

“Nunzio Paci, Herbivore”
Imagem da autoria do pintor Nunzio Paci

Faculdade de Medicina da Universidade de
Coimbra



**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS SATÉLITE
MIOGÉNICAS NO PROCESSO DE ATROFIA DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO INDUZIDO POR IMOBILIZAÇÃO**

Vítor Hugo Teixeira Pinheiro

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra como requisito à obtenção do grau de Mestre em Medicina do Desporto. O trabalho experimental foi realizado no IBILI da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra Sob a orientação do Professor Doutor C. A. Fontes Ribeiro e da Professora Doutora Paula Cristina V.B. Tavares.

À Iolanda, o meu braço direito
Aos meus Pais e Irmã, pelo apoio e compreensão

Vítor Hugo Pinheiro

Agradecimentos

Ao Serviço de Ortopedia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, a quem devo a minha formação Ortopédica.

À Professora Doutora Paula Tavares pela Amizade criada, e por todo o apoio, disponibilidade e orientação prestada.

Ao Professor Doutor Fontes Ribeiro por todo o apoio, disponibilidade e orientação prestada. Sublinho também o rigor, a seriedade e o nível académico com que coordenou, em conjunto com o Professor Doutor Páscoa Pinheiro, o Curso de Mestrado em Medicina do Desporto 2014-2016.

Ao Mestre Eurico Ribeiro, pela Amizade criada, e pela inescedível disponibilidade, interesse e dedicação a este projeto.

À Dr^a. Sandra Simões pela ajuda na preparação das lâminas para a análise histológica.

Ao Dr. João Martins pela ajuda na realização da técnica de Imunohistoquímica.

Ao pintor Nunzio Paci, pela imagem da capa deste trabalho.

À Dr^a. Ana Inês, orientadora na formação Ortopédica, por todo o apoio prestado.

Ao Professor Doutor Fernando Fonseca, Director do Serviço de Ortopedia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pelo interesse e apoio demonstrados neste projeto desde o primeiro momento.

Resumo

Introdução: A atrofia muscular é um problema de saúde pública, afetando atletas e a população em geral, tendo como causas conhecidas a imobilização em doentes acamados, a denervação, a lesão muscular, a corticoterapia, a sepsis, o cancro, a microgravidade, a imobilização gessada e o envelhecimento, entre outras. A imobilização gessada é um dos métodos mais eficazes no desenvolvimento de atrofia muscular no membro inferior, mimetizando condições de patologias ortopédicas. Apesar de os mecanismos subjacentes à atrofia muscular ainda não estarem totalmente esclarecidos, pensa-se que as células satélite desempenham um papel relevante nestes processos metabólicos. Com este trabalho, pretendemos estudar o comportamento das células satélite na atrofia por imobilização, bem como o papel do exercício aeróbio na prevenção e/ou reversão do processo atrofico.

Objetivos: Este trabalho tem como principal objetivo estudar o comportamento das células satélite na atrofia por imobilização, bem como o papel do exercício aeróbio na prevenção e/ou reversão do processo atrofico.

Materiais e Métodos: Foram randomizados 20 ratos Wistar adultos nos diversos grupos em estudo: controlo (X); exercício físico (A); imobilização (B); exercício físico seguido de imobilização (C) e imobilização seguida de exercício físico (D). O período de imobilização foi de uma semana e o protocolo de exercício físico de 4 semanas. Foi realizada uma análise macroscópica e histológica dos músculos gastrocnémios destes animais. De forma a avaliar o número e estadio das células satélite, usou-se a técnica de imunohistoquímica com marcação com os anticorpos para o Pax-7, Myf-5 e c-met.

Resultados: A imobilização, por si só, induziu atrofia muscular. No entanto, a

atrofia foi mais acentuada no grupo de animais que tinham previamente feito quatro semanas de exercício aeróbio. Pela análise histológica, verificam-se novas células nos músculos dos ratos submetidos a exercício físico (A) e exercício físico com imobilização (C). Através da análise imunohistoquímica verifica-se que o número de células com marcação (+) para o Pax-7 é tendencialmente maior no grupo de animais que fizeram apenas exercício (A) mas com uma expressão (+) significativamente maior no grupo com imobilização (B) em comparação com o grupo controlo (X) ($p \leq 0,05$). Porém, no grupo B, o número de células com marcação positiva para Myf-5 e c-met é menor que o grupo A. Nos grupos com exercício e imobilização antes ou após (C e D) a positividade de células para pax-7 e Myf-5 não difere do grupo controlo (X), no entanto há um considerável número de células marcadas com C-Met contrariamente ao grupo controlo que não tem marcação para este anticorpo.

Conclusões: Os nossos resultados sugerem que um pré-condicionamento com exercício físico em ratos imobilizados leva a um aumento da atrofia muscular e estimula a regeneração muscular. A prática de exercício físico após atrofia estimula a regeneração muscular por um aumento da ativação das células satélite. A atrofia muscular leva a um aumento da ativação das células satélite, devido ao processo inflamatório gerado, mas sem proliferação e diferenciação em novas fibras.

Palavras Chave: Músculo esquelético; Atrofia muscular; Células Satélite; Exercício Físico; Imobilização;

Abstract

Introduction: Nowadays, the value of maintaining muscular skeletal mass and strength in people's quality of life is fully acknowledged. Muscular atrophy is a public health care problem, affecting both athletes and the general population. It has known causes, such as immobilization in bedridden patients, denervation, muscular lesion, corticotherapy, sepsis, cancer, micro-gravity, cast immobilization and aging. Cast immobilization is one of the most effective methods for inducing muscular atrophy in the inferior limbs, and mimicks orthopaedic pathologies. It is thought that satellite cells play a relevant role in muscular atrophy mechanisms, although these are not completely understood nowadays. The aim of this work is to study the behavior of satellite cells in muscular atrophy by immobilization, as well as the role of aerobic exercise in the prevention and/or reversion of this atrophic process.

Objectives: The main purpose of this work is to study the behavior of satellite cells in atrophy induced by immobilization, as well as to study the role of aerobic exercise in the prevention and/or reversion of the atrophic process.

Methodology: A group of 20 Wistar adult rats were randomized into various study groups: Control group (X); Exercise group (A); Immobilization group (B); Exercise + Immobilization (C); and Immobilization + Exercise (D). The immobilization period comprised one week and the exercise protocol 4 weeks. A macroscopic and histological analysis of the gastrocnemius muscle of these rats was performed. In order to assess the number and status of satellite cells, antibodies against Pax-7, Myf-5 and C-Met were used. These factors were identified and quantified by immunohistochemical fluorescence.

Results: Immobilization, single-handedly, induced muscular atrophy ($p \leq 0,05$).

Nevertheless, atrophy was more intense in the group of rats which had previously made 4 weeks of aerobic exercise ($p \leq 0,01$). New cells were seen by histological analysis in the muscles of rats submitted to exercise (A) and exercise + immobilization (C). Using immunohistochemical fluorescence, we could verify that the number of cells marked (+) to Pax-7 is tendentially larger in group A (exercise), but significantly higher in group B (immobilization), when comparing with the control group (X) ($p \leq 0,05$). However, in group B, the number of cells marked positive to Myf-5 and c-met is lower than in group A. In groups C and D (exercise plus immobilization prior or after to exercise), the cells positive to Pax-7 and Myf-5 are not diferente from the control group (X). Nevertheless, there is a considerable ammount of cells marked for c-met, unlike the control group (X), which does not present positive markers for this antibody.

Conclusions: Our results suggest that a pre-conditioning with physical exercise in immobilized rats leads to an increase of muscular atrophy and stimulates muscle regeneration. Exercise after muscle atrophy stimulates muscle regeneration due to an increase in satellite cell activation. Muscle atrophy leads to an increase of satellite cell activation due to the inflammatory process that is generated, but without proliferation or differentiation into new fibers.

Key words: Skeletal Muscle; Muscle Atrophy; Satellite Cells; Physical Exercise; Immobilization;

Índice

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	20
MATERIAIS E MÉTODOS	21
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	37

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Massas musculares dos diferentes grupos em estudo	26
Gráfico 2 – Número de células satélite com marcação para o Pax-7, Myf-5 e c-met	30

Índice de Figuras

Figura 1 – Grupos de trabalho	21
Figura 2 – Histologia de músculo normal	27
Figura 3 – Marcação por laminina	29
Figura 4 – Marcação por Pax-7	30
Figura 5 – Marcação por Myf-5	30
Figura 6 – Marcação por c-met	31

Acrónimo, Siglas e Abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)

BSA – Albumina sérica salina (Bovine serum albumin)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenil-indol (4',6-diamidino-2-phenylindole)

Ex. – Exercício Físico

EWGSOP – Grupo de Trabalho Europeu sobre Sarcopenia em Idosos (European Working Group on Sarcopenic in Older People)

FGF – Fator de crescimento fibroblástico (Fibroblast growth factor)

IGF – Fator de crescimento tipo insulina (Insulin-like growth factor)

Imob. – Imobilização

HE – Hematoxilina-eosina

HGF – Fator de crescimento hepatocitário (Hepatocyte growth factor)

IGF – Fator de crescimento tipo insulina (Insulin-like growth factor)

NCAM-1 – Molécula de adesão das células neurológicas 1 (Neural cell adhesion molecule 1)

MAFbx – Muscle Atrophy F-box

MHC – Miosina de cadeia pesada (myosin heavy chain)

MFRs – Fatores de regulação miogénica (Myogenic regulatory factors)

MuRF1 – Muscle RING Finger 1

MyoD – Fator Miogénico D (Myogenic factor D)

Myog – Fator Miogénico g (Myogenic factor g)

Myf5 – Fator Miogénico 5 (Myogenic factor 5)

Pax3 – Fator de transcrição 3 (paired box factor 3)

Pax7 – Fator de transcrição 7 (paired box factor 7)

PBS – Tampão fosfato salino (phosphate-buffered saline)

ROS– Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive oxygen species)

UV– Ultra-violeta

NCAM-1 – Molécula de adesão das células vasculares 1 (Vascular cell adhesion molecule 1)

Introdução

Atualmente é reconhecido o papel da manutenção da massa muscular esquelética na saúde e qualidade de vida das pessoas. A atrofia muscular é um problema de saúde pública, afetando atletas e a população em geral, tendo como causas conhecidas a imobilização em doentes acamados, a denervação, a lesão muscular, a corticoterapia, a sepsis, o cancro, a microgravidade, a imobilização gessada e o envelhecimento (Jagoe e Goldberg, 2001) (Bickel et al., 2003, Jorgensen e Jacobsen, 2001). A atrofia muscular pode ser induzida experimentalmente em animais utilizando técnicas como a denervação (Midrio, 2006), a imobilização gessada (Frimel et al., 2005), suspensão caudal (Morey-Holton e Globus, 2002) e imobilização com agrafo (Caron et al., 2009). A imobilização gessada é um dos métodos mais eficazes no desenvolvimento de atrofia muscular no membro inferior, mimetizando condições de patologias ortopédicas. Apesar de os mecanismos subjacentes à atrofia muscular ainda não estarem totalmente esclarecidos, pensa-se que as células satélite desempenham um papel relevante nestes processos metabólicos (McGeachie, 1989). Com este trabalho, pretendemos estudar o comportamento das células satélite na atrofia por imobilização, bem como o papel do exercício aeróbio na prevenção e/ou reversão do processo atrofico.

O músculo esquelético é uma unidade funcional composta por proteínas estruturais. Nos humanos, representa cerca de 40% da massa corporal, contendo 50-75% das proteínas corporais, sendo o responsável por 30-50% do “turnover” proteico corporal. É maioritariamente composto por água (75%), proteínas (20%) e outras substâncias, incluindo sais inorgânicos, minerais, gordura e hidratos de carbono (5%).

O Músculo-Esquelético é um tecido multicelular complexo, caracterizado por

uma distribuição própria de diferentes tipos de fibras musculares, associadas a tecido conjuntivo associado (Frontera e Ochala, 2015). Cada fibra muscular é rodeada por uma membrana celular (ou sarcolema). Associadas ao sarcolema existe um complexo de diferentes proteínas, que estão fisicamente conectadas com a estrutura interna do miofilamento. Estima-se que cada fibra muscular é constituída por centenas de miofibrilas e bilhões de miofilamentos. Quando reunidos, os miofilamentos formam sarcómeros, que são a unidade básica contráctil do Músculo-Esquelético (Frontera e Ochala, 2015).

A heterogeneidade do Músculo-Esquelético humano reflete a variabilidade fenotípica individual das fibras musculares. No corpo humano, esta diversidade permite a participação do músculo em atividades com necessidades metabólicas e mecânicas variadas (Schiaffino e Reggiani, 2011). A arquitetura vascular que suporta estas necessidades metabólicas varia, dependendo do tipo de fibra (Liu et al., 2012a). Para além disso a resposta das fibras musculares aos estímulos como a denervação, corticosteroides, níveis hormonais, envelhecimento, inatividade e doença são específicos de cada tipo de fibra (Schiaffino et al., 1989). A molécula de cadeia pesada de miosina (MHC) é a principal proteína estrutural, com diferentes isoformas, que permitem a caracterização do músculo esquelético. Nos seres humanos conhecem-se três isoformas, tipo I, IIa e IIx, sendo que as fibras musculares podem conter apenas uma (fibra pura), ou uma combinação destas isoformas (fibra híbrida), dando origem a 5 dos tipos mais prevalentes de fibras nos seres humanos (I, I/IIa, IIa, IIa/IIx, IIx) (Smerdu, Karsch-Mizrachi et al. 1994). Os roedores adultos apresentam também a isoforma IIb. As fibras tipo I são compostas por MHC I, uma fibra tipicamente resistente à fadiga, caracterizadas por baixo consumo de adenosina trifosfato (ATP) e reduzida velocidade de encurtamento. Têm um metabolismo predominantemente oxidativo (Qaisar et al., 2016). As fibras tipo IIb e IIx são constituídas por MHC IIb e IIx,

respetivamente, e são isoformas rápidas. Encontram-se em fibras com elevado consumo de ATP uma maior velocidade de encurtamento, sendo por isso mais fatigáveis. Têm um metabolismo predominantemente glicolítico (Qaisar et al., 2016). As fibras tipo IIa são constituídas por isoformas MHC IIa, sendo consideradas fibras intermédias, dado que apresentam uma velocidade rápida de contração, com um metabolismo misto (Qaisar et al., 2016). O conhecimento da composição das isoformas MHC na fibra muscular é importante uma vez que esta condiciona algumas propriedades contrácteis, como a velocidade máxima de encurtamento, e propriedades intrínsecas geradoras de força (Schiaffino, Gorza et al. 1989, Schiaffino e Reggiani 2011, Galpin, Raue et al. 2012). Durante as últimas décadas as fibras musculares têm sido classificadas, usando diferentes critérios. A classificação mais utilizada para os músculos dos membros de humanos inclui três tipos de fibra: tipo I (lento, oxidativo e resistente à fadiga), IIa (rápido, oxidativo e com propriedades metabólicas intermédias) e IIx (o mais rápido, glicolítico e fatigável).

De uma forma geral, a massa muscular depende do balanço entre a síntese proteica e a degradação, e ambos os processos são sensíveis a fatores como o “status” nutricional, o balanço hormonal, o exercício físico, lesões ou doenças, entre outras. Uma das características do músculo-esquelético é relativa à sua capacidade de plasticidade e de se adaptar em função de estímulos. Assim, com aplicação de cargas externas é possível induzir hipertrofia muscular ou, contrariamente, provocar atrofia muscular com ausência de estímulos externos ou diminuição do uso (Brooks e Myburgh, 2014).

A atrofia muscular pode ser induzida experimentalmente em animais utilizando técnicas como a denervação (Midrio, 2006), a imobilização gessada (Frimel et al., 2005), suspensão caudal (Morey-Holton e Globus, 2002) e imobilização com agrafo (Caron et al., 2009). A denervação permite mimetizar patologia traumática em que

ocorrem alterações da função nervosa (Midrio, 2006). Atualmente a maioria os estudos terapêuticos baseiam-se em modelos de suspensão caudal em ratos para simular a atrofia de desuso em humanos (Cho et al., 2016). A suspensão caudal é um modelo baseado na ausência de carga mecânica (Morey-Holton e Globus, 2002) que é necessária para a manutenção da massa esquelética, sendo mais apropriada para estudos de microgravidade induzida do que para atrofia pós cirurgia ou traumatismo. A imobilização gessada é um método eficaz no desenvolvimento de atrofia muscular no membro inferior, mimetizando condições de patologias ortopédicas. No entanto, é uma técnica que tem de ser adaptada a cada animal para otimizar os resultados, o que consome tempo e recursos. Implica uma monitorização diária relativamente ao gesso roído, abrasões cutâneas, oclusão venosa e problemas relacionados com a deambulação (Frimel et al., 2005).

Na atrofia muscular esquelética existe um aumento do catabolismo proteico devido em parte à ativação da via proteolítica dependente da ubiquitina-proteossoma (Jagoe e Goldberg, 2001). Este processo é comum em várias doenças sistémicas, incluindo a diabetes, o cancro, a sepsis, o hipertiroidismo e a urémia. Estas diferentes formas de atrofia são caracterizadas por um conjunto comum de alterações bioquímicas (Lecker et al., 1999). Ocorre uma ativação proteolítica dependente da ubiquitina-proteossoma, na qual as proteínas ubiquinadas são degradadas através da via do proteossoma 26 S através de ligases específicas, o MuRF1 (Muscle RING Finger 1) e o MAFbx (Muscle Atrophy F-box), também conhecida como Atrogina-1. Embora os sistemas de degradação proteica tenham sido extensamente estudados, os mediadores moleculares do processo de atrofia muscular ainda não foram ainda definidos de forma clara, nem se o bloqueio de tais mediadores inibe o processo de atrofia muscular. A denervação, a imobilização e a ausência de carga em ratos resultam em perdas semelhantes de massa muscular dos gastrocnémios, o que é consistente com a ideia

que existem mecanismos comuns que conduzem à atrofia (Bodine et al., 2001). Os genes o MuRF1 e o MAFbx estão sobre expressados nestes 3 modelos de atrofia. A análise histológica de tecidos humanos e de ratos mostrou a especificidade destes marcadores pelo tecido muscular esquelético e cardíaco o que é consistente com o seu papel específico nestes tecidos (Bodine et al., 2001). Em situações de sépsis (Wray et al., 2003) e de doenças cancerígenas (Cai et al., 2004) ocorre também uma sobre-expressão destes marcadores.

A perda de massa muscular, força e atrofia com o avançar da idade é considerada pela literatura Sarcopenia. Recentemente, o EWGSOP, grupo de trabalho Europeu sobre Sarcopenia em idosos, expandiu a designação e sugeriu critérios de diagnóstico a presença de níveis baixos de massa muscular (avaliados por densitometria ou bioimpedância) e a presença de fraqueza muscular e/ou desempenho físico comprometido (Cruz-Jentoft et al., 2010). A sarcopenia apresenta uma prevalência entre 4 e 27%, dependendo do género e do país. Representa um estado de saúde débil com elevadas condicionantes pessoais tais como mobilidade reduzida, risco aumentado de quedas e fraturas ósseas, incapacidade de realizar tarefas diárias/do quotidiano, perda de autonomia e risco acrescido de morte. Existe uma maior perda de massa muscular pelos homens em comparação com as mulheres e a nível dos membros inferiores comparativamente aos membros superiores (Frontera et al., 2000). A redução da massa corporal aliada à diminuição de massa muscular é severamente responsável pela fragilidade generalizada no idoso (Stenholm et al., 2008). No entanto, alterações na composição muscular são também importantes, como por exemplo, musculatura dos membros inferiores debilitada, diminuição da performance muscular e acumulação de gordura intramuscular (Visser et al., 2002).

A perda de força com o avançar da idade não é um fenómeno Universal, sabendo-se que indivíduos que mantem atividade física estão mais protegidos contra

este fenómeno (Hughes et al., 2001). Estão descritos diversos mecanismos para demonstrar a origem e evolução desta patologia. Estes poderão envolver, entre outros, a diminuição da síntese proteica, a proteólise, a perda integridade neuromuscular e a acumulação de gordura intramuscular (Cruz-Jentoft et al., 2010). Com o envelhecimento há diminuição do número de mitocôndrias (Broskey et al., 2014) e alterações a nível do retículo sarcoplasmático que prejudicam o mecanismo de excitação-contração (Weisleder et al., 2006). Independentemente do mecanismo limitante na interação normal dos miofilamentos, a evidência científica atual refere que a disfunção muscular nos doentes idosos, é pelo menos parcialmente, um problema qualitativo e não quantitativo.

Na literatura os termos inatividade física e imobilização, por vezes, são fonte de confusão. Muitas das conclusões publicadas sobre inatividade física são baseados nos resultados de experimentos de imobilização. A inatividade física é um comportamento caracterizado pela ausência de atividade física, enquanto a imobilização é uma condição clínica em que um membro ou todo o corpo é privado de movimento. Apesar de a imobilização ser um contínuo de inatividade física, é uma situação extrema que necessita de um desenho experimental diferente. Nas duas situações o declínio da carga promove a resistência insulínica e a atrofia muscular (Xu et al., 2012, Hokama et al., 1997), estados de doença nos quais a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) parecem ser um denominador comum (Bashan et al., 2009, Powers et al., 2011). No entanto, no caso da atrofia por diminuição da atividade física, este envolvimento das ROS na promoção da resistência insulínica necessita de ser melhor elucidado (Pierre et al., 2016).

A associação de ausência de trabalho com resistências externas e atividade neuronal reduzida é designada por desuso, podendo ocorrer em situações clínicas, já anteriormente referidas, tais como imobilização de um membro, doentes acamados,

lesão na espinal medula e lesão da inervação periférica, originando uma redução significativa de massa muscular e produção de força. Caracteriza-se como uma diminuição do volume, dimensões celulares, através da perda de organelos, citoplasma e proteínas, podendo afetar tanto a população em geral como atletas. O grau de extensão da atrofia muscular sob a condição de desuso é variável e dependente de uma variedade de fatores, tais como idade, função fisiológica, tipologia das fibras, musculares afetadas, condições de imobilização (ex. ângulo em que a articulação é fixa) e grau de inatividade/sedentarismo (Bodine, 2013). Estudos pequenos de 2,8 e 12 dias de repouso na cama, não mostraram efeitos significativos na massa ou força muscular (Trappe et al., 2001). No entanto longos períodos de descanso (35 a 90 dias) induziram uma grande diminuição de força a nível dos membros inferiores (Alkner and Tesch, 2004).

Durante a atrofia muscular por imobilização ou diminuição do uso existem dois mecanismos de degradação proteica nas células eucarióticas, nomeadamente o sistema ubiquitina-proteossoma e o eixo autofágico-lisossoma. Em condições fisiológicas normais, o sistema ubiquitina-proteossoma é responsável pela degradação de proteínas de curta longevidade, ao passo que o eixo autofágico-lisossoma regula os níveis das proteínas de longevidade superior assim como os organelos. No entanto, é plausível que ambos desempenhem ações importantes na degradação do músculo-esquelético (Fanzani et al., 2012).

De forma semelhante à sarcopenia, a imobilização por longos períodos leva a uma perda de força superior à perda de massa muscular, sugerindo uma alteração qualitativa no músculo, devido à alteração da qualidade dos elementos contráteis de cada fibra muscular. Desta forma resistência, velocidade e poder são severamente afetados nas células tipo I e II (Trappe et al., 2004). Os mecanismos por de trás destas alterações ainda são pouco conhecidos, mas incluem a disrupção das pontes actina-

miosina, causada por alterações da miosina, como o aumento da fosforilação e N-acetilglucosaminação no oxigênio (Stevens et al., 2013). Apesar das semelhanças existem diferenças entre a atrofia por desuso e a Sarcopenia. Na atrofia por desuso tende a haver transformação do tipo de fibras musculares, com predomínio de fibras tipo II relativamente às tipo I, enquanto o contrário tende a ocorrer na Sarcopenia. Como referido anteriormente, durante o período de imobilização as fibras de contração lenta podem sofrer alteração fenotípica e adquirir características de fibras de contração rápida. Por outro lado durante os períodos de exercício aeróbico e anaeróbico há um aumento de fibras de contração lenta. No caso do músculo solear, rico em fibras de contração lenta, verifica-se uma rápida atrofia em resposta a situações de desuso. Relativamente ao extensor longo dos dedos, rico em fibras de contração rápida, só se verifica atrofia significativa após situações de desuso prolongadas (Hanson et al., 2010).

Dado que na maioria das vezes a atrofia muscular não pode ser evitada, a recuperação da massa e função muscular torna-se muito importante para restaurar a aptidão, a saúde e o bem-estar das pessoas afetadas. Atualmente os programas de reabilitação procuram a otimização dos protocolos de exercício de forma a restaurar a massa muscular e atividade após atrofia por desuso. Infelizmente não existem tratamentos efetivos para a atrofia muscular. Existem poucas publicações sobre o efeito específico do exercício nas propriedades funcionais dos músculos após atrofia por desuso (Hanson et al., 2010). Acrescenta-se o facto de não existir igualmente uma opção farmacológica de forma a incrementar os ganhos musculares após um episódio indutor de atrofia. De momento, apenas o trabalho com resistência externa poderá ser aplicado para promover a recuperação da massa e força muscular após atrofia por desuso, apesar de vários pacientes não possuírem capacidade de realizar os exercícios numa intensidade suficiente de forma a promover hipertrofia muscular.

O músculo-esquelético contribui de forma significativa para múltiplas funções corporais. Do ponto de vista mecânico a sua principal função é a conversão de energia química em energia mecânica, permitindo a manutenção da postura e o movimento, essenciais para a independência funcional e para a realização das atividades do dia-a-dia. Do ponto de vista metabólico, o músculo-esquelético contribui para o metabolismo energético basal, servindo como reserva para substratos, como aminoácidos e hidratos de carbono, manutenção da temperatura corporal, consumo do oxigênio e de combustíveis usados durante o exercício físico (Frontera e Ochala, 2015). No entanto, devido à sua localização e função, o músculo-esquelético pode ser alvo de lesão por traumatismo, estiramento excessivo, desgaste ou por doenças degenerativas musculares. A reparação muscular ocorre através de processos de regeneração, mediados por células musculares indiferenciadas. As células satélite constituem o principal grupo das células musculares indiferenciadas (Fu et al., 2015). Em 1961, Alexander Mauro foi o primeiro a identificar em sapos uma população de pequenas células mononucleares, que ele designou por células satélite, dada a sua localização entre a membrana basal e o sarcolema (Mauro, 1961). Mais tarde estas células foram identificadas em mamíferos, incluindo Humanos (Ishikawa, 1965). No músculo adulto, as células satélite encontram-se tipicamente num estado quiescente. No entanto, sob estimulação, são ativadas, proliferando e ou diferenciando-se. Os mioblastos constituem a descendência das células satélite, tendo a possibilidade de se fundir entre eles dando origem a novas miofibras, fundir-se com fibras musculares pré existentes, dando o seu núcleo à fibra ou regressar ao estado quiescente, restabelecendo as reservas de células satélites (Schmalbruch, 1976). Ou seja, as células satélite têm a capacidade de proliferar e sair do ciclo celular para se diferenciarem em novas fibras musculares, permitindo a reparação de lesões musculares, ou então, a auto-renovação das reservas de células indiferenciadas que se encontram num estado quiescente

(Garcia-Prat et al., 2013), tendo por isso propriedades de célula miogénica indiferenciada (Collins et al., 2005, Relaix e Zammit, 2012).

Nos vertebrados, todos os músculos esqueléticos derivam dos sómitos, que são estruturas mesodérmicas metanéféricas que se formam em ambos os lados do tubo neural. Os sómitos diferenciam-se sob a influência dos tecidos circundantes, ventralmente ao esclerótomo mesenquimatoso. Isto dá origem ao esqueleto axial e dorsalmente ao dermomiótomo, que irá dar origem aos músculos esqueléticos do tronco, cauda e membros (Schuster-Gossler et al., 2007). Durante o desenvolvimento embrionário as células satélite surgem juntamente com o músculo onde residem e partilham a mesma origem. As células satélite do tronco e membros têm origem no dermomiótomo, enquanto que a maioria das células satélites do músculos crânio-faciais derivam da mesoderme da cabeça (Schuster-Gossler et al., 2007, Relaix e Marcelle, 2009). Foi também demonstrado que as células satélite podem dar origem a várias linhagens mesodérmicas, como músculo, osso e gordura castanha (Kang e Krauss, 2010). Por tudo isto, estas células preenchem os critérios de uma célula indiferenciada somática verdadeira: têm capacidade de auto-renovação e de gerar descendência de vários tipos celulares mais diferenciados (Bentzinger et al., 2012). À medida que as fibras musculares vão sendo formadas, outras são adicionadas, utilizando a primeira como molde (Sambasivan e Tajbakhsh, 2007). Na fase final da embriogénese, ainda pouco percebida, as fibras musculares progenitoras sofrem uma proliferação inicial extensa, diminuindo posteriormente à medida que os mionúcleos atingem um estadio estacionário, com um pico de síntese de proteínas miofibrilares (Davis e Fiorotto, 2009). Assim que o músculo atinge a maturação completa, as suas células residentes progenitoras vão-se tornar quiescentes e residir dentro do feixe muscular como células satélites (Bentzinger et al., 2012, Aulehla e Pourquoi, 2010).

Inicialmente as células satélites eram identificadas com base na sua localização

anatômica sublamina, no entanto atualmente a sua identificação faz-se através de glicoproteínas de membrana e marcadores intracelulares. Alguns marcadores estão localizados no núcleo das células satélite, tal como o Pax3 e o Pax7. O Myf5 e o MyoD pode ser expressos especificamente por células miogénicas mas não são expressos em células satélites quiescentes. Os marcadores de superfície das células satélite mais conhecidos são o NCAM (CD-56), M-caderina e CD34, α 7- and β 1 integrinas, c-met, CXCR4 e VCAM-1. Em estudos animais o antigénio Pax7 é o marcador mais utilizado para identificar células satélite, sendo considerado o marcador mais confiável para identificar células satélite em músculo de rato (Kuang et al., 2006) (Zammit et al., 2006). A sua utilização em estudos com seres humanos tem aumentado na última década (Kern et al., 2014, Theriault et al., 2014).

As células indiferenciadas somáticas dependem de um meio ambiente especializado que se denomina “nicho de células indiferenciadas”, que consiste num compartimento localizado num órgão em específico que suporta a auto-renovação das células indiferenciadas e ao mesmo tempo previne que estas se diferenciem (Scadden, 2006). O microambiente deste nicho também dá instruções quanto à diferenciação das células indiferenciadas nas respetivas linhagens celulares específicas desse órgão. A extração das células indiferenciadas somáticas do nicho é conseqüentemente acompanhada por perda de propriedades da célula indiferenciada ao longo do tempo. As células satélite parecem ser particularmente sensíveis a esse tipo de manipulação quando em comparação, por exemplo, com as células indiferenciadas hematopoiéticas (Bentzinger et al., 2012).

A transformação de células satélites em miofibras consiste em passos específicos desde o estadió de quiescência, ativação, proliferação, diferenciação e por último fusão celular (Dumont et al., 2015a). Este processo é orquestrado pela regulação entre o fator de transcrição Pax7 e fatores de regulação miogénica (MFRs)

(Seale et al., 2000). Durante o estadió de quiescência as células satélite expressam o fator de transcrição Pax7. Após a ativação entram no ciclo celular expressando fatores de regulação miogénica (Arnold e Braun, 2000). Numa fase inicial a regulação é feita pelo Myf5, havendo proliferação celular, seguida da expressão concomitante de MyoD, que marca a maioria das novas células satélite ativadas, comprometidas com a linhagem miogénica, formando os mioblastos (Cornelison et al., 2000). Nesta altura ocorre a expressão de Miogenina e MRF4, havendo fusão dos mioblastos diferenciados, com a criação dos miótubulos, que por sua vez se fundem com as miofibras existentes contribuindo para o crescimento e reparação muscular. Desta forma a diferenciação final das células satélite é iniciada pelo aumento de regulação de Miogenina e MRF4 e pela diminuição da regulação do Pax7. No entanto, se a regulação pelo Pax7 se mantiver elevada após a proliferação, as células satélite abortam o seu processo de diferenciação e retornam ao estado de quiescência, promovendo a auto-renovação e as reservas de células satélites (Olguin et al., 2007). Embora a identificação de células satélite seja baseada na expressão de marcadores e na análise morfológica, tem sido sugerido que este tipo de células compreendem um grupo heterogéneo de células precursoras. O facto de serem mais propensas a serem comprometidas com a linhagem muscular ou com a via de auto-renovação, é também evidência dessa heterogeneidade (Collins et al., 2005, Dumont et al., 2015b). A expressão do marcador Myf5 tem sido reportada como ausente em cerca de 10% da população de células satélite. Células identificadas como Pax7+/Myf5- contribuem para o reservatório de células satélite, ao contrário das células Pax7+/Myf5+ que estão comprometidas com o processo de diferenciação (Kuang et al., 2007). Durante o processo de regeneração muscular as células satélite podem ser distinguidas com base na expressão de Pax7 e MyoD. Células Pax7+/MyoD- encontram-se num estadió quiescente, células Pax7+/MyoD+ encontram-se no processo de proliferação,

enquanto que as células Pax7-/MyoD+ estão num processo de diferenciação, seguido de fusão celular, dando origem a miofibras multinucleadas (Zammit et al., 2004). Existe um subgrupo de células ativadas que dão origem a células Pax7+/MyoD-, que revertem para um estado quiescente, funcionando desta forma células indiferenciadas verdadeiras (Motohashi e Asakura, 2014, Bentzinger et al., 2012).

Como referido anteriormente as células satélite tem a capacidade de se diferenciarem em novas miofibras ou de se auto-renovarem. Existem dois mecanismos principais de regulação da renovação celular. A divisão assimétrica para auto-manutenção, com um grupo de células filhas comprometido com a diferenciação miogénica, e outro grupo de células filhas, em menor percentagem, comprometido para auto-renovação. Na divisão simétrica a descendência é semelhante, constituindo dois grupos de células estaminais semelhantes (Motohashi e Asakura, 2014, Tierney e Sacco, 2016). Os fatores miogénicos Myf5, MyoD e Myog apresentam uma expressão assimétrica nas células filhas (Kuang et al., 2007). O fator MyoD está expresso nas células Pax-7 comprometidas à diferenciação e ausente nas Pax-7 auto-renovadoras. O comportamento é semelhante, relativamente à expressão Myog. Nas células satélite Myf (-) o recetor Notch3 está ativado, enquanto que nas Myf (+) recebem o ligando Notch Delta 1. Estes achados mostram o papel importante da via de sinalização Notch, que irá ser explicada mais à frente. De acordo com a literatura, fatores que inibam o MyoD e estimulem o Pax-7, têm um papel preponderante no retorno das células satélite de uma estado ativo para o estado quiescente (Motohashi e Asakura, 2014, Liu et al., 2012b). Não é possível atualmente isolar e expandir células satélite in vitro porque estas rapidamente diferenciam-se em mioblastos, um precursor muscular mais diferenciado pela expressão irreversível de Myf5, MyoD e Miogenina (Boonen e Post, 2008).

O processo de regeneração muscular assemelha-se o processo de miogénese

embrionário. Como já referido anteriormente as células musculares progenitoras que saem do estado de quiescência e tornam-se ativas e proliferativas. As divisões assimétricas são importantes para dar origem a células filhas, comprometidas com a formação miogénica e outras que retornam ao estado de quiescência para restabelecer as reservas de células satélites. Após a proliferação os mioblastos diferenciam-se e fundem-se entre eles ou a uma miofibrila prévia para a reparar. Finalmente as miofibrilas desenvolvem-se e amadurecem. As células satélite apresentam um vasto número de fatores de ativação, incluindo o estiramento mecânico, que é importante no período pós natal durante o desenvolvimento muscular mediado por osso. Fatores de sinalização local como o óxido nítrico, fator de crescimento tipo insulina (IGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), IL-6, fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) têm um papel muito importante na ativação das células satélites e no desenvolvimento muscular (Snijders et al., 2015) (Fu et al., 2015). Existem diversas vias de sinalização envolvidas neste balanço dinâmico. A via de sinalização Notch consiste numa via de sinalização externa que foi implicada na manutenção da quiescência, bem como na regulação da proliferação e diferenciação em vários estudos (Fre et al., 2005, Yin et al., 2013). O pico de atividade desta via encontra-se no estado de quiescência e diminui progressivamente à medida que a célula avança na diferenciação miogénica. A ativação desta via de sinalização previne a diferenciação mioblástica e promove a auto-renovação das células satélite, por limitar a atividade do fator MyoD através da regulação positiva das proteínas HES (Kuroda et al., 1999). A ausência ou limitação desta via apresenta três consequências principais: falha na manutenção do estado de quiescência, perda da capacidade de auto-renovação e diferenciação espontânea, sem fase de proliferação (Bjornson et al., 2012, Conboy e Rando, 2002). Os fatores de transcrição da família FOXO regulam as reservas de células satélites nos músculos adultos. Os níveis de fator de transcrição FOXO3 são mais elevados nas células

quiescentes que nas ativadas, havendo uma relação entre este fator de transcrição e a via Notch, sendo que o fator FOXO3 regula o fator Notch1 e Notch3, ativando a via de sinalização Notch, promovendo a manutenção do estado de quiescência (Gopinath et al., 2014). Os microRNAs têm um importante papel na regulação das células satélite. Foi demonstrado que o miR-489 é altamente expresso em células no estado quiescente e a sua atividade diminui quando estas se tornam ativas. O alvo deste gene é o oncogene Dek, cujo mRNA e os níveis de proteínas são superiores nas células satélite ativadas em comparação com os níveis nas células no estado quiescente. As células Dek positivas estão comprometidas à diferenciação miogénica, enquanto as Dek negativas promovem a auto-renovação (Cheung et al., 2012). Outro microRNA implicado na manutenção do estado de quiescência é o miR-31. O seu alvo é o mRNA Myf5, levando à sua diminuição, promovendo o estado de quiescência celular (Crist et al., 2012). A via de sinalização Wnt é outra das vias de sinalização das células satélite e tem um papel central na ativação, proliferação e no destino das células satélite (von Maltzahn et al., 2012). Apresenta duas vias distintas, a canónica Wnt/ β -catenina que induz a proliferação das células satélite durante a regeneração muscular e a via Wnt não canónica/ via células de polaridade planar que induz o desenvolvimento dos miócitos nas fibras em desenvolvimento. Um dos receptores Wnt, o Fzd7 é altamente expresso nas células satélite quiescentes Pax7+/Myf-. Esta interação promove a divisão simétricas deste tipo de células através da via não canónica (Le Grand et al., 2009). Esta via é muito importante na manutenção das reservas de células satélite, dado que os músculos que não expressam o Wnt7 apresentam uma diminuição do número de células satélite após o processo de regeneração muscular. Após a ativação, a via Notch-1 tem sido implicada na proliferação celular, no entanto para haver uma progressão para a diferenciação celular tem de haver uma mudança de sinal para a via Wnt. Estas duas vias interagem entre si, de forma a promoverem proliferação celular

suficiente antes da diferenciação, de forma a permitir a regeneração muscular apropriada (Brack et al., 2008). Para a célula satélite sair do ciclo celular é necessário a regulação positiva de inibidores da ciclina quinase. O Sprouty1 (Spry1) é um recetor inibidor da via tirosina quinase expresso nas células Pax7+ quiescentes, mas com repressão da sua expressão nos mioblastos em proliferação. Quando as células Pax7+ retornam ao estado quiescente, o Spry1 é novamente expresso promovendo a saída das células do ciclo celular (Shea et al., 2010).

A atrofia por desuso é uma condição clínica que afeta qualquer indivíduo ao longo da sua vida, e pode ser particularmente debilitante em indivíduos idosos. Como já referido anteriormente, atualmente ainda não existem armas terapêuticas de qualidade para tratar, devido à falta de conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela indução e manutenção da atrofia muscular.

O papel das células satélite na atrofia muscular e na recuperação pós atrofia está menos bem caracterizado do que no desenvolvimento muscular e na reparação de lesões musculares (Charge e Rudnicki, 2004). A ativação das células satélites após imobilização pode ser devida a ausência de carga mecânica (Ferreira et al., 2006). A perda de células satélites na atrofia muscular não é um achado consistente. Em estudos com Humanos, após 14 dias de imobilização (Snijders et al., 2014) não houve alteração no número de células satélite. No entanto um outro estudo mostrou aumento do número de células satélite após 14 dias de imobilização (Suetta et al., 2013). Em situações de atrofia severa o número de células satélite diminui drasticamente (Verdijk et al., 2012). Em ratos, ocorre uma diminuição do número de células satélite com a imobilização (Kujawa et al., 2005), no entanto, esta é dependente do tempo de imobilização (Ferreira et al., 2006). Desta forma, a intensidade e a duração do processo atrofico são importantes para a interpretação destes resultados. O processo de perda de células satélite durante a atrofia ainda não está esclarecido, bem como se há ou não

alteração da função das restantes células satélite durante o processo, e se a sua função pode ser restaurada com a reaplicação de carga. A literatura mais recente indica que há uma diminuição do número de células satélite em animais, enquanto que nos humanos esse número se mantém estável ou até aumenta, a não ser que o ambiente atrófico seja particