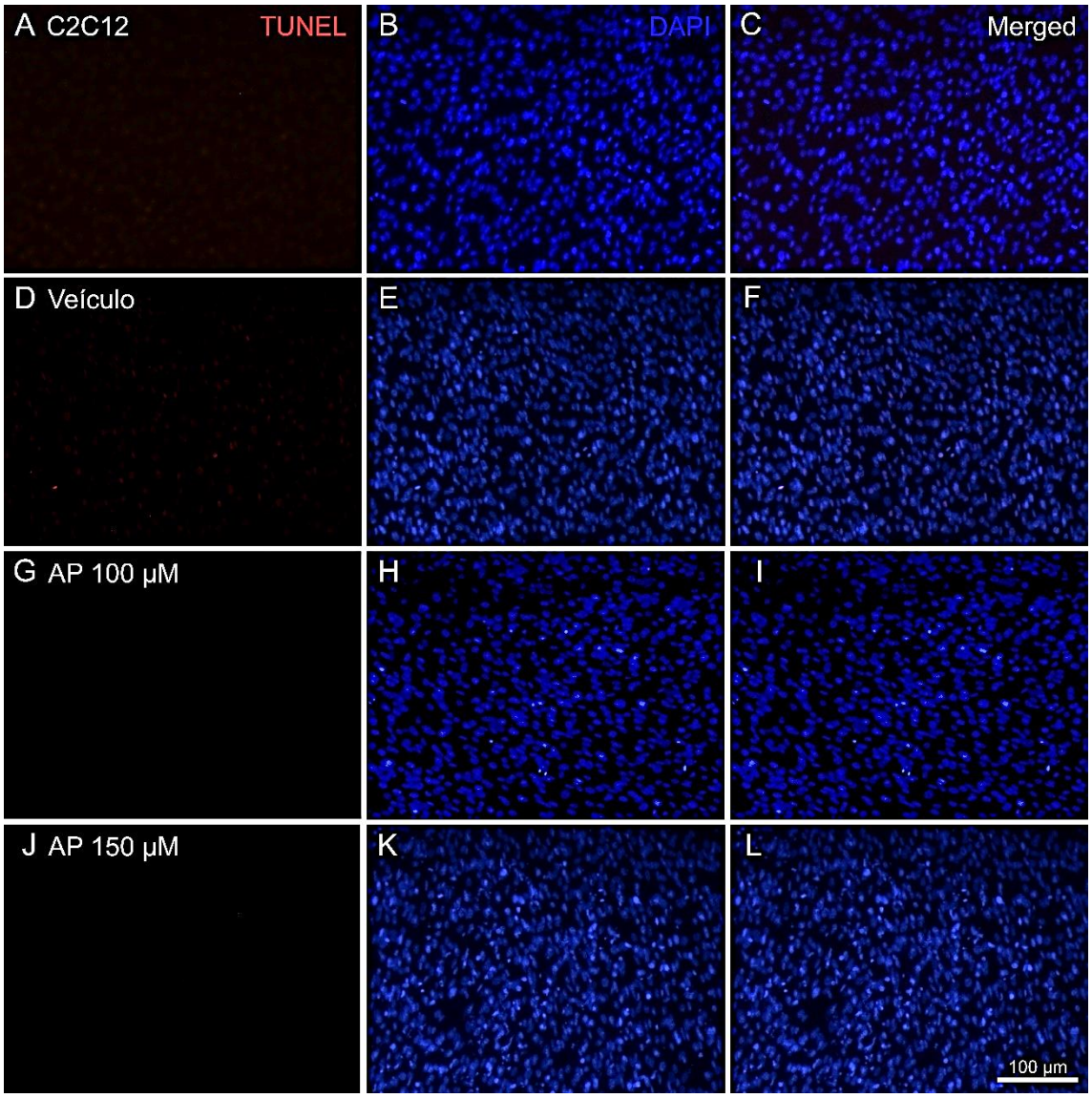


Figura 14. Ensaio de TUNEL em C2C12 tratadas por 24h em meio de proliferação.
A. Células C2C12 sem nenhum tratamento imunomarcadas com tetrametil rodamina. **B.** Células C2C12 sem nenhum tratamento imunomarcadas com DAPI. **C.** Sobreposição de A e B. **D.** Mioblastos tratados com veículo por 24h e imunomarcados com tetrametil rodamina. **E.** Mioblastos tratados com veículo por 24h e imunomarcados com Dapi. **F.** Sobreposição de D e E. **G.** Mioblastos tratados com ácido palmítico (100µM) por 24h e imunomarcados com tetrametil rodamina. **H.** Mioblastos tratados com ácido palmítico (100µM) por 24h e imunomarcados com Dapi. **I.** Sobreposição de G e H. **J.** Mioblastos tratados com ácido palmítico (150µM) por 24h e imunomarcados com tetrametil rodamina. **K**. Mioblastos tratados com ácido palmítico (150µM) por 24h e imunomarcados com Dapi. **L.** Sobreposição de J e K. Aumento de 20x. (n=3 para cada grupo).

4.4 Efeito do ácido palmítico na formação de miotubos

Para confirmamos a capacidade de diferenciação da nossa linhagem celular, as células foram diferenciadas por 5 dias e imunomarcadas com MyHC-tipo 1 ou MyHC-

tipo 2, um marcador de diferenciação de miotubos. Na **figura 15**, podemos observar que mioblastos não expressam nenhum dos tipos e miotubos diferenciados expressam tanto MyHC tipo 1 como tipo 2.

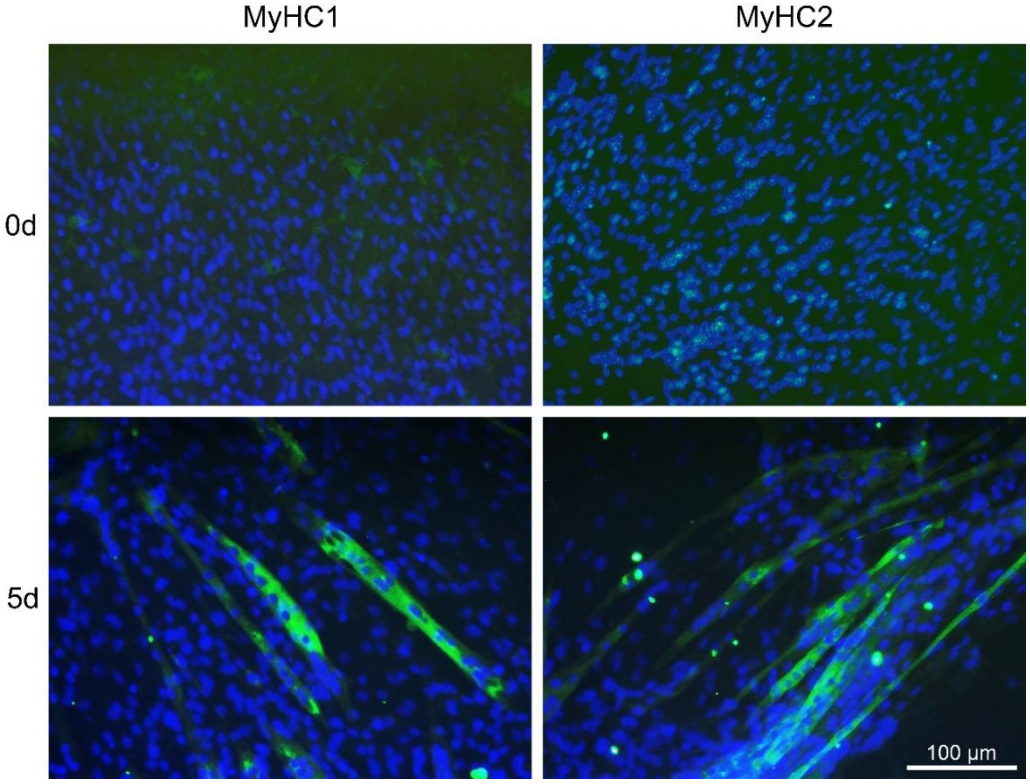


Figura 15. Cultura de células C2C12 indiferenciadas (0d) e após 5 dias de diferenciação (5d) imunomarcadas com anti-MyHC-1 e MyHC-2.
As células foram visualizadas e capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 100 (Heidelberg, Alemanha). Aumento de 20X. d = dia(s).

Com finalidade de avaliar o efeito do ácido palmítico no processo de diferenciação das células C2C12, as células foram cultivadas em MP e foram diferenciadas por 1 dia até 5 dias e foi adicionado ácido palmítico (0 a 150 µM) em MD no primeiro dia de diferenciação (tempo 0 dia), esse meio foi trocado a cada 24 horas (**Figura 15**).

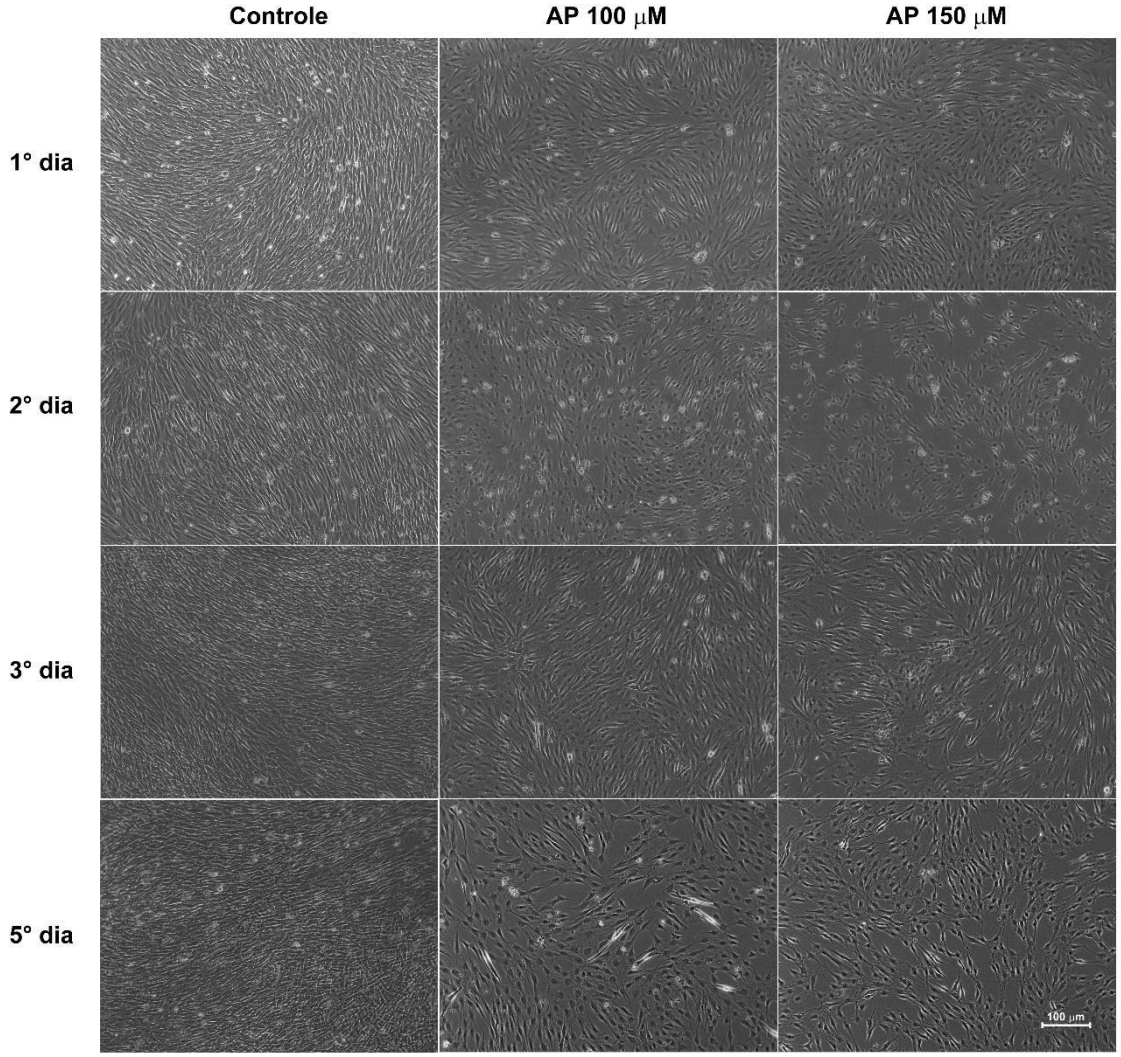


Figura 16. Cultura de células C2C12 tratadas com ácido palmítico 0 a 150 µM e diferenciadas por 1-5 dias.
As células foram visualizadas e capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 100 (Heidelberg, Alemanha). Aumento de 10X.

