

KATIA MARIA GOMES ANDRADE

**Caracterização do metabolismo das células satélites da
musculatura esquelética: papel do aldeído como sinalizador
metabólico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP),
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Morfofuncional

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

Versão Original.

São Paulo
2020

RESUMO

Andrade, K.M.S. **Caracterização do metabolismo das células satélites da musculatura esquelética: papel do aldeído como sinalizador metabólico**. 2020. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2020.

As células satélites são células-tronco da musculatura esquelética que possuem um importante papel no processo de regeneração. O reparo da musculatura esquelética ocorre por meio de uma cascata de sinalização bem orquestrada que recupera a fibra muscular lesada e mantém o nicho das células-tronco. Estudos recentes apontam que o metabolismo pode regular tanto o estado de ativação das células satélites como a sua divisão celular, processo este que interfere diretamente no nicho das células satélites. Outro processo que modula o estado de ativação das células satélites é o aumento de espécies reativas de oxigênio com alterações no estado de quiescência e capacidade de auto-renovação. Sabemos que as espécies reativas de oxigênio podem gerar aldeídos tóxicos que interagem com proteínas, DNA e lipídeos, prejudicando suas funções. No entanto, não está claro qual o papel dos aldeídos na ativação e manutenção das células satélites. A principal enzima responsável pela remoção de aldeídos tóxicos, como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), é a aldeído desidrogenase 2 (ALDH2). Essa é uma importante enzima mitocondrial associada a detoxicação celular, sendo que alterações no seu funcionamento estão relacionadas ao aparecimento/agravamento de algumas patologias, como a insuficiência cardíaca e doença arterial periférica. Diante disso, o nosso objetivo é caracterizar o perfil das células satélites/mioblastos/miotubos de camundongos *knock-in* para a ALDH2 (animais que apresentam atividade da ALDH2 reduzida), bem como sua suscetibilidade à sobrecarga de aldeído associada à degeneração da musculatura esquelética. Hipotetizamos que o excesso de aldeídos prejudica a biologia das células satélites. De fato, nossos resultados apontam que o tratamento agudo de células C2C12 (indiferenciadas) com 4-HNE reduz o metabolismo bioenergético mitocondrial, a capacidade de proliferação celular e alterar o ciclo celular. Além disso, observamos também diferenças no número de células satélites residentes na musculatura dos camundongos ALDH2 *knock-in* e redução na taxa de proliferação. Em mioblastos isolados observamos uma menor capacidade bioenergética mitocondrial, associada a um menor conteúdo mitocondrial dos camundongos ALDH2 *knock-in* comparado com o selvagem. Já os miotubos dos camundongos ALDH2 *knock-in* apresentam uma diferenciação antecipada, associados à redução no consumo de oxigênio. Curiosamente os mioblastos dos camundongos ALDH2 *knock-in* heterozigotos apresentam uma mudança no metabolismo representado pela redução do consumo de oxigênio e aumento da glicólise, o que justifica em parte a diferenciação antecipada. Nossos resultados em conjunto sugerem que tanto o excesso de aldeídos quanto a redução da atividade e expressão da ALDH2 afetam negativamente a biologia das células satélites.

Palavras-Chave: Células satélites. Aldeídos. Enzima ALDH2. Metabolismo. Músculo esquelético.

ABSTRACT

Andrade, K.M.S. **Metabolic profile of skeletal muscle satellite cells: role of aldehydes and aldehyde dehydrogenase 2**. 2020. Thesis (PhD in Systems Biology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo; Sao Paulo, 2020.

Skeletal muscle stem cells, termed satellite cells, play an important role in the regeneration of skeletal muscle. Oxidative metabolism directly affects both activation and division of satellite cells. Another process that modulates the fate of satellite cells is the increase of reactive oxygen species. Recently, we reported that oxidative stress lead to accumulation of toxic aldehydes, which have a negative impact in cardiac cells by making adducts with proteins and DNA. It is important to highlight that the role of aldehydes in the activation and maintenance of satellite cells is still unknown. The main enzyme responsible for the removal of toxics aldehydes, such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), is the mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). Impaired ALDH2 activity contributes to the progression of chronic diseases such as heart failure and peripheral arterial disease. Here, we aim to characterize the metabolic profile of satellite cell/myoblasts/myotubes from WT and ALDH2 knock-in mice, as well as their susceptibility to aldehyde overload associated with skeletal muscle degeneration. Our hypothesis is that aldehydic load disrupts satellite cell metabolism and fate. Our results indicate that acute 4-HNE treatment of proliferating C2C12 myoblasts reduces mitochondrial metabolism, cell proliferation rate, and alters cell cycle. Of interest, ALDH2 knock-in mice, which display reduced ability to metabolize aldehydes, have decreased skeletal muscle pool of satellite cells with impaired proliferative capacity. Moreover, primary myoblasts in culture from ALDH2 knock-in mice present reduced mitochondrial content and bioenergetics compared with WT. This ALDH2 knock-in phenotype is followed by a premature differentiation of myoblasts into myotubes upon serum starvation compared with WT. Our results together suggest that both aldehyde excess and reduced ALDH2 activity and expression negatively affect satellite cell biology.

Keywords: Satellite cells. Aldehydes. ALDH2 enzyme. Metabolism. Skeletal Muscle.

1 INTRODUÇÃO

Os aldeídos são moléculas formadas endogenamente pelo catabolismo de aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos, ou pela exposição do organismo a um ambiente tóxico como exposição a poluentes, etanol, fumaça de cigarro, metabolismo de fármacos, alimentos em conservas, entre outros. A toxicidade dos aldeídos está na sua alta reatividade, podendo interagir com resíduos de proteínas, lipídios e DNA, modificando suas funções de forma irreversível e levando ao prejuízo do metabolismo e funcionamento celular (1). Atualmente sabemos que aldeídos oriundos da peroxidação lipídica (como o 4-hidroxi-2-nonenal – 4-HNE) afetam diretamente a biologia de células-tronco mesenquimais (2). No entanto, não é sabido se possíveis alterações no metabolismo e consequente reorganização da sinalização redox são essenciais na mudança do estado de ativação das células-tronco da musculatura esquelética afetando assim a regeneração muscular esquelética.

A musculatura esquelética compreende 40% do total do peso corporal, sendo responsável pela mobilidade, postura e homeostase metabólica por representar de 40-75% de todas as proteínas do corpo, além de proteger os órgãos viscerais e tecidos internos (3). A degeneração da musculatura esquelética reduz a mobilidade e tem impacto direto na qualidade de vida e sobrevivência do indivíduo (4). As principais células responsáveis pela regeneração da musculatura esquelética são as células satélites (CS).

1.1 Células satélites e regeneração da musculatura esquelética

As CS são células-tronco residentes na musculatura esquelética e foram inicialmente descritas em 1961 em dois estudos independentes (5,6). O estudo mais famoso é do pesquisador Alexander Mauro (1961), que por meio de microscopia eletrônica identificou em músculo tibial de sapo o que ele nomeou de célula satélite muscular esquelética, com base na sua localização (5).

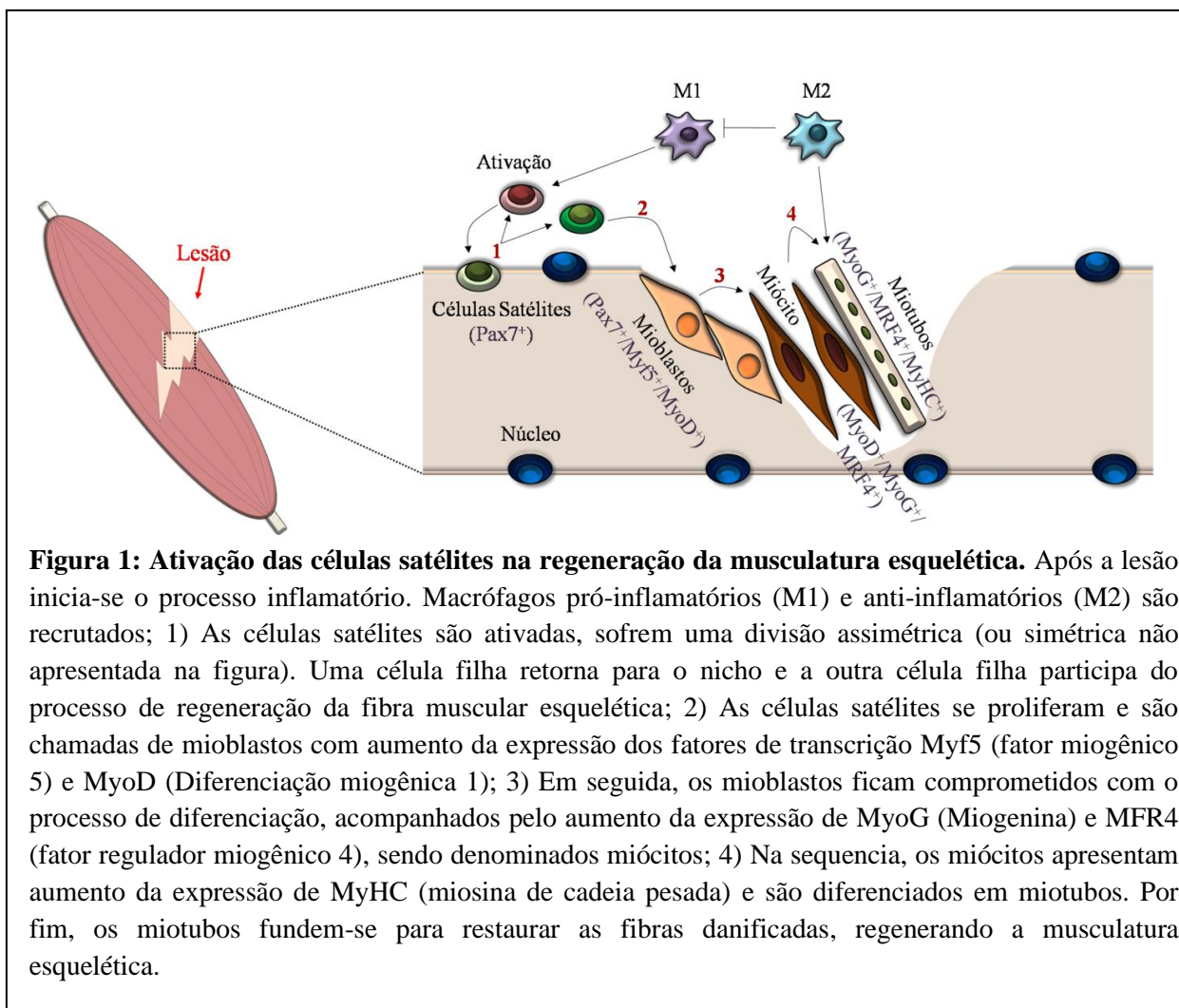
As CS são células mononucleares, estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular. Possuem a cromatina condensada e uma alta razão núcleo/citoplasma. No período pré-natal representam 35% dos mionúcleos totais, já no período adulto representam cerca de 2-10%. As CS estão em maior quantidade em fibras oxidativas quando comparados com as glicolíticas, e estão próximo aos capilares (7). As CS permanecem em quiescência (estado G0) no músculo esquelético de um indivíduo adulto em condições fisiológicas. No entanto, são ativadas perante estímulos de crescimento ou dano da fibra muscular esquelética,

resultando na formação de uma célula progenitora miogênica necessária para a formação de uma nova miofibrila (7).

Os estados de quiescência, proliferação e diferenciação, bem como o desenvolvimento embrionário adequado das CS dependem de uma complexa rede de regulação dos fatores de transcrição e de regulação miogênica. O fator de transcrição *Paired box 3* (Pax3) está relacionado ao desenvolvimento embrionário das CS. *Paired box 7* (Pax7) é o fator de transcrição mais expresso em CS quiescentes, sendo importante na manutenção do *pool* e auto-renovação das CS. O Fator miogênico 5 (Myf5) é importante na regeneração e desenvolvimento adequado da musculatura esquelética. O fator de diferenciação miogênica 1 (MyoD) é expresso durante a proliferação das CS (mioblastos). A miogenina (MyoG) é expressa em miócitos comprometidos com a diferenciação. Já o fator regulador miogênico 4 (MRF4) está presente na fase final da diferenciação. É importante ressaltar que existe uma sobreposição e sincronia no perfil de expressão dos fatores de transcrição e miogênicos durante as fases de comprometimento e diferenciação das CS (8).

As CS quiescentes expressam em maior quantidade Pax7 e Myf5. Quando as CS são ativadas, elas migram para o local da lesão e inicia-se o processo de regeneração. A ativação das CS não se restringe apenas ao local do dano, eles podem regenerar ao longo da fibra e são capazes de agir mesmo depois de repetidas lesões. As CS podem sofrer divisões simétricas ou assimétricas. Na divisão assimétrica são geradas duas células-tronco não idênticas, sendo que uma retorna para o nicho de manutenção do *pool* de CS e a outra se prolifera, diferencia e contribui diretamente para a regeneração muscular (**Figura 1**) (7).

O estado de proliferação das CS é acompanhado pelo aumento da expressão de MyoD e Myf5. As células em proliferação ainda expressam Pax7, mas em menor quantidade quando comparadas com CS do nicho. Após ativação, as CS são chamadas de mioblastos. Os mioblastos passam a expressar os fatores de transcrição MyoG e MRF4, tornam-se fusiformes, e são chamados de miócitos. A regulação positiva dos genes MyoG, MRF4 e MCK (creatina quinase), bem como MyHC (miosina de cadeia pesada), sinalizam a progressão do processo de diferenciação. As CS diferenciadas (miotubos) se fundem para restaurar fibras danificadas ou, em menor proporção, formar uma nova fibra (**Figura 1**) (7). Além dos fatores supracitados, a ativação das CS é regulada pela inervação, vascularização, nutrição e concentração de hormônios (8,9).



1.2 Metabolismo mitocondrial nas células satélites

Recentemente, o metabolismo bioenergético vem sendo apontado como um importante regulador do estado de quiescência, proliferação e diferenciação das CS. Por exemplo, um curto período de restrição calórica aumenta a atividade e a viabilidade das CS no músculo esquelético de ratos jovens e velhos (10). Os autores sugerem que essas alterações ocorrem devido a mudanças na bioenergética mitocondrial, sugerindo que os fatores metabólicos têm papel crucial na regulação e funcionamento das CS musculares esqueléticas.

A mitocôndria é uma organela responsável pela respiração celular e principal fonte de energia através da fosforilação oxidativa. Possui um importante papel na homeostase do cálcio, β -oxidação dos ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos e síntese de esteroides, além de regular diretamente a morte celular programada, apoptose (11).

Em células-tronco, a mitocôndria está localizada perinuclear e apresenta uma redução de cristas comparadas com células diferenciadas, resultando em menor capacidade de fornecer de energia. A maior parte da produção de energia das células-tronco é oriunda da glicólise, uma vez que a ativação da via das pentoses é crítica na manutenção das células-tronco (12). No entanto, apesar do metabolismo das células-tronco ser predominantemente glicolítico o controle do metabolismo mitocondrial é importante para manutenção das células no estado indiferenciado. De fato, a inibição fosforilação oxidativa impede que as células-tronco entrem no processo de diferenciação (13).

O metabolismo mitocondrial também é importante na manutenção do *pool* de CS e proliferação celular. Rocheteau e colaboradores (2012) constataram que existem duas populações distintas de CS quiescentes, uma com alta expressão de Pax7 (Pax7^{High}) e baixo conteúdo mitocondrial, e outra população com baixa expressão de Pax7 (Pax7^{Low}) e um maior conteúdo mitocondrial. Curiosamente a população Pax7^{High} sofre majoritariamente divisões assimétricas, responsável pela renovação do nicho de células SC. Já a população Pax7^{Low} (elevada capacidade oxidativa) sofre divisões simétricas, gerando células comprometidas com a proliferação celular (14). Outro estudo demonstrou que o uso de Antimicina A, um bloqueador do complexo III da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, durante o processo de diferenciação celular, promove aumento da expressão de genes de pluripotência como o Oct3/4 e diminui a eficiência da diferenciação em células-tronco embrionárias (13).

Além das alterações mitocôndrias, a exacerbada produção de espécies reativas de oxigênio está associada com o destino das células-tronco (15). A redução da fosforilação oxidativa nas células-tronco causa uma redução das espécies reativas de oxigênio o que reduz a probabilidade de possíveis danos ao DNA das células-tronco.

1.3 Estresse oxidativo e aldeídos tóxicos

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção e remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). O desequilíbrio redox está associado ao agravamento de patologias e doenças degenerativas, como a doença arterial periférica (16), doenças cardiovasculares (17), diabetes e câncer (18). A mitocôndria é considerada a principal fonte de produção de EROs pelos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons. O primeiro ERO gerado pelas mitocôndrias é o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é altamente reativo, sendo majoritariamente transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase - SOD. O H_2O_2 pode ser removido por enzimas

antioxidantes, como tioredoxina peroxidase, glutathiona peroxidase e catalase, ou pode ser difundido pela célula. H_2O_2 é mais estável que $\text{O}_2\cdot^-$ e se difunde mais facilmente através da membrana plasmática. Quando o H_2O_2 não é removido, ele pode gerar o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) a partir da reação com íons metálicos. $\text{OH}\cdot$ é altamente reativo e estável, podendo oxidar macromoléculas e resultar em redução da viabilidade celular. As mitocôndrias também geram peroxinitrito (ONOO^-), a partir da reação do óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) com $\text{O}_2\cdot^-$ (**Figura 2**) (19).

As defesas antioxidantes consistem em enzimas como catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), tioredoxina redutase (TRxs) e superóxido dismutases (SODs), e moléculas antioxidantes solúveis como glutathiona (GSH), vitamina E e vitamina C. Em condições fisiológicas, as enzimas antioxidantes neutralizam os efeitos deletérios das EROs. No entanto, em condições patológicas, podem resultar em acúmulo excessivo de EROs, causando danos irreversíveis às proteínas, lipídios e DNA (18).

EROs também são importantes no controle fino da sinalização celular em condições fisiológicas. Esse processo transiente e pontual é conhecido como sinalização redox, o qual se diferencia do estresse oxidativo, caracterizado por acúmulo excessivo e, geralmente, prolongado de EROs. A sinalização redox regula diretamente diversos processos celulares incluindo biogênese mitocondrial (através da ativação de PGC-1 α), proliferação e diferenciação celular (através de ativação de AMPK e MAPK), e apoptose. Por exemplo, células-tronco hematopoiéticas com baixas concentrações de EROs mantêm uma maior capacidade de auto-renovação. Por outro lado, altas concentrações de EROs diminuem o enxerto celular após o transplante (20,21).

Fosforilação Oxidativa

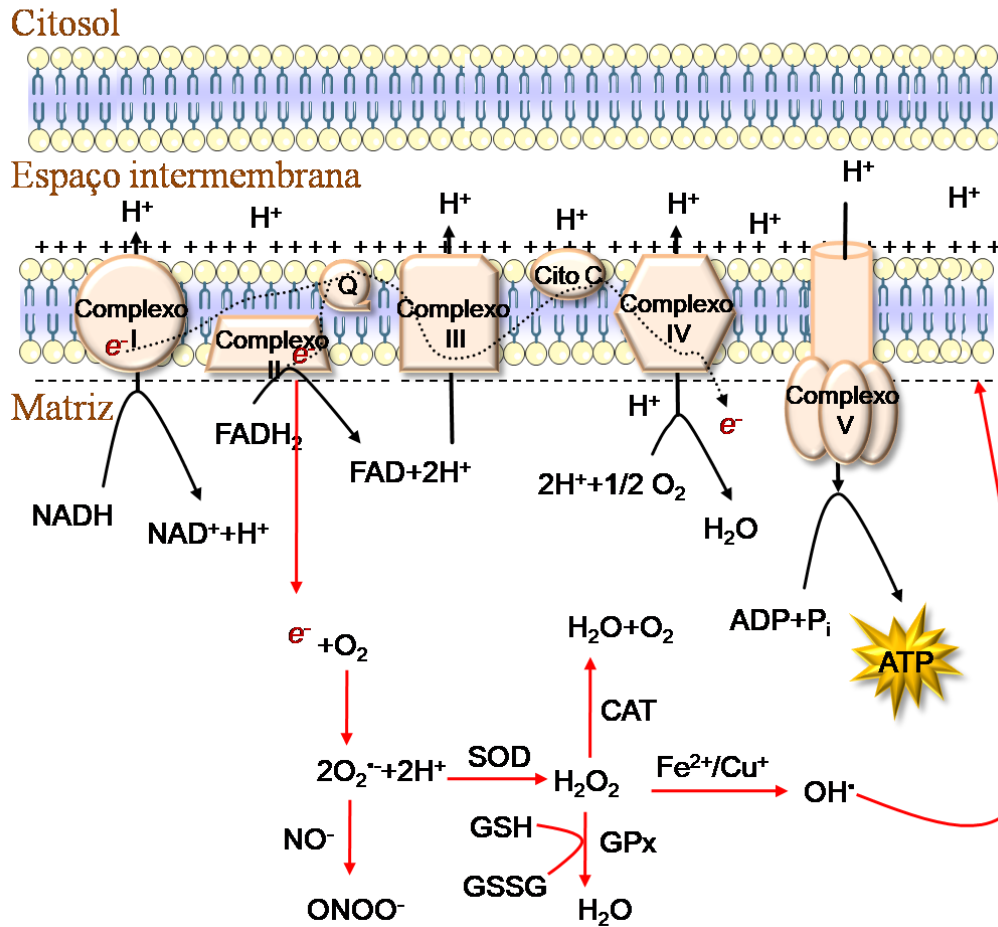


Figura 2: Fosforilação oxidativa, produção e remoção de espécies reativas de oxigênio. Na matriz mitocondrial as coenzimas NADH e FADH₂ doam elétrons para os complexos mitocondriais I e II, respectivamente. Os elétrons seguem então um caminho redox até o complexo IV, onde formam água através da redução do oxigênio molecular. A passagem dos elétrons pelos diferentes complexos resulta no bombeamento prótons da matriz para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico. Esse gradiente acarreta no retorno dos prótons para a matriz mitocondrial através do complexo V da cadeia de transporte de elétrons, gerando uma força motriz importante na síntese de ATP a partir da fosforilação do difosfato de adenosina (ADP). O escape de elétrons durante esse processo redox resulta na formação direta de espécies reativas de oxigênio. A redução de uma molécula de oxigênio por um único elétron gera o ânion superóxido (O₂^{•-}). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que por sua vez é metabolizado pela enzima catalase (CAT) a água (H₂O) ou neutralizado por uma reação com a glutatona pela enzima glutatona peroxidase (GPx). Diante da doação de um grupo ferro ou cobre, o peróxido é convertido no radical hidroxila (OH[•]), que ataca a membrana interna mitocondrial e dá início a peroxidação lipídica. Outro radical produzido na mitocôndria é o peroxinitrito (ONOO[•]), através da reação entre O₂^{•-} e óxido nítrico (NO[•]), que também contribui para o início da peroxidação lipídica.

Entre os oxidantes produzidos pelos radicais livres estão os peróxidos lipídicos que são formados pela presença de um doador de elétrons. Esses peróxidos sofrem uma reação de auto-oxidação não enzimática que resulta na formação de aldeídos. As EROs são moléculas reativas, mas instáveis e, portanto, atuam em locais próximos aos locais de produção por um curto período de tempo. No entanto, os aldeídos são moléculas mais estáveis, altamente reativas e lipofílicas, capazes de agir distante de sua região de origem e se ligar e inativar diferentes macromoléculas incluindo proteínas, lipídios e DNA (1,15). O 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) é considerado um biomarcador do estresse oxidativo, sendo o principal subproduto da peroxidação lipídica (1).

Descoberto em 1980, o 4-HNE é formado quando os radicais livres atacam os ácidos graxos poliinsaturados ω -6 (PUFAs) na membrana celular. Isso produz um hidroxialqueno α,β -insaturado com um carbono reativo (eletrofílico) localizado na posição central da molécula. Este carbono pode formar uma ligação (ligação de Michaelis, isto é, ligação do carbono reativo com 4-HNE as proteínas ou adição de uma base *Schiff*) com resíduos de cisteínas (Cys) importantes para manutenção da estrutura e função da proteína. Outros possíveis alvos do 4-HNE são os resíduos de histidinas, lisina e os centros de ferro-enxofre presentes nos complexos mitocondriais. O 4-HNE também se liga aos lipídios e ao DNA, modificando irreversivelmente suas funções, prejudicando o metabolismo e funcionamento celular (1). Cerca de 1 a 8% do 4-HNE formado endogenamente modifica proteínas, resultando em perda de função (1).

O 4-HNE é o aldeído mais estudado no processo patológico. O acúmulo desse aldeído tem sido relacionado à etiologia e agravamento de várias doenças, como cardiovasculares, hepáticas e câncer (22–25). A análise do músculo esquelético de pacientes com doença arterial periférica demonstra que além dos níveis reduzidos de enzimas antioxidantes, aumento de proteínas carboniladas, ocorre um aumento de aldeídos tóxicos com conseqüente disfunção mitocondrial (26). No músculo esquelético de pacientes com câncer, os níveis de 4-HNE são elevados e estão associados com reduzida defesa antioxidantes e elevada morte celular (27).

A importância clínica do 4-HNE decorre de sua capacidade de se difundir e atuar sistemicamente, como mencionado anteriormente. O 4-HNE pode se ligar a albumina plasmática, enzimas metabólicas, proteínas de membranas e citosólicas, proteínas da cadeia

de transporte de elétrons, dentre outras (28,29). Os aldeídos são removidos majoritariamente por uma classe de enzimas, denominada aldeído desidrogenase (ALDH).

1.4 Enzima mitocondrial aldeído desidrogenase 2 (ALDH2)

Atualmente são conhecidas 19 isoformas de aldeído desidrogenases. Alterações na atividade de algumas destas enzimas estão associadas ao aparecimento e progressão de diversas patologias como câncer, Alzheimer, Parkinson e doenças cardiovasculares (30).

A enzima ALDH2 é responsável pelo metabolismo de aldeídos e do etanol; Após o consumo de álcool a enzima álcool desidrogenase (ADH) citosólica metaboliza o etanol a acetaldeído, o acetaldeído por sua vez é oxidado a acetato pela enzima ALDH2 na mitocôndria. Outra relevância da ALDH2 é a mutação de 40% dos indivíduos asiáticos. Essa mutação é a mais frequente em todo mundo, atingindo 8% da população mundial e está relacionada ao desenvolvimento de várias patologias como câncer e doenças cardiovasculares (30). A mutação da ALDH2 é caracterizada pela substituição pontual de um ácido glutâmico por uma lisina na região 504 da enzima, resultando na perda da densidade de elétrons próximos aos resíduos 245-262 que formam a α -hélice G, e dos resíduos 466-478 que formam o *loop* do sitio ativo, gerando uma desestabilidade do sitio de ligação do cofator NAD⁺, o que confere perda da atividade enzimática em até 95% em indivíduos homozigotos (30).

Estudos recentes demonstram a importância das ALDHs no metabolismo de células-tronco, afetando diretamente os processos de proliferação, diferenciação celular e indução de apoptose (31). Células que hiperexpressam ALDHs são menos suscetíveis aos danos causados pelos aldeídos e apresentam maior proliferação celular por serem mais resistentes ao estresse oxidativo. Vella e colaboradores (2011) analisaram células-tronco de humanos e roedores que apresentam alta (ALDH^{High}) e baixa (ALDH^{Low}) expressão de ALDHs. Os autores constataram que as células ALDH^{High} quando submetidas a estresse apresentam uma maior capacidade de proliferação e diferenciação quando comparadas com as células ALDH^{Low}. Além disso, esses resultados se correlacionam com aumento das defesas antioxidantes e capacidade de regeneração da musculatura esquelética. Os autores constataram que as células ALDH^{High} são protegidas contra danos tóxicos por aumentar a resistência ao estresse oxidativo, permanecendo com maior viabilidade após transplante (32).

Sun e colaboradores (2017) demonstraram que a terapia com células ALDH^{High} em modelo de doença arterial periférica foi capaz de restaurar a isquemia dos membros

posteriores de camundongos com mais eficiência que células mononucleares da medula óssea. Esses efeitos positivos foram reduzidos em camundongos *knock-out* para a enzima ALDH2 (33). Zhu e colaboradores (2014) também demonstraram a importância da ALDH2 na regeneração da musculatura esquelética; animais ALDH2 nocautes apresentam uma redução na retenção de células-tronco mesenquimais após transplantes quando comparados com animais selvagens; enquanto animais que hiperexpressam ALDH2 aumentam a retenção dessas células na musculatura esquelética (2). Os autores sugerem que o acúmulo de aldeídos afeta negativamente a viabilidade e a permanência dessas células no tecido após o transplante.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo são de extrema importância para o entendimento do metabolismo de aldeídos relacionados à biologia das células satélites. De fato, observamos que as células com redução da atividade e expressão da enzima ALDH2 são mais suscetíveis à sobrecarga de aldeídos e a musculatura esquelética de camundongos mutantes para a enzima ALDH2 apresenta alterações metabólicas com redução do *pool* de células satélites e diferenciação antecipada com fibras disfuncionais, sugerindo que a enzima ALDH2 possui um importante papel para a biologia das células satélites. Esses resultados foram associados com redução do conteúdo mitocondrial, no entanto, ainda é necessária uma maior investigação para entender o papel da ALDH2 na estabilidade mitocondrial. Até a presente data, nenhum estudo investigou o efeito da mutação da enzima ALDH2 no número de células satélites o que demonstra a originalidade do projeto e abre perspectivas de tratamento para indivíduos com a mutação e doenças músculo esqueléticas.

REFERÊNCIAS¹

1. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Physiol*. 2016 Oct 1;311(4):C537–43.
2. Zhu H, Sun A, Zhu H, Li Z, Huang Z, Zhang S, et al. Aldehyde Dehydrogenase-2 Is a Host Factor Required for Effective Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Apr;34(4):894–901.
3. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int*. 2015 Mar 8;96(3):183–95.
4. McGregor RA, Cameron-Smith D, Poppitt SD. It is not just muscle mass: a review of muscle quality, composition and metabolism during ageing as determinants of muscle function and mobility in later life. *Longev Heal*. 2014;3(1):9.
5. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961;9(2):493.
6. Katz, B and Miledi R. The Localized Action of “end-plate drugs” in the twitch fibers of the frog. *J Physiol*. 1961;155(703):399–415.
7. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev*. 2013;93(1):23–67.
8. Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development*. 2015;5:1572–81.
9. Velloso CP. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol*. 2008;154(3):557–68.
10. Cerletti M, Jang YC, Finley LWS, Haigis MC, Wagers AJ. Short-Term Calorie Restriction Enhances Skeletal Muscle Stem Cell Function. *Cell Stem Cell*. 2012 May;10(5):515–9.
11. Anderson AJ, Jackson TD, Stroud DA, Stojanovski D. Mitochondria — hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. *Open Biol*. 2019;9(190126).
12. Wanet A, Arnould T, Najimi M, Renard P. Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate. *Stem Cells Dev*. 2015;24(17):1957–71.
13. Pereira SL, Grãos M, Rodrigues AS, Anjo SI, Carvalho RA, Paulo J. Inhibition of Mitochondrial Complex III Blocks Neuronal Differentiation and Maintains Embryonic Stem Cell Pluripotency. 2013;8(12):1–16.
14. Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S. A Subpopulation of Adult Skeletal Muscle Stem Cells Retains All Template DNA

¹ De acordo com estilo Vancouver

- Strands after Cell Division. *Cell*. 2012 Jan;148(1–2):112–25.
15. Khacho M, Clark A, Svoboda DS, Harper M, Park DS, Slack RS, et al. Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell*. 2016;19:1–16.
 16. Signorelli SS, Scuto S, Marino E, Xourafa A. Oxidative Stress in Peripheral Arterial Disease (PAD) Mechanism and Biomarkers. *Antioxidants*. 2019;8:367.
 17. Gomes KMS, Campos JC, Bechara LRG, Queliconi B, Lima VM, Disatnik MH, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovasc Res*. 2014;103(4):498–508.
 18. Ježek J. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics : The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. 2018;7:13.
 19. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug;47(4):333–43.
 20. Barbieri E, Sestili P. Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *J Signal Transduct*. 2012;2012:1–17.
 21. Jang Y-Y, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):3056–63.
 22. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med*. 2004 Oct;37(7):937–45.
 23. Shoeb M, Ansari N, Srivastava S, Ramana K. 4-Hydroxynonenal in the Pathogenesis and Progression of Human Diseases. *Curr Med Chem*. 2013 Dec 31;21(2):230–7.
 24. Takagi S, Iwai N, Yamauchi R, Kojima S, Yasuno S, Baba T, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for myocardial infarction in Japanese men. *Hypertens Res*. 2002 Sep;25(5):677–81.
 25. Tanaka H. Advances in cancer epidemiology in Japan. *Int J Cancer*. 2014 Feb;134(4):747–54.
 26. Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, et al. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jul;41(2):262–9.
 27. Brzeszczyńska J, Johns N, Schilb A, Degen S, Degen M, Langen R, et al. Loss of oxidative defense and potential blockade of satellite cell maturation in the skeletal muscle of patients with cancer but not in the healthy elderly. *Aging*. 2016;8(8):1690–702.
 28. Houglum K, Filip M, Witztum JL, Chojkier M. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts in plasma and liver of rats with iron overload. *J Clin Invest*. 1990 Dec 1;86(6):1991–8.

29. Andringa KK, Udoh US, Landar A, Bailey SM. Redox Biology Proteomic analysis of 4-hydroxynonenal (4-HNE) modified proteins in liver mitochondria from chronic ethanol-fed rats. *Redox Biol.* 2014;2:1038–47.
30. Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev.* 2014;94(1):1–34.
31. Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 2012 Feb;52(4):735–46.
32. Vella JB, Thompson SD, Bucsek MJ, Song M, Huard J. Murine and Human Myogenic Cells Identified by Elevated Aldehyde Dehydrogenase Activity: Implications for Muscle Regeneration and Repair. Rameshwar P, editor. *PLoS One.* 2011 Dec 15;6(12):e29226.
33. Sun X, Zhu H, Dong Z, Liu X, Ma X, Han S, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 deficiency compromises therapeutic effect of ALDH bright cell on peripheral ischemia. *Redox Biol.* 2017 Oct;13(May):196–206.
34. Lin W, Huang X, Zhang L, Chen D, Wang D, Peng Q, et al. BMS309403 Stimulates Glucose Uptake in Myotubes through Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *PLoS One.* 2012;7(8):1–8.
35. Nicholls DG, Darley-Usmar VM, Wu M, Jensen PB, Rogers GW, Ferrick DA. Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *J Vis Exp.* 2010;(46):3–7.
36. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods.* 2006;38(4):283–93.
37. Tobergte DR, Curtis S. LDH-A Enzyme Assay. *J Chem Inf Model.* 2013;53(9):1689–99.
38. Garcia CC, Angeli JP, Freitas FP, Gomes OF, de Oliveira TF, Loureiro AP, Di Mascio P MM. [13C2]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. *J Am Chem Soc.* 2011;Jun 22;133:Jun 22;133(24):9140-3.
39. Chen C, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M, Thomas D, Mochly-rosen D. An Activator of Mutant and Wildtype Aldehyde Dehydrogenase Reduces Ischemic Damage to the Heart. *Science (80-).* 2008;321(5895):1493–5.
40. Ji GR, Yu NC, Xue X, Li ZG. 4-Hydroxy-2-nonenal induces apoptosis by inhibiting AKT signaling in human osteosarcoma cells. *Sci World J.* 2014;2014:873525.
41. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458–61.
42. Motohashi N, Asakura Y, Asakura A. Isolation , Culture , and Transplantation of Muscle Satellite Cells. *J Vis Exp.* 2014;(April):1–7.
43. Yi L, Rossi F. Purification of progenitors from skeletal muscle. *J Vis Exp.* 2011;2(49):3–7.

44. Abcam. Procedure for staining of cell cultures using immunofluorescence. *Immunocytochem Immunofluoresc Protoc*.
45. Yu H, Waddell JN, Kuang S, Bidwell CA. Park7 Expression Influences Myotube Size and Myosin Expression in Muscle. *PLoS One*. 2014;9(3):3–12.
46. Jaganjac M, Tirosh O, Cohen G, Sasson S, Zarkovic N. Reactive aldehydes – second messengers of free radicals in diabetes mellitus. *Free Radic Res*. 2013;5762.
47. Ribeiro MAC. Participação da enzima aldeído desidrogenase 2 na progressão da doença arterial periférica. Dissertação de Mestrado em Ciências Morfuncionais. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. 2017;
48. Yucel N, Wang YX, Mai T, Bendall SC, Angelo M, Blau HM, et al. Glucose Metabolism Drives Histone Acetylation Landscape Transitions that Dictate Muscle Stem Cell Glucose Metabolism Drives Histone Acetylation Landscape Transitions that Dictate Muscle Stem Cell Function. *CellReports*. 2019;27(13):3939-3955.e6.
49. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, et al. Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun;1(1):101–12.
50. Zhang H, Menzies KJ, Auwerx J. The role of mitochondria in stem cell fate and aging. *Development*. 2018 May 1;145(8):dev143420.
51. Sin J, Andres AM, Taylo R DJR, Weston T, Hiraumi Y, Stotland A, et al. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. *Autophagy*. 2016;12(2):369–80.
52. Handy DE, Loscalzo J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(11).
53. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: A critical target in oxidative stress? *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2016;311(4):C537–43.
54. Chaudhary P, Sharma R, Sahu M, Vishwanatha JK, Awasthi S AY. 4-Hydroxynonenal Induces G 2 / M Phase Cell Cycle Arrest by Activation of the Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related Protein (ATR)/ Checkpoint Kinase 1 (Chk1) Signaling Pathway. *j biol Chem*. 2013;288(28):20532–46.
55. Pala F, Di Girolamo D, Mella S, Yennek S, Chatre L, Ricchetti M, et al. Distinct metabolic states govern skeletal muscle stem cell fates during prenatal and postnatal myogenesis. *J Cell Sci*. 2018 Jul 15;131(14):jcs212977.
56. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, et al. A PML – PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med*. 2012;18(9):1350–8.
57. Ryall JG. Metabolic reprogramming as a novel regulator of skeletal muscle development and regeneration. *FEBS J*. 2013;280(17):4004–13.