Os miotubos tratados com o ácido palmítico nas concentrações de 250µM, 500µM e 750µM perderam morfologia celular desde o primeiro dia de tratamento, mostrando que seria inviável permanecer com essas concentrações, pois, o palmitato interfere na diferenciação dos miotubos inibindo a formação dos mesmos (dados não mostrados). Já as concentrações de 100µM e 150µM não inibiram a diferenciação celular, embora, visualmente pareçam diminuir a quantidade de miotubos (**Figura 16**). A partir desses resultados somados aos resultados de proliferação e citotoxicidade, prosseguimos com as concentrações de 100µM e 150µM para avaliar se essas concentrações de AP induzem atrofia muscular. Para tal, realizamos o tratamento das células C2C12 com ácido

palmítico (100µM e 150µM) ou seu veículo (etanol 0,19%) e a diferenciamos por 5 dias, quando os miotubos foram imunomarcados utilizando o anticorpo anti-MyHC-1e 2 (**Figura 17 e 18, respectivamente**). Após marcação, foi medido o tamanho e diâmetro dos miotubos. Nas **figuras19A** e **19B**, podemos observar que eles apresentam menor diâmetro e comprimento. Houve diminuição no diâmetro dos miotubos em aproximadamente 34% após 5 dias de tratamento, e o tamanho também foi reduzido, preservando a morfologia celular.

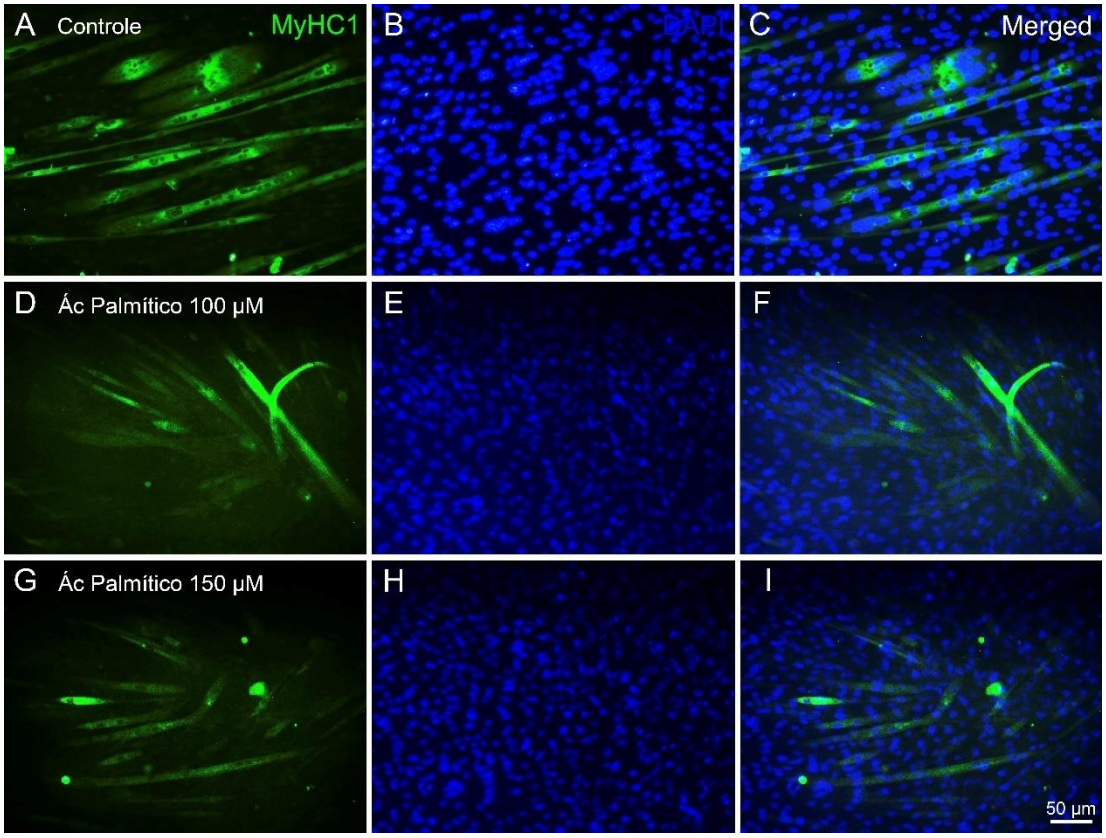


Figura 17. Miotubos tratados por 5 dias com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM), imunomarcados com anti-MyHC-1.
Capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 11 (Heidelberg, Alemanha). Aumento de 20x. **A.** Miotubos tratado por 5 dias com veículo e imunomarcado com anti-MyHC-1 (fluorescência verde). **B.** Núcleos dos miotubos tratados por 5 dias com veículo e imunomarcados com DAPI. **C.** Sobreposição das imagens A e B. **D.** Miotubos tratado por 5 dias com ácido palmítico (100µM) e imunomarcado com anti-MyHC-1. **E.** Núcleos dos miotubos tratados por 5 dias com ácido palmítico (100µM) e imunomarcados com DAPI. **F.** Sobreposição das imagens D e E. **G.** Miotubos tratado por 5 dias com ácido palmítico (150µM) e imunomarcado com anti-MyHC-1. **H.** Núcleos dos miotubos tratados por 5 dias com ácido palmítico (150µM) e imunomarcados com DAPI. **I.** Sobreposição das imagens G e H.

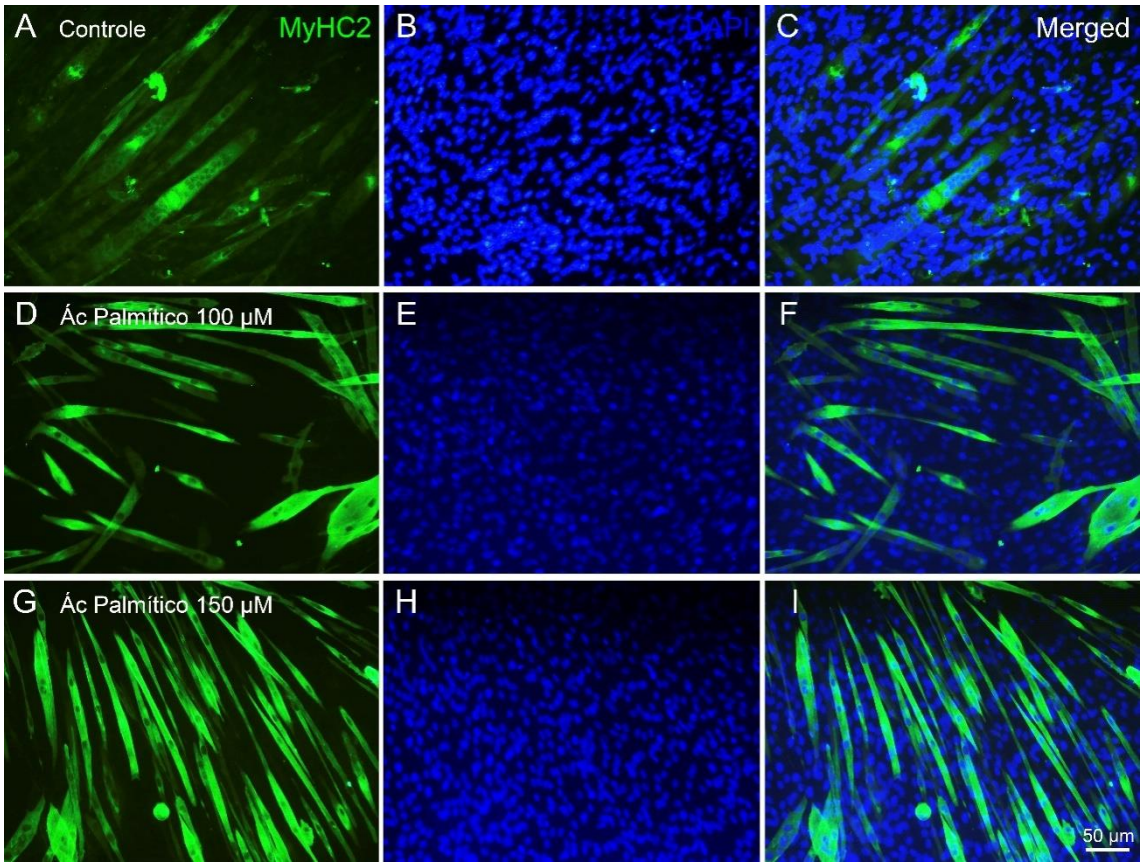


Figura 18. Miotubos tratados por 5 dias com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM), imunomarcados com anti-MyHC-2.

Capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 11 (Heidelberg, Alemanha). Aumento de 20x. **A.** Miotubos tratado por 5 dias com veículo e imunomarcado com anti-MyHC-2 (fluorescência verde). **B.** Núcleos dos miotubos tratados por 5 dias com veículo e imunomarcados com DAPI. **C.** Sobreposição das imagens A e B. **D.** Miotubos tratado por 5 dias com ácido palmítico (100µM) e imunomarcado com anti-MyHC-2. **E.** Núcleos dos miotubos tratados por 5 dias com ácido palmítico (100µM) e imunomarcados com DAPI. **F.** Sobreposição das imagens D e E. **G.** Miotubos tratado por 5 dias com ácido palmítico (150µM) e imunomarcado com anti-MyHC-2. **H.** Núcleos dos miotubos tratados por 5 dias com ácido palmítico (150µM) e imunomarcados com DAPI. **I.** Sobreposição das imagens G e H.

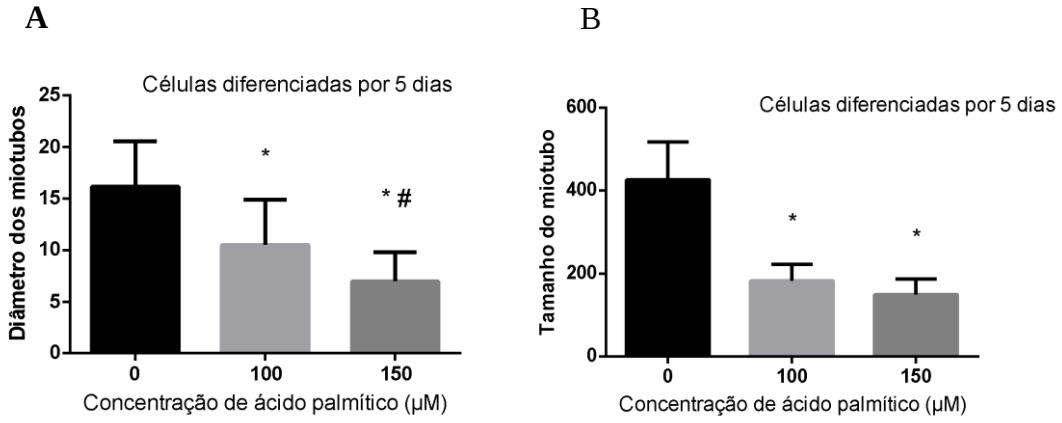


Figura 19. Diâmetro e comprimento dos miotubos das células tratadas com 5 dias de diferenciação e imunomarcadas com MyHC1.
Foram medidos seis diâmetros (*µm*) por miotubo e cerca de 50 miotubos por grupo. * P< 0,05 *versus* Controle e # P< 0,05 *versus* ácido palmítico 100µM, indicado pela análise multivariada de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

Nas **figuras 19A** e **19B** estão representados os resultados do diâmetro e tamanho dos miotubos, respectivamente, obtidos através da medição das células positivas para miosina de cadeia pesada, tipo 1 (MyHC-1). O ácido palmítico 100µM e 150µM reduziu o diâmetro dos miotubos quando comparado com o controle, sendo que a concentração de 150µM teve uma redução ainda maior quando comparado a de 100µM. Com relação ao tamanho dos miotubos (**figura 19B**) houve uma redução no tamanho das células tratadas com ácido palmítico quando comparados com o controle. Desse modo, esses dados sugerem que o tratamento com ácido palmítico 100µM e 150µM induziu atrofia em células C2C12.

Podemos observas nas **figuras 17** e **18** uma redução no número de miotubos marcados com MyHC-1 e aumento dos miotubos marcados com MyHC-2, respectivamente, após tratamento com 100 (**figura 17D** e **18D**) e 150 µM (**figuras 17G** e **18G**) em comparação ao controle (**figuras 17A e 18A**). A MyHC-2 é expressa em maior quantidade em fibras tipo II, de contração rápida e metabolismo glicolítico, enquanto a MyHC-1 é mais expressa em fibras tipo I, de contração lenta e metabolismo oxidativo (BIRESSI *et al*., 2007; LIEBER 2002; SILVA & CARVALHO2007). Deste modo, nossos resultados apontam que AP parece induzir uma conversão do tipo de fibras musculares do tipo 1 para o tipo 2, o que pode implicar em uma capacidade oxidativa reduzida das células musculares.

Uma menor proporção de fibras tipo 1 em indivíduos com síndrome metabólica já foi descrito e a menor proporção dessas fibras se correlaciona com a severidade de resistência à insulina (STUART *et al*. 2013). Nesse mesmo sentido, tanto indivíduos obesos como diabéticos tipo 2 apresentam menor proporção de fibras tipo 1 e aumento de fibras tipo 2X. (revisado em TALBOT & MAVES 2016).

O ácido palmítico é o ácido graxo saturado sistêmico mais abundante no músculo esquelético (CHAVEZ & SUMMERS 2003;BRYNER *et al*., 2012), seus efeitos *in vitro* em diferentes linhagens resultou em apoptose celular devido a inibição da atividade da AKT em resposta à insulina e o palmitato na concentração de 0,750mM induziu resistência à insulina em células C2C12 diferenciadas inibindo a fosforilação da AKT e induzindo a síntese de DAG e ceramidas (BRYNER *et al*., 2012; CHAVEZ; SUMMERS, 2003; YANG *et al*., 2013).

Essa redução no diâmetro e tamanho dos miotubos devido a indução de RI por ácido palmítico pode ser a causa para uma redução na síntese proteica pela via PI3K/AKT/mTor. Avaliamos no quinto dia de diferenciação as células tratadas ou não com AP a expressão da p-AKT e da p $P70^{S6K}$ (**figura 21**).

A proteína $P70^{S6K}$ é ativada diretamente pela mTOR. Não houve alterações significativas no quinto dia de diferenciação, entretanto, observamos um aumento dessa proteína nas células tratadas com AP 100µM. A mTOR é uma quinase evolutivamente conservada e é formada por dois complexos funcionais; mTORC 1 e mTORC 2. Esses dois complexos se diferenciam por possuírem proteínas essenciais distintas, enquanto que a mTORC 1 interage com a subunidade Raptor, a mTORC 2 interage com a subunidade Rictor. Além disso, esses complexos atuam em diferentes vias, realizando diferentes funções celulares. (COQUILLARD *et al*., 2015; MALLEY & PIDGEON 2015).

mTORC1 é considerada regulador chave de autofagia (MAMMUCARI *et al*., 2008), as células eucarióticas desenvolveram um mecanismo pelo qual a indução da autofagia é fortemente acoplada à regulação do crescimento celular que por sua vez é regulada por essa proteína em resposta às condições fisiológicas celulares (JUNG *et al*., 2010). Estudo (JUNG *et al*., 2010) relata que Atg1, uma serina quinase evolutivamente conservada é o primeiro componente ativado na jusante da mTOR na via da autofagia em leveduras e desempenha um importante papel nos estágios iniciais da indução desse

processo. Cepas com Atg1 nula mostraram defeitos na autofagia quando a mTOR é inibida. Em células de mamíferos, Atg1 é conhecida como ULK1, e vários estudos mostram que mTORC1, semelhante a mTOR da levedura, fosforila componentes Atg de mamíferos (JUNG *et al*., 2009; GANLEY *et al*., 2009). Adicionalmente, eles observaram que a mTORC1 poderia fosforilar ULK1 e ULK2 *in vitro*.

Além disso, eles observaram que inibindo mTORC1 com rapamicina levou a desfosforilação de ULK1, ULK2 em células humanas sugerindo que ULK1/2 e seriam efetores diretos de mTORC1 (JUNG *et al*., 2009; GANLEY *et al*., 2009).

4.5 Efeito do ácido palmítico sobre as proteínas da via de sinalização IGF1

Atrogin 1 e MuRF1 são enzimas E3 ligases que participam na degração de proteínas pela via do proteassoma da ubiquitina. Elas foram descritas primeiramente em roedores em modelo de atrofia muscular, desde então, a expressão desses genes tem se mantido elevada constatemente em modelo de perda de massa muscular (diabetes, desnervação, insuficiencia renal) (FOLETTA *et al*., 2011).

Estudo realizado por SANDRI e cols. (2004) mostrou que a regulação transcricional de atrogin e MuRF1 em camundongos ocorre pela família dos fatores de transcrição FoxO. FoxO1 age indiretamente nesses genes bloqueando genes envolvidos na IGF-1 e consequentemente elevando os nives de expressão desses genes. Em contrapartida, FoxO3a atua diretamente ligando-se ao a atrogin no músculo de camundongo, elevando a transcrição desse gene.

Nossos resultados mostram que no quinto dia de diferenciação não houve alterações signifivativas na expressão do atrogin 1 (**figura 20B**), entretanto, observa-se um aumento no nível de expressão de atrogin no primeiro dia de diferenciação nos grupos tratados com AP (100µM e 150µM) quando comparados com o controle (**figura 20A**).

Estudos com o ácido palmítico na concentração de 500µM mostrou induzir atrofia em células C2C12 (BRYNER *et al*., 2012), o aumento de atrogin no primeiro dia de diferenciação sugere que há uma maior taxa de degradação de proteinas nesse dia, o que pode ter afetado a formação do miotubo. O fato de não termos observado aumento de atrogin-1 no quinto dia da diferenciação, pode ser devido ao fato do miotubo já estar formado e possivelmente o AP afeta o crescimento do miotubo já na fase inicial.

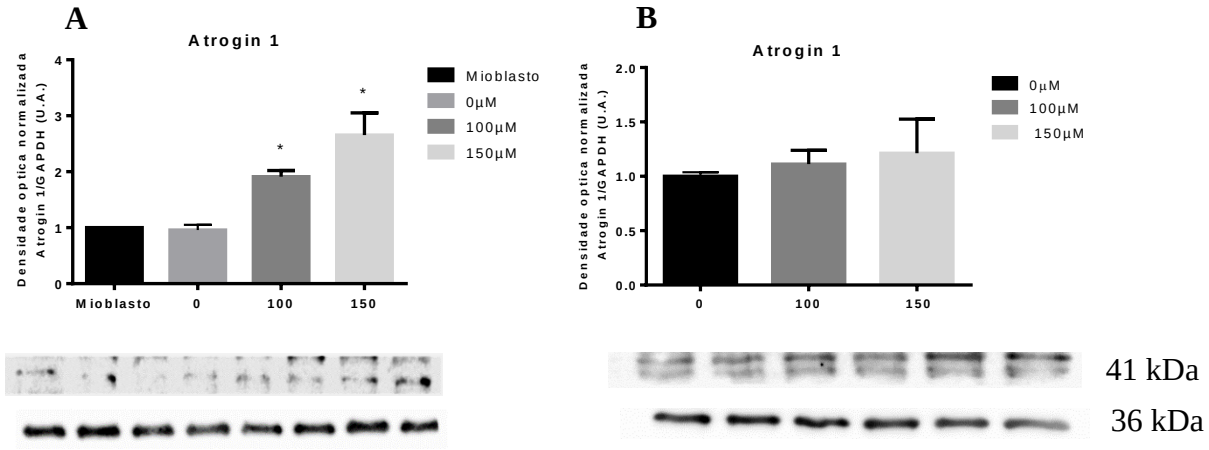


Figura 20. Abundância de atrogin 1 em células C2C12.
A. Células indiferenciadas (mioblasto) e diferenciadas por 1 dia e tratadas com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM). **B.** Células diferenciadas por 5 dias e tratadas com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM). *P<0,05 *versus* Controle, avaliado por Análise multivariada de 2 vias, seguido do pós-teste de Tukey. (n=4 para cada grupo).

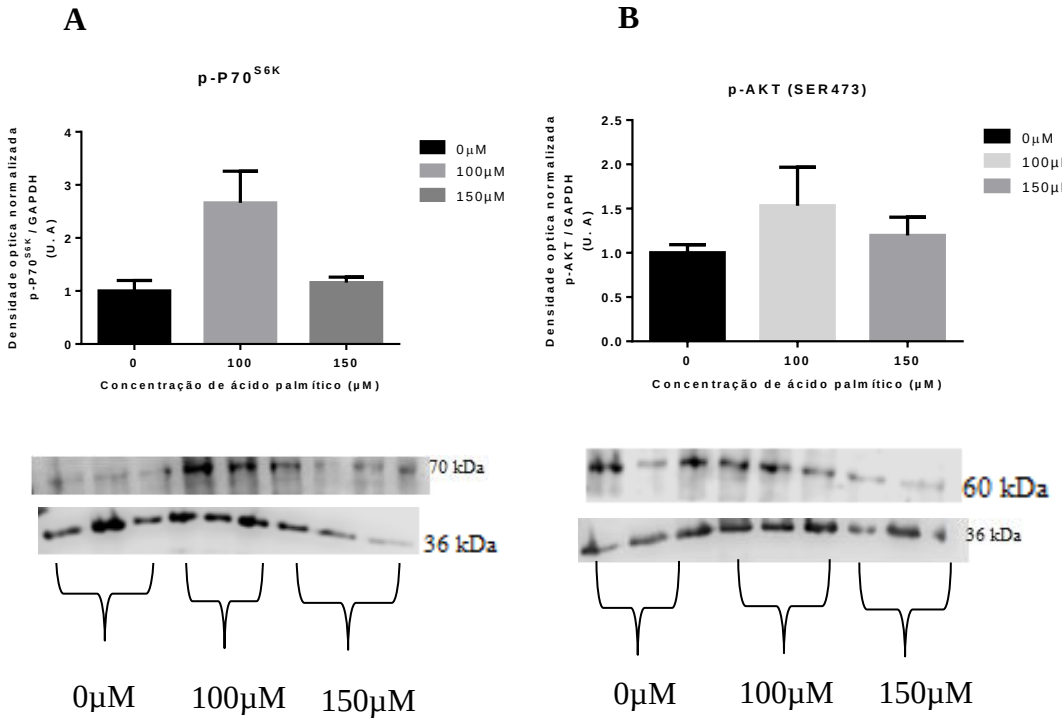


Figura 21. Proteínas envolvidas com a síntese proteica.
Células diferenciadas por 5 dias e tratadas com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM e 150µM). **a.** Status de fosforilação de $P70^{s6k}$ no quinto dia de tratamento. **b.** Status de fosforilação de AKT (Ser473) no quinto dia de tratamento. *P<0,05 *versus* Controle, avaliado por Análise multivariada de 2 vias, seguido do pós-teste de Tukey. (n=3 para cada grupo).

4.6 Efeito do ácido palmítico nos marcadores miogênicos

Com relação ao gene *MyH7* e miomesina foi observado um aumento na sua expressão a partir do 4º dia de diferenciação tanto nas células controle como tratadas com ácido palmítico (**Figura 22**). HUANG e cols. (2017) trataram as células com dexametasona, um controle positivo para atrofia, e observaram que a expressão de MyH7 estava aumentada.

A expressão de *Mstn* aumenta nos miotubos controle diferenciados por 4 dias, no entanto isso não ocorre nas células tratadas com ácido palmítico *(***Figura 23***)*. Estudos sugerem que o aumento na expressão de miostatina induz a degradação proteica a partir da ativação de FoxO3 que consequentemente ativa atrogenes como MABx/atrogin-1 e Murf1. Em ensaios com animais a ausência do gene levou a um aumento significativo da massa muscular, ao mesmo tempo, sua indução mostrou uma diminuição da massa muscular sugerindo que a Mstn é um regulador negativo no desenvolvimento muscular. (MCPHERRON *et al*., 2002; HAMRICK *et al*., 2002 apud ELKINA *et al*., 2011). Nossos resultados mostram que os níveis de Mstn e de atrogin não são significativos no quinto dia de diferenciação nos grupos tratados com ácido palmitico, entretanto a expressão de atrogin (**figura 20A**) e Mstn (**figura 23**) começam a se elevar a partir do primeiro e segundo dia, respectivamente, sugerindo um aumento de degradação proteica e limitação do crescimento celular.

O *myogenic factor 5* (MyF5) é um fator de transcrição que está envolvido na proliferação e diferenciação celular. De acordo com PANDA e cols. (2016) o silenciamento de sua expressão gênica, induziu uma diminuição na replicação de mioblastos e uma redução no número, diâmetro e comprimento em miotubos. Em células C2C12 que possuem uma diminuição na expressão de MyF5 a diferenciação celular é menos eficiente quando comparado com células controle. Além disso, houve uma diminuição na atividade da enzima creatina quinase, um marcador de células diferenciadas no terceiro e sexto dia de diferenciação. No presente estudo observamos uma diminuição na expressão de MyF5 nos grupos AP100µM e AP150µM quando comparados como grupo controle (**figura 23**), resultados esses que corroboram com os apresentados pelo HUANG (2016).

Além disso foi observado uma diminuição significativa na expressão de *MyoD*, responsável pela diferenciação celular, nas células tratadas com ácido palmítico quando comparado ao miotubos com 5 dias de diferenciação (**figura 23**). Com isso sugerimos que o AP pode alterar o processo de diferenciação em C2C12 pela modulação da expressão de fatores miogênicos.

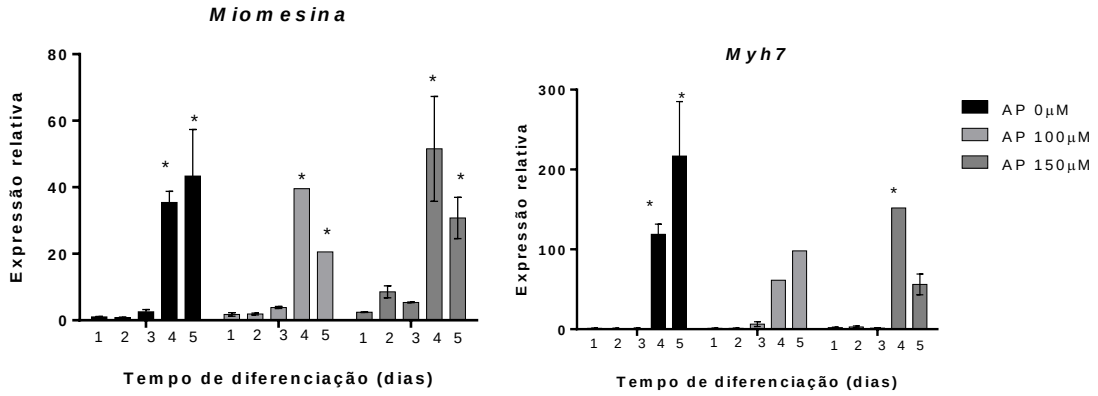


Figura 22. Expressão mRNA dos marcadores de diferenciação tardia Myh7 e Miomesina em células diferenciadas por 5 dias e tratadas com ácido palmítico (100µM-150µM) ou veículo (0µM).
Myogenic differentiation 1 (MyoD); Myosin heavy chain 7 (MyH7). P< 0,05 por análise multivariada de duas vias seguido do pós-teste de Tukey.

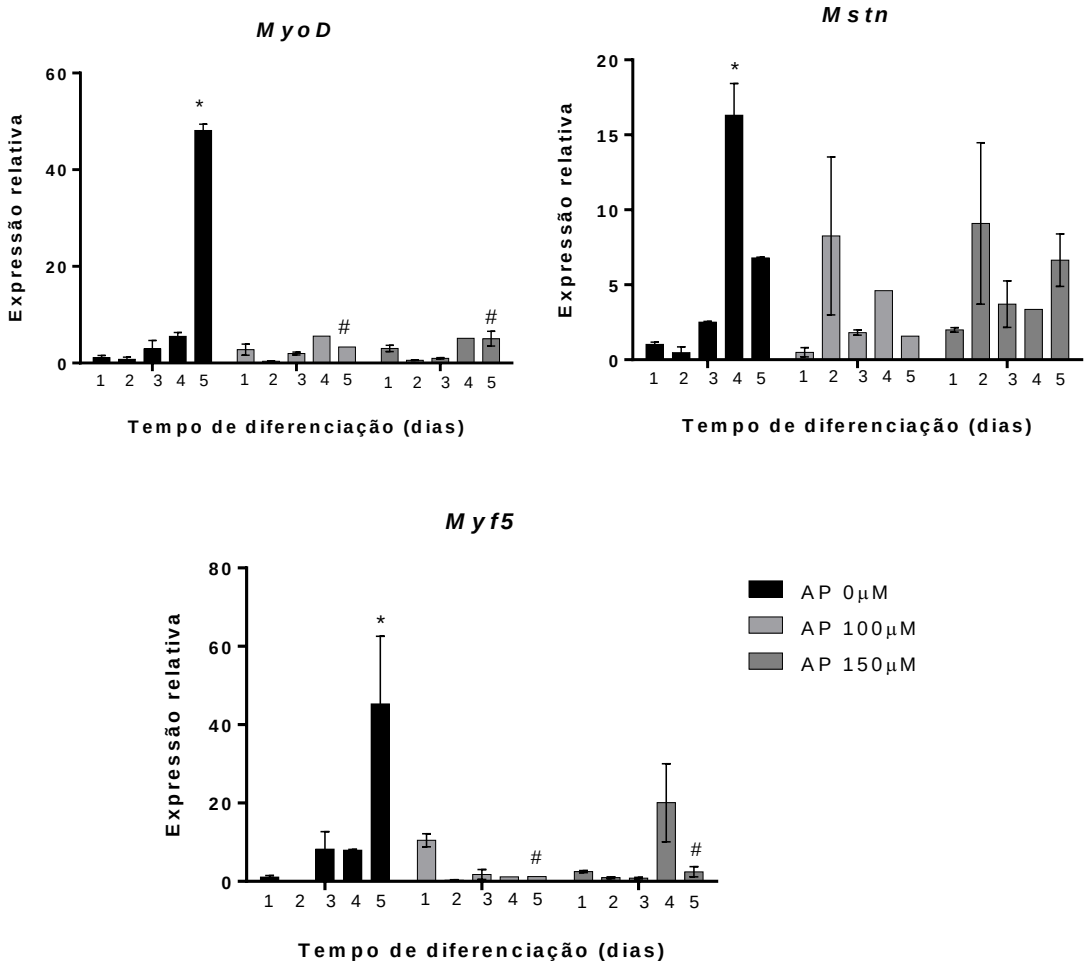


Figura 23. Expressão de mRNA dos fatores miogênicos em células diferenciadas por 5 dias e tratadas com ácido palmítico (100µM-150µM) ou veículo (0µM).
Myogenic fator 5 (MyF5); MyoD; Miostatina (Mstn). *P< 0,05 versus controle 1dia; #versus controle 5dias por análise multivariada de duas vias seguido do pós-teste de Tukey.

4.7 Efeito do ácido palmítico na expressão de microRNAs

Notavelmente, o miR-1 é necessário para o crescimento e diferenciação muscular pós-mitótica (SHEN *et al*., 2013). Em estudo realizado por (SAYED *et al*., 2007) eles mostraram que o miR-1 é um dos miRNAs mais precocemente regulado negativamente durante a hipertrofia muscular, em outro estudo (SHEN *et al*., 2013) eles relatam que o miR-1 em células C2C12 tratadas com dexametasona apresenta um perfil de expressão significativamente elevado. Observa-se na **figura 24** um aumento na expressão dos miR-1 a partir do terceiro dia de diferenciação nas células controle e tratadas com ácido palmítico 100µM, no entanto o ácido palmítico 150µM apresenta um pico de expressão

com 3 dias e diminui com 4 dias, mantendo essa expressão. Nossos resultados corroboram com esses dois autores, uma vez que o processo de hipertrofia muscular é uma condição oposta ao processo de atrofia e a via de sinalização envolvida nesses dois processos está ligada através da regulação da atividade de moléculas comuns as duas vias celulares, que determina se o tecido muscular esquelético responderá a estímulos com aumento da síntese protéica (hipertrofia muscular) ou aumento da degradação de proteínas (atrofia muscular). Adicionalmente, os autores (SHEN *et al*., 2013) especulam que o miR-1 é um potencial biomarcador para servir na detecção não invasivo de atrofia muscular ou hipertrofia.

Já o miR-206, enquanto nas células controle e tratadas com ácido palmítico 100µM aumentam a partir do quarto dia de diferenciação, nas células tratadas com ácido palmítico 150µM ocorre um pico de expressão no quarto dia e logo no quinto dia a expressão retorna ao níveis do primeiro dia (**figura 24)**. Com esses achados sugerimos que o AP pode afetar o processo de diferenciação celular a nivel dos microRNAs envolvidos nesse processo.

Estudo relata (GULLER *et al*., 2000) que a expressão do miR-133a está elevada em casos de hipertrofia, dessa forma, esperavamos que a expressão desse microRNA estivesse diminuida na atrofia, uma vez que esses processos envolve vias opostas. Nossos resultados mostram que a expressão do miR-133a aumenta no segundo dia no AP 100µM quando comparado com o grupo controle e depois retorna aos niveis parecido com o controle. Dessa forma, sugerimos que o AP possa interferir no processo de proliferação, apesar das células estarem em diferenciação, elas ainda apresentam uma taxa de crescimento (proliferação). Além disso, um aumento na expressão desse miR pode explicar o aumento na degradação proteica por UCP2/via lissosomal, pois não encontramos alterações na via ubiquitina-proteassoma (**Figura 21a**). Entretanto, na **figura 21a** observamos um aumento da proteína p-P70s6k, no grupo AP 100µM quando comparado com os outros grupos.

Em estudo mais recente (CHEN *et al*., 2009) foi observado que a UCP2; proteína de desacoplamento que está localizada na membrana mitocondrial é um alvo direto do miR-133a e que essa proteína desempenha um papel inibidor na diferenciação muscular e promove a proliferação de mioblastos.

Além de inibir a diferenciação, a proteína UCP2 é responsável por ativar o mecanismo de autofagia. A autofagia é um processo de degradação mediado pelos lisossomos, onde há formação de vesículas de membrana; os autofagossomos, com finalidade de degradar constituintes celulares não essenciais ou danificados. O alongamento da membrana autofagossomal implica conjugação da proteína da cadeia LC3 à fosfatidiletanolamina para formar um tipo lipídico de LC3 (LC3-II) que muitas vezes é utilizado como um marcador no processo de autofagia. (CHEN *et al*., 2008; DANDO *et al*., 2013). Dessa forma, hipotetizamos que esse aumento na expressão do miR-133a possa estar relacionada com um processo de autofagia, mediado pela proteína UCP2, uma vez que observamos um quadro claro de atrofia em miotubos tratados por 48h com o palmitato e, adicionalmente, não observamos alterações significativas das proteínas analisadas; atrogin-1 e muRF1 que são as enzimas E3-ligases e consideradas como marcadores de degradação proteica pela via da ubiquitina-proteassoma.

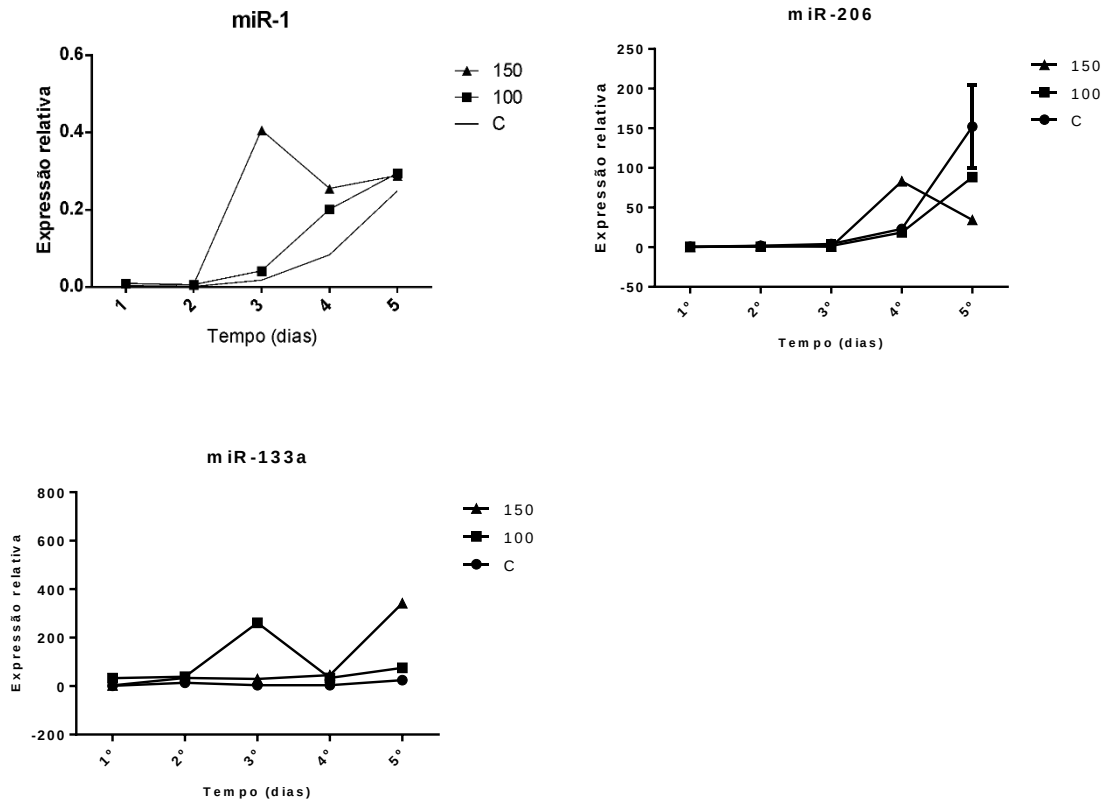


Figura 24. Expressão gênica dos miR-1, -133a e -206.
Células diferenciadas 1-5 dias e tratadas com ácido palmítico (100µM-150µM) ou veículo (0µM). *P< 0,05 por análise multivariada de duas vias seguido do pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS – PARTE II

Os resultados apresentados acima sugerem que o ácido palmítico nas concentrações utilizadas no presente estudo (100µM e 150µM) reduzem o processo de desenvolvimento miogênico possivelmente alterando a expressão de fatores relacionados a miogênese, tais como os mRNAs e os miomiRs, e assim prejudica a formação de miotubos. Com finalidade de investigar se o ácido palmitico induz atrofia em células já diferenciadas como também avaliar o padrão dos miomiRs, células C2C12 foram diferenciadas por cinco dias e no quinto dia de diferenciação as mesmas foram tratadas pelas 48h seguintes de acordo com seus respectivos grupos estabelecidos; controle (etanol 0,19%) ou ácido palmítico (100µM). Adicionalmente, foram avaliadas as proteínas; p-AKT(ser473), p-$P70^{S6K}$, $P70^{S6K}$, p-FoxO3a, atrogin-1 e MuRF-1, como controle interno foi utilizado o GAPDH.

Após, às 48h de tratamento, foi realizado ensaio de imunoflorescência, extração de RNA total para avaliação dos microRNAs e extração de proteínas, como mostra o esquema representativo abaixo (**Figura 25**).

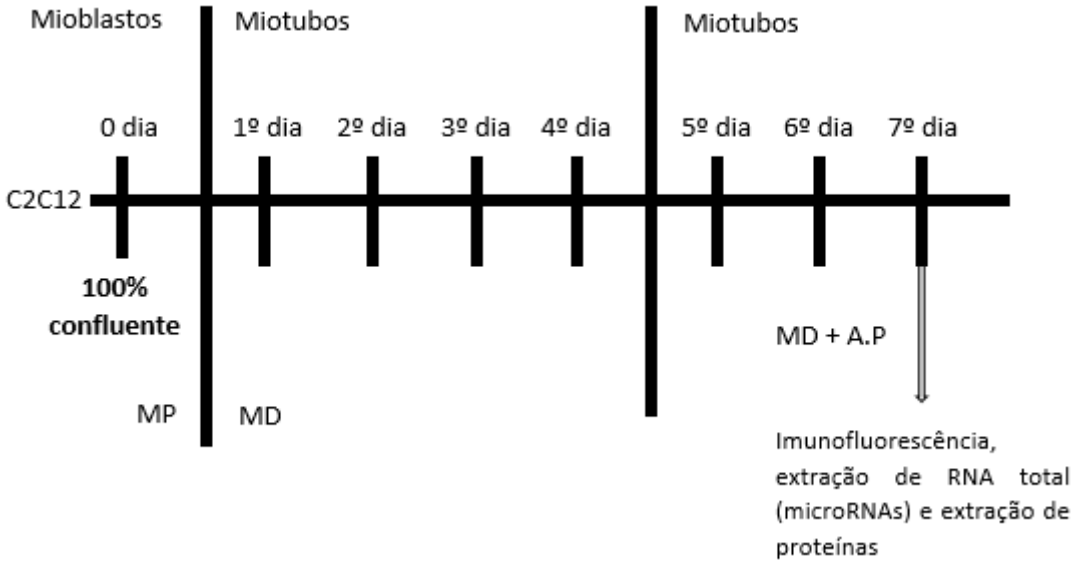


Figura 25. Esquema representativo do protocolo experimental e dos métodos que foram utilizados. MP: meio de proliferação (DMEM+10% soro fetal bovino); MD: meio de diferenciação (DMEM+2% de soro de cavalo); MD + A.P: meio de diferenciação + ácido palmítico 100µM. *Mioblastos foram diferenciados quando atingiram 100% de confluência, as células foram diferenciadas com MD até o quinto dia, nesse mesmo dia (5º dia) o MD foi trocado pelo MD+A.P, que ficou por 48h (7º dia). O MD+A.P foi

trocado uma vez durante as 48h de tratamento. No 7º dia foi realizado o ensaio de imunofluorescência e as células foram coletadas para análise de expressão de microRNAs e análise de proteína.

Inicialmente, com finalidade de avaliar atrofia em miotubos, as células foram diferenciadas por cinco dias e no quinto dia os miotubos foram tratados com ácido palmítico (100µM) ou veículo (etanol 0,19%) por 48h.Ao término desse tempo, os miotubos foram imunomarcados com o anticorpo anti-MyHC-1 (Sigma/M4276) e após marcação, foram medidos o tamanho e diâmetro dos miotubos. Nas **figuras 26** e **27** é possível observar as células imunomarcadas com anti-MyHC-.1 e anti-MyHC-2. Na **figura 28** estão representados os resultados do tamanho e diâmetro dos miotubos tratados por 48h.

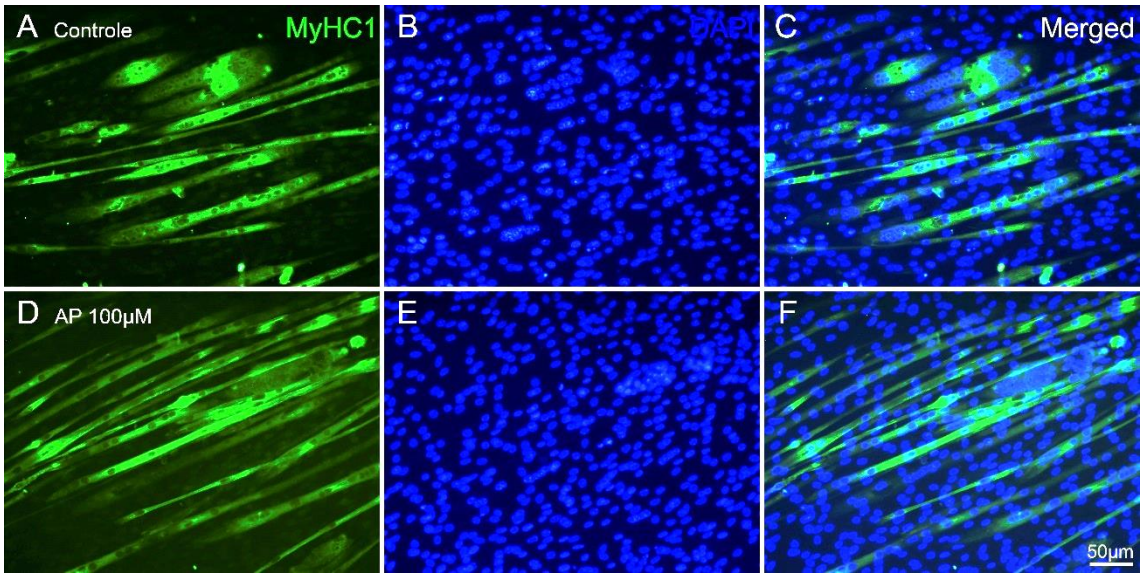


Figura 26. Miotubos diferenciados por 5 dias e tratados com ácido palmítico (100µM) ou veículo (etanol 0,19%) por 48h seguintes do quinto dia de diferenciação e imunomarcadas com anti-MyHC-1.

Capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 11 (Heidelberg, Alemanha). Aumento de 20x. **A.** Miotubo tratado com veículo (etanol) e imunomarcado com anti-MyHC-1. **B.** Núcleos dos miotubos tratados com veículo imunomarcados com Dapi. **C.** Sobreposição das imagens A e B. **D.** Miotubo tratado com ácido palmítico (100µM) e imunomarcado com anti-MyHC-1. **E.** Núcleos dos miotubos tratados com ácido palmítico (100µM) imunomarcados com DAPI**. F.** Sobreposição das imagens D e E.

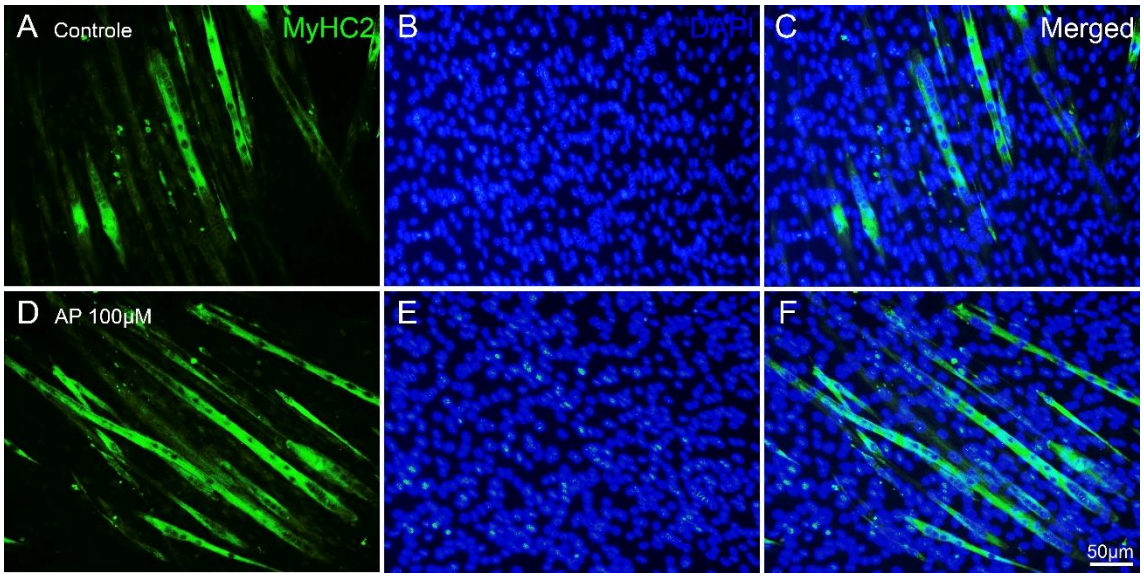


Figura 27. Miotubos diferenciados por 5 dias e tratados com ácido palmítico (100µM) ou veículo (etanol 0,19%) por 48h seguintes do quinto dia de diferenciação e imunomarcadas com anti-MyHC-2.

Capturadas em microscópio Zeiss Axiovert 11 (Heidelberg, Alemanha). Aumento de 20x. **A.** Miotubo tratado com veículo (etanol) e imunomarcado com anti-MyHC-2. **B.** Núcleos dos miotubos tratados com veículo imunomarcados com Dapi. **C.** Sobreposição das imagens A e B. **D.** Miotubo tratado com ácido palmítico (100µM) e imunomarcado com anti-MyHC-2. **E.** Núcleos dos miotubos tratados com ácido palmítico (100µM) imunomarcados com DAPI**. F.** Sobreposição das imagens D e E.

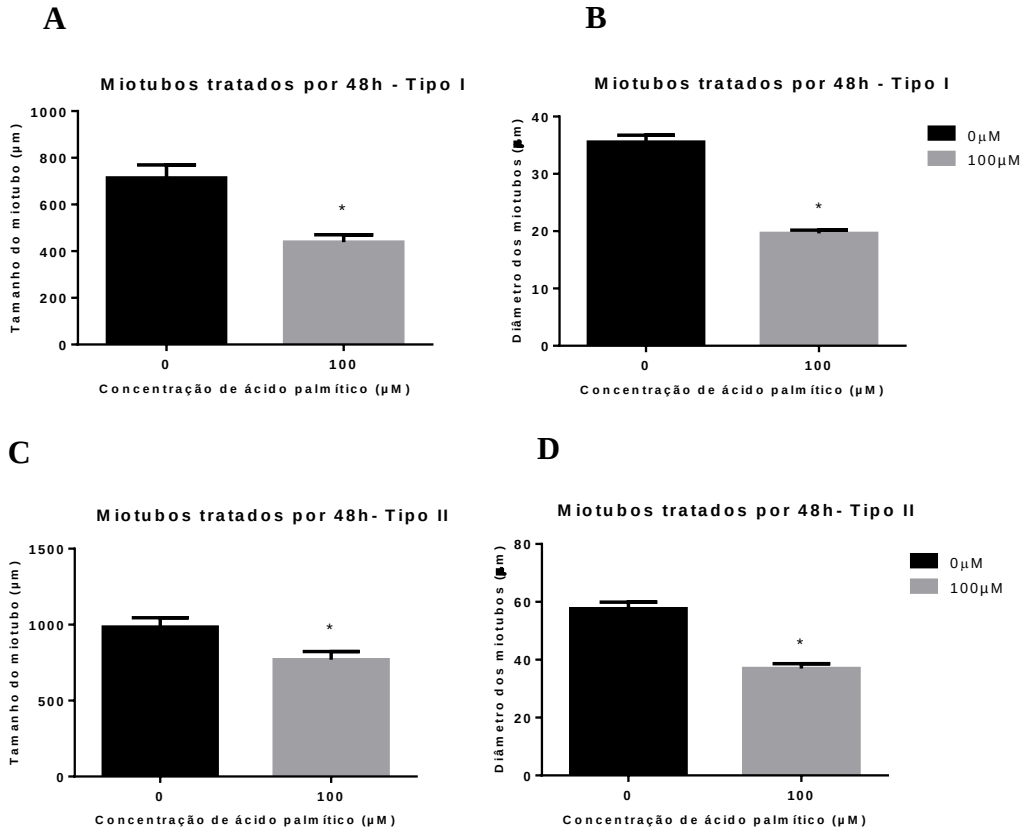


Figura 28. Comprimento e diâmetro dos miotubos diferenciados por 5 dias e posteriormente tratados por 48h com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100 µM).
Foram medidos seis diâmetros por miotubo e cerca de 30 miotubos por grupo. **A.** Tamanho dos miotubos do tipo de fibra I. **B.** Diâmetro dos miotubos do tipo de fibra I. **C.** Tamanho dos miotubos do tipo de fibra II. **D.** Diâmetro dos miotubos do tipo de fibra II. *P<0,05 *versus* Controle, indicado pelo Teste t.

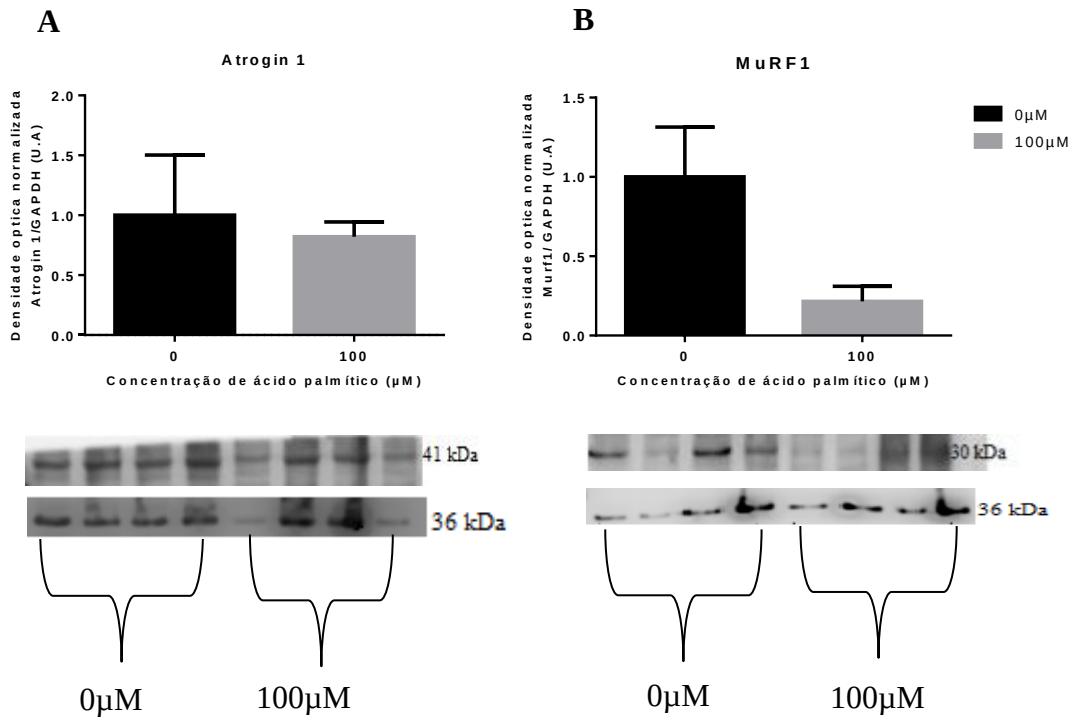
Foi observado uma redução no tamanho e diâmetro dos miotubos tratados com ácido palmítico (100µM) nas 48h seguintes a partir do quinto dia de diferenciação quando comparado com o grupo controle. Nossos resultados corroboram com (LEE *et al*., 2017) que observou uma diminuição no número, largura e comprimento de miotubos tratados com ácido palmítico. Adicionalmente, ele observou que quando a concentração de 300µMde ácido palmítico era excedida, começava a ter um aumento de mionúcleos fragmentados de maneira dose-dependente. Dessa forma, ele estabeleceu sua concentração padrão (300µM) afim de induzir atrofia sem sinais de apoptose celular.

BRYNER e cols. (2012) também avaliaram as condições morfológicas de miotubos tratados com 500µM de ácido palmítico, eles concluíram que em miotubos tratados por 24h não houve mudanças aparentes na morfologia, entretanto, em miotubos tratados por 48h e 96h, o diâmetro dos miotubos reduziram em 25% e mais de 90%, respectivamente, em comparação ao grupo controle.

5.1 Efeito do ácido palmítico sobre as proteínas em células diferenciadas por cinco dias

Atrogin-1 e MuRF1 são genes expressos seletivamente no músculo estriado, quando o músculo está em repouso os níveis dos mesmos tende a ser relativamente baixos, porém, a expressão deles aumenta antes do início da perda muscular, devido a isso, são conhecidos como reguladores chaves de atrofia muscular (BODINE *et al*., 2014)

Com relação as proteinas envolvidas na degradação proteica, não houve alteração significativa nos níveis de atrogin-1, MuRF1 e p-FoxO3A nas células diferenciadas e tratadas nas 48h seguintes (**Figura 29**). No entanto, casos foram encontrados em humanos com atrofia muscular onde a expressão de atrogin-1 e MuRF1 não foram encontradaselevadas (JONES *et al*., 2004). Apesar de não ser observado diferenças significativas na expressão da proteína p-FoxO3a, observa-se uma tendência a reduzir seu nível de expressão no grupo AP 100µM em comparação com o grupo controle. Uma diminuição na fosforilação da FoxO3a significa que essa proteína está mais ativa, e consequentemente consegue migrar do citoplasma onde ela fica retida (fosforilada/inativa) para o núcleo da célula com finalidade de ativar as E3-ligases (atrogin-1/muRF1).



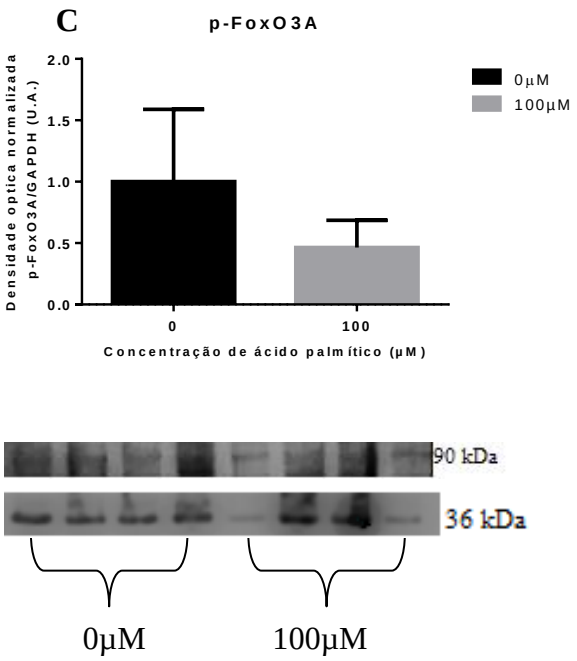


Figura 29. Proteínas envolvidas com a degradação proteica. Grupos: Controle (0µM) ou ácido palmítico (100µM). A. Abundância de atrogin 1após 48h de tratamento a partir do quinto dia de diferenciação. B. Abundância de MurF1 após 48h de tratamento a partir do quinto dia de diferenciação. C. Status de fosforilação da FoxO3aapós 48h de tratamento a partir do quinto dia de diferenciação. *P<0,05 *versus* Controle, indicado pelo teste t. (n=4 para cada grupo).A membrana de nitrocelulose foi cortada em 50 kDa com finalidade de marcar p-FoxO3a (90 kDa) e atrogin-1 (41kDa). Posteriormente, a parte da membrana que foi marcada com atrogin-1 foi stripada e marcada com o normalizador GAPDH (36 kDa). Devido a isso, se vê a mesma foto do normalizador em ambas as fotos (p-foxO3a e atrogin-1). A membrana marcada com a proteína muRF1(30 kDa) foi stripada e utilizada para marcar o normalizador GAPDH, essa mesma membrana foi cortada no 50 kDa para marcar a proteína p-AKT (Ser473).

Além das proteínas envolvidas na degradação, proteínas envolvidas com a síntese proteica também foram avaliadas (**Figura 30**).

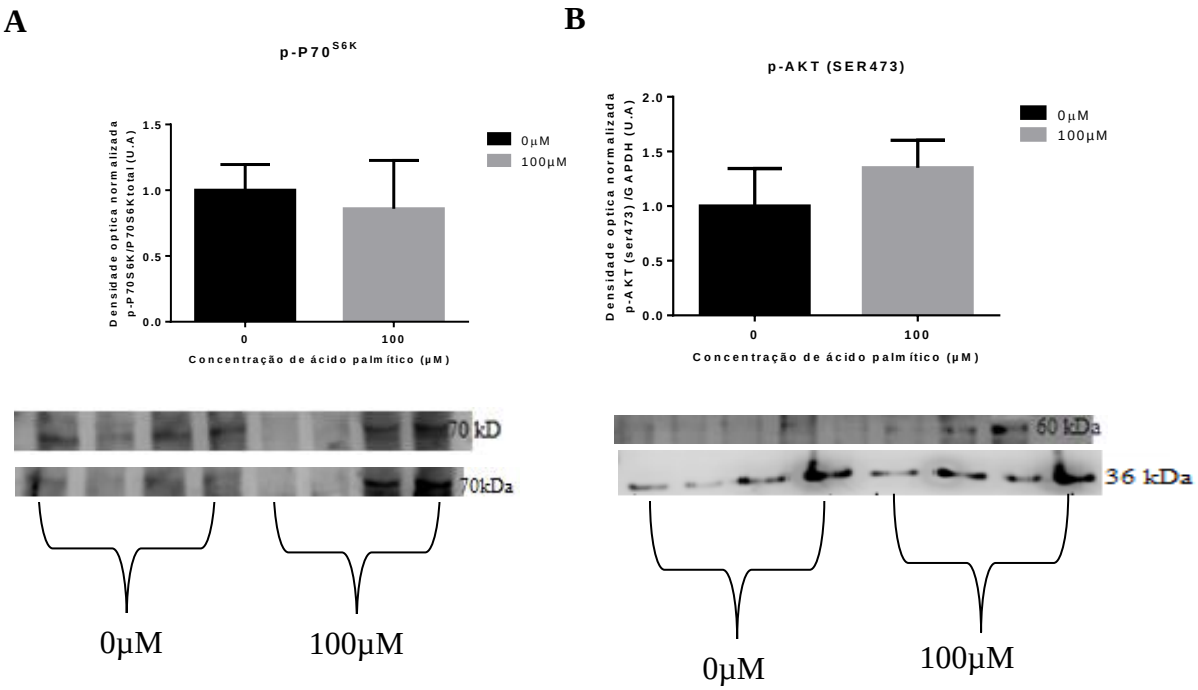


Figura 30. Proteínas envolvidas com a síntese proteica.
Grupos: Controle (0µM) ou ácido palmítico (100µM). **a.** Status de fosforilação de P70^{s6k}após 48h de tratamento a partir do quinto dia de diferenciação. **b.** Status de fosforilação de AKT (Ser473) após 48h de tratamento a partir do quinto dia de diferenciação. *P<0,05 *versus* Controle, indicado pelo teste t.(n=4 para cada grupo).

A p-P70^{S6K}é uma proteína responsável pelo controle do crescimento celular, biogênese dos ribossomos e síntese dos mRNA. A mesma é ativada diretamente via mTORC 1. Como podemos observar, a **figura 30a** mostra que não houve alterações significativas nessa proteína. Apesar de mostramos um quadro claro de atrofia induzida pelo palmitato (**figura 28**), esse resultado nos mostra que não houve alterações no que diz respeito a síntese proteica, via mTORC1/p-P70^{S6K}. Dessa forma, podemos sugerir que esse quadro de atrofia não tenha sido por um desequilibrio na sintese proteica via mTORC 1/p-P70^{S6K} uma vez que essa sinalização não foi afetada. Além da p-P70^{S6K}, a proteína p-AKT (Ser473) foi avaliada, também não foram encontradas alterações nessa proteína.

Nos hipotetizamos que atrofia induzida por palmitato fosse devido a um desequilíbrio entre a síntese (mTORC1) e degradação proteica (FoxO3a/atrogin-1/muRF1) via AKT/mTORC 1/FoxO3A. Nossos resultados mostram que essas vias não

foram alteradas e portanto outras vias em questão possam estar contribuindo para esse quadro de atrofia.

Entretanto, nós avaliamos as proteínas em um único ponto (48h), possivelmente, esse tempo de avaliação pode constituir uma janela muito grande para observar alterações nessas proteínas, principalmente em proteínas fosforiladas, apesar do fenótipo (atrofia) permanecer. Dessa forma, é necessário avaliar outras possíveis vias de sinalização que poderiam estar envolvidas no processo de atrofia.

5.2 Efeito do ácido palmítico sobre os microRNAs em células diferenciadas por cinco dias

A expressão dos myomiRs (miR-1, -206, -208b, -133a, -499 e -23a) foram quantificadas nas células com atrofia induzida por ácido palmítico. Na **figura 31** observa-se que apenas os microRNAs 206 e 133a apresentaram aumento estatisticamente significante em relação ao controle.

Os microRNAs estão sendo cada vez mais caracterizados como importantes reguladores na formação muscular, diferenciação miogênica, adaptação do músculo esquelético e já são indicados como importantes biomarcadores para doenças musculares (WINBANKS*et al*., 2013; WANG *et al*., 2017). Os miRNAs avaliados são considerados altamente expressos em músculo e desempenham papéis importantes no músculo esquelético (WANG *et al*., 2017). Dessa forma, propusemos avalia-los com finalidade de melhor entender suas expressões em modelo de atrofia induzida pelo palmitato.

Em estudo realizado por WANG e cols. (2017) eles avaliaram a expressão dos miR-1, -23a, -133, -206, -208b e -499 em células C2C12 em modelo atrófico, eles observaram um aumento na expressão desses miRNAs. Em contrapartida, (HUDSON *et al*., 2013) observou uma diminuição na expressão do miR-23a em músculo (gastrocnêmico) de ratos tratados por 3 dias com estreptozotocina. Nossos resultados mostram que não houve alterações significativas nos microRNAs avaliados, em modelo de atrofia induzida pelo ácido palmítico, com exceção dos miR-133a e 206.

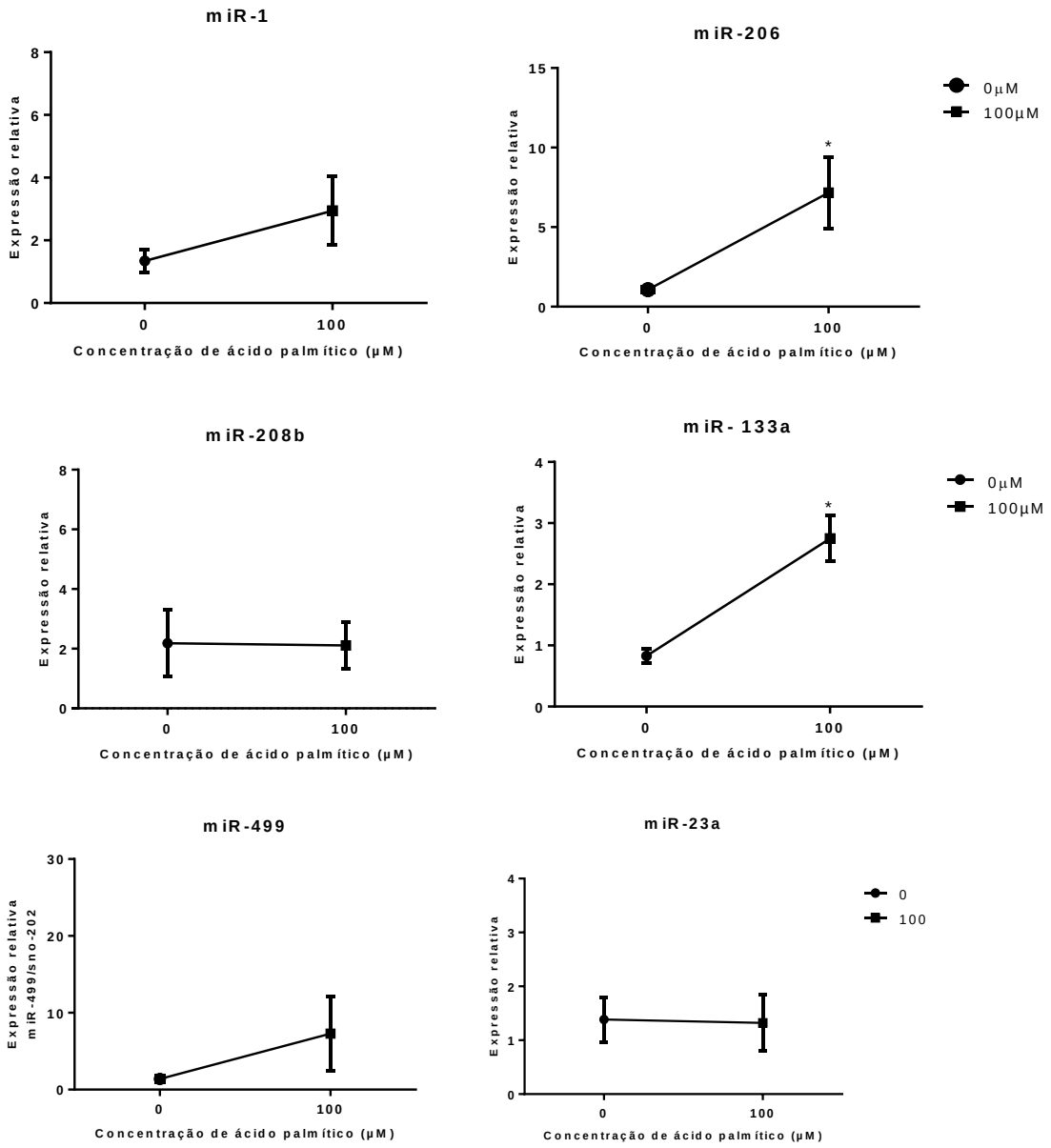


Figura 31. Expressão dos miR-1, -206,-208b, -133a, -499 e -23a.
Células diferenciadas por cinco dias e tratadas com veículo (0µM) ou ácido palmítico (100µM) por 48h a partir do quinto dia de diferenciação. *P<0,05 *versus* Controle, indicado pelo Teste t. (n=5 para cada grupo).

Os miR-1 e 206 são conhecidos por aumentar a diferenciação celular e diminuir na proliferação de mioblastos. Em um estudo realizado por GOLJANEK-WHYSALL e cols. (2012) mostra que esses dois miomiRs desempenham um papel fundamental na diferenciação de mioblastos, eles provaram que modificar a atividade desses miomiRs ou dos níveis de seus alvos tem um impacto negativo quando realizado após o início da diferenciação provando que esses miRs possuem papel fundamental para a manutenção da diferenciação celular.

Além disso, a deleção do miR-1 em mosca resultou em morte prematura, devido ao crescimento incompleto do músculo esquelético durante seu desenvolvimento inicial, provando a importância desse miRNA na regulação miogênica (SOKOL & AMBROS 2005).

Em estudo realizado por (KUKRETI *et al*., 2013) eles avaliaram a expressão do miR-1 em atrofia *in vivo* e *in vitro* induzida por dexametasona. As células C2C12 foram diferenciadas por 72h e tratadas com dexametasona ou controle. Eles constataram um aumento no nível de expressão do miR-1, (pré-miRNA e miRNA maduro) após 6 e 24h de tratamento nessas células. *In vivo*, camundongos C57BL/6J receberam injeções subcutâneas de solução salina (NaCl a 0,9%) ou dexametasona (5 g/g de peso corporal) diariamente, até ser observada perda de peso corporal de 18% nos camundongos. Eles também observaram esse aumento no nível de expressão do miR-1 quando comparados com animais controle. Os autores sugerem que esse aumento de miR-1 na atrofia é resultante da redução nos níveis de HSP70 (proteína que se encontra elevada durante o estresse celular no músculo esquelético), um possível alvo desse microRNA em resposta ao tratamento com dexametasona; os níveis de HPS70 foram revertidos pela adição de anti-miR-1.

O miR-206 promove a diferenciação do músculo esquelético pela inibição da histona desacetilase 4 (HDAC4), que controla negativamente a diferenciação muscular inibindo fatores regulatórios miogênicos como Myf5, MRF4 e miogenina. HUANG e cols. (2016) mostraram que em animais com desnervação muscular induzida do nervo ciático, em que o miR-206 foi injetado como uma forma de tratamento, houve uma restauração na morfologia das células musculares, uma melhora na condição muscular geral, como também uma redução no processo de atrofia muscular.

Adicionalmente, eles observaram que o miR-206 é capaz de regular a diferenciação das células satélites, células responsáveis pelo reparo e regeneração muscular, além de aumentar significativamente a população dessas células. O miR-206 é responsável por promover a regeneração muscular por estimulação da diferenciação dessas células. Nossos resultados mostram um aumento significativo do miR-206 no grupo AP quando comparado com o grupo controle, dessa forma, sugerimos que esse miR possa estar elevado no processo de atrofia induzida por ácido palmítico como uma possível forma de tentar manter o processo de diferenciação muscular.

No que se refere ao miR-133a, (CHEN *et al*., 2006) mostra que esse miR possui uma atividade mais relacionada com a proliferação celular devido a repressão de fatores de resposta a soro (SRFs). Nossos achados mostram um aumento na expressão desse miR, sugerimos que o miR-133a possa estar alterado como forma de uma possível proteção celular contra o AP.

Corroborando com essa hipótese, também não observamos alterações na expressão do miR-23a, que já foi demonstrado (WADA *et al*., 2011) reprimir a expressão das enzimas E3-ligases (atrogin-1 e muRF1) ligando-se à sua região 3' UTR inibindo a tradução de seus mRNAs no músculo esquelético.

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que conseguimos induzir atrofia com o ácido palmítico (100µM e 150µM) em células em diferenciação (1º ao 5º dia) como também em células já diferenciadas (100µM). Observamos uma alteração de expressão dos marcadores miogênicos MyoD, Mstn, Myf5, MyH7 e miomesina e dos microRNAs miR-1, miR-133a e miR-206, que, provavelmente, ocorre para manter a diferenciação celular. Adicionalmente, mostramos que o AP afeta a regeneração muscular.

Nas células diferenciadas e tratadas por 48h, observamos aumento na expressão dos miRs 133a e 206 porém não observamos alterações na via de sinalização em estudo. Concluímos que a atrofia muscular esteja sendo mediada pelos microRNAs alterados entretanto não é mediada pela via ubiquitina-proteassoma.

Devido a isso, faz-se necessário mais estudos para elucidar por quais mecanismos os microRNAs estão atuando.

REFERÊNCIAS

ABDELMAGID, S. A., CLARKE, S. E., NIELSEN, D. E., BADAWI, A., EL-SOHEMY, A., MUTCH, D. M., MA, D. W. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0116195, 2015.

ASTRUP, A., RYAN, L., GRUNWALD, G. K., STORGAARD, M., SARIS, W., MELANSON, E., HILL, J. O.The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies. **british journal of nutrition**, v. 83, n. s1, p. s25-s32, 2000.

BECHET, D., TASSA, A., TAILLANDIER, D., COMBARET, L., ATTAIX, D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 10, p. 2098-2114, 2005.

BERKES, C. A.; TAPSCOTT, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2005. p. 585-595.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BIRESSI, S., MOLINARO, M., COSSU, G. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. **Developmental biology**, v. 308, n. 2, p. 281-293, 2007.

BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.

BODINE, S. C.; BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 6, p. E469-E484, 2014.

BRYNER, R. W. et al. Docosahexaenoic Acid Protects Muscle Cells from PalmitateInduced Atrophy. **ISRN Obesity**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J; Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419425, 2002.

CHAVEZ, J. A.; SUMMERS, S. A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 419, n. 2, p. 101109, 2003.

CHAVEZ, J. A. et al. A Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 20148-20153, 2005.

CHELOUFI, S. et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **Nature**, v. 465, n. 7298, p. 584-589, 2010.

CHEN, J.-F. et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 228–233, 25 fev. 2006.

CHEN, Y., MCMILLAN-WARD, E., KONG, J., ISRAELS, S. J., GIBSON, S. B. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 1, p. 171, 2008.

CHEN, X., WANG, K., CHEN, J., GUO, J., YIN, Y., CAI, X., ZHANG, Y. In vitro evidence suggests that miR-133a-mediated regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) is an indispensable step in myogenic differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 5362-5369, 2009.

CHEN, J. et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **The Journal of cell biology**, v. 190, n. 5, p. 867-879, 2010.

COLETTA, D. K. et al. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo. **American Journal of PhysiologyEndocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 5, p. E910-E917, 2008.

COQUILLARD, C., VILCHEZ, V., MARTI, F., GEDALY, R. mTOR signaling in regulatory T cell differentiation and expansion. **SOJ Immunol**, v. 3, n. 1, p. 1, 2015.

CONSTANTIN, A. et al. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 391, n. 1, p. 282-286, 2010.

DANDO, I., FIORINI, C., DALLA P. E., PADRONI, C., COSTANZO, C., PALMIERI, M., DONADELLI, M. UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 3, p. 672-679, 2013.

DEDIEU, S. et al. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. **International Journal of Developmental Biology**, v. 46, n. 2, p. 235-241, 2002.

DU, J. et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 1, p. 115-123, 2004.

ELGHEZNAWY, A. et al. Dicer Cleavage by Calpain Determines Platelet microRNA Levels and Function in Diabetes. **Circulation research**, v. 114, p. 305-784, 2015.

ELKINA, Y. et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 2, n. 3, p. 143-151, 2011.

FAROOQI, I. S. Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. **European journal of clinical investigation**, v. 41, n. 4, p. 451-455, 2011.

FAYZULLINA, S., MARTIN, L. J. Detection and analysis of DNA damage in mouse skeletal muscle in situ using the TUNEL method. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 94, 2014.

FELIX, J. Estudo das vias intracelulares de sinalização da insulina e da angiotensina-II no hipotálamo de ratas grávidas e lactantes. 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

FERNANDEZ, A. M. et al. Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. **Genes & development**, v. 15, n. 15, p. 19261934, 2001.

FERREIRA, R. C., CARVALHO, R. F., PIRES, I. F., MOREIRA, A. L. Papel da titina na modulação da função cardíaca e suas implicações fisiopatológicas. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 96, p. 332-339, 2011.

FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S. N., SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. **Nature reviews genetics**, v. 9, n. 2, p. 102, 2008.

FINKELSTEIN, E. A. et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030. **American journal of preventive medicine**, v. 42, n. 6, p. 563-570, 2012.

FINUCANE, M. M. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9· 1 million participants. **The Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557-567, 2011.

FOLETTA, V. C., WHITE, L. J., LARSEN, A. E., LÉGER, B., RUSSELL, A. P. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 461, n. 3, p. 325-335, 2011.

FOTAKIS, G., TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FRIAS, F. T. Papel dos microRNAs (miR-1, miR-133, miR-206, miR-208b, miR-499 e miR-223) no músculo esquelético de camundongos C57BL/6 durante o estado de resistência à insulina. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

GANLEY, I. G., LAM, D. H., WANG, J., DING, X., CHEN, S., JIANG, X. ULK1· ATG13· FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297-12305, 2009.

GLASS, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends in molecular medicine**, v. 9, n. 8, p. 344-350, 2003.

GOLJANEK-WHYSALL, K. et al. Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation. **Journal of cell science**, v. 125, n. 15, p. 3590-3600, 2012.

HAK, K. K. et al. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 5, p. 677–687, 2006.

HAMRICK, M. W., MCPHERRON, A. C., LOVEJOY, C. O. Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice. **Calcified tissue international**, v. 71, n. 1, p. 63-68, 2002.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. 1998.

HOLTZER, H.; ABBOTT, J. Contraction of glycerinated embryonic myoblasts. **The Anatomical Record**, v. 131, n. 3, p. 417-428, 1958.

HUANG, M. et al. Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e29173, 2011.

HUANG, Q. K., QIAO, H. Y., FU, M. H., LI, G., LI, W. B., CHEN, Z., LIANG, B. S. MiR-206 attenuates denervation-induced skeletal muscle atrophy in rats through regulation of satellite cell differentiation via TGF-β1, Smad3, and HDAC4 signaling. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 22, p. 1161, 2016.

HUANG, N., KNY, M., RIEDIGER, F., BUSCH, K., SCHMIDT, S., LUFT, F. C., FIELITZ, J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. **Intensive care medicine experimental**, v. 5, n. 1, p. 3, 2017.

JAKOBSEN, J.; RESKE-NIELSEN, E. Diffuse muscle fiber atrophy in newly diagnosed diabetes. **Clinical neuropathology**, v. 5, n. 2, p. 73–7, 1986.

JANSSON, P. et al. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 240, 1994.

JONES, S. W., HILL, R. J., KRASNEY, P. A., O'CONNER, B. A. R. B. A. R. A., PEIRCE, N., & GREENHAFF, P. L. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. **The FASEB journal**, v. 18, n. 9, p. 1025-1027, 2004.

JONKMAN, J. E., CATHCART, J. A., XU, F., BARTOLINI, M. E., AMON, J. E., STEVENS, K. M., COLARUSSO, P. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell adhesion & migration**, v. 8, n. 5, p. 440-451, 2014.

JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S. H., KIM, Y. M., OTTO, N. M., CAO, J., KIM, D. H. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 7, p. 1992-2003, 2009.

JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M., KIM, D. H. mTOR regulation of autophagy. **FEBS letters**, v. 584, n. 7, p. 1287-1295, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica: Texto e Atlas. 12ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

KALDERON, N.; GILULA, N. B. Membrane events involved in myoblast fusion. **The Journal of cell biology**, v. 81, n. 2, p. 411-425, 1979.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational Diabetes and the Incidence of Type 2 Diabetes A systematic review. **Diabetes care**, v. 25, n. 10, p. 1862-1868, 2002.

KIM, V. N; NAM, J-W. Genomics of microRNA. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 165-173, 2006.

KIM, T. N. et al. Prevalence and Determinant Factors of Sarcopenia in Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, n. 7, p. 1497–1499, 2010.

KUKRETI, H., AMUTHAVALLI, K., HARIKUMAR, A., SATHIYAMOORTHY, S., FENG, P. Z., ANANTHARAJ, R., TAN, S. L. K., LOKIREDDY, S., BONALA, S., SRIRAM, S., MCFARLANE, C., KAMBADUR, R., SHARMA, M. Muscle-specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6663-6678, 2013.

LAGIRAND-CANTALOUBE et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. **The EMBO journal**, v. 27, n. 8, p. 1266-1276, 2008.

LAI, K. et al. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 21, p. 9295-9304, 2004.

LATRES, E., AMINI, A. R., AMINI, A. A., GRIFFITHS, J., MARTIN, F. J., WEI, Y., LIN, H. C., YANCOPOULOS, G. D., GLASS, D. J. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2737-2744, 2005.

LAU, N. C., LIM, L. P., WEINSTEIN, E. G., BARTEL, D. P An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 858-862, 2001.

LECKER, S. H., SOLOMON, V., MITCH, W. E., GOLDBERG, A. L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 1, p. 227S-237S, 1999.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, S. et al. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 1537-1545, 2004.

LEE, H., LIM, J. Y., CHOI, S. J. Oleate Prevents Palmitate-Induced Atrophy via Modulation of Mitochondrial ROS Production in Skeletal Myotubes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

LI, Zhen-Ya et al. Alteration of microRNA expression correlates to fatty acid-mediated insulin resistance in mouse myoblasts. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 3, p. 871-877, 2011.

LIEBER, R. L. Skeletal muscle structure, function, and plasticity. Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

MALLEY, C. O., PIDGEON, G. P. The mTOR pathway in obesity driven gastrointestinal cancers: Potential targets and clinical trials. **BBA clinical**, v. 5, p. 29-40, 2016.

MAMMUCARI, C., SCHIAFFINO, S., SANDRI, M. Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. **Autophagy**, v. 4, n. 4, p. 524-526, 2008.

MASI, L.N. Sensibilidade periférica à insulina e resposta inflamatória na vigência de dietas obesogênicas, suplementação com óleo de peixe e ausência de TLR-4. 2014. 170 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

MCPHERRON, A. C., LEE, S. J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 5, p. 595-601, 2002.

OLEFSKY, J. M.; NOLAN, J. J. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. **The American journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 4, p. 980S-986S, 1995.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **Journal of cellular physiology**, v. 222, n. 3, p. 540-545, 2010.

PANDA, A. C. et al. Novel RNA-binding activity of MYF5 enhances Ccnd1/Cyclin D1 mRNA translation during myogenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 5, p. 2393-2408, 2016.

PARK, S. et al. Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 32, n. 11, p. 1993-1997, 2009.

REZNICK, R. et al. Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. **Cell metabolism**, v. 5, n. 2, p. 151-156, 2007.

ROMMEL, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 10091013, 2001.

ROSENBERG, Miriam I. et al. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. **The Journal of cell biology**, v. 175, n. 1, p. 77-85, 2006.

SABOURIN, Luc A. et al. Reduced differentiation potential of primary MyoD−/− myogenic cells derived from adult skeletal muscle. **The Journal of cell biology**, v. 144, n. 4, p. 631-643, 1999.

SACHECK, J. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 287, n. 4, p. E591-E601, 2004.

SALA, D.; ZORZANO, A. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 3803–3817, 2015.

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

SCHAPPACHER-TILP, G., LEONARD, T., DESCH, G., HERZOG, W. A novel three-filament model of force generation in eccentric contraction of skeletal muscles. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0117634, 2015.

SCHMITZ-PEIFFER, C.; CRAIG, D. L.; BIDEN, T. J. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 24202-24210, 1999.

SIEIRO-MOSTI, D., DE LA CELLE, M., PELÉ, M., MARCELLE, C. A dynamic analysis of muscle fusion in the chick embryo. **Development**, v. 141, n. 18, p. 3605-3611, 2014.

SILVA, M. D. P., CARVALHO, R. F. Cellular and molecular mechanisms that control muscular development and growth. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 21-31, 2007.

SILVA, M. T. Papel do adrenoceptor beta 2 na regeneração muscular esquelética.2014. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

SOKOL, N. S., AMBROS, V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. **Genes & development**, v. 19, n. 19, p. 2343-2354, 2005.

STUART, C. A., MCCURRY, M. P., MARINO, A., SOUTH, M. A., HOWELL, M. E., LAYNE, A. S., STONE, M. H. Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 5, p. 2027-2036, 2013.

SU, Z. et al. Acupuncture plus Low-Frequency Electrical Stimulation (Acu-LFES) Attenuates Diabetic Myopathy by Enhancing Muscle Regeneration. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0134511, 2015.

TALBOT, J. & MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 5, n. 4, p. 518-534, 2016.

TONDER, A. V., JOUBERT, A. M., CROMARTY, A. D. Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC research notes**, v. 8, n. 1, p. 47, 2015

TOWNLEY-TILSON, WH Davin; CALLIS, Thomas E.; WANG, DaZhi. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 8, p. 1252-1255, 2010.

UMEGAKI, H. Sarcopenia and diabetes: Hyperglycemia is a risk factor for ageassociated muscle mass and functional reduction. **Journal of diabetes investigation**, v. 6, n. 6, p. 623-624, 2015.

WANG, X. et al. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4160-4168, 2006.

WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 3, p. 505S-512S, 1998.

WINBANKS, C. E., BEYER, C., HAGG, A., QIAN, H., SEPULVEDA, P. V., GREGOREVIC, P. miR-206 represses hypertrophy of myogenic cells but not muscle fibers via inhibition of HDAC4. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73589, 2013.

YANG, M. et al. Saturated fatty acid palmitate-induced insulin resistance is accompanied with myotube loss and the impaired expression of health benefit myokine genes in C2C12 myotubes. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, p. 104, 2013.

ZHANG, L. et al. Role of fatty acid uptake and fatty acid β-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 1, p. 1-22, 2010.

WADA, S., KATO, Y., OKUTSU, M., MIYAKI, S., SUZUKI, K., YAN, Z., AKIMOTO, T. Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38456-38465, 2011.

WANG, F., WANG, J., HE, J., LI, W., LI, J., CHEN, S., ZHANG, P., LIU, H., CHEN, X. Serum miRNAs miR-23a, 206, and 499 as Potential Biomarkers for Skeletal Muscle Atrophy. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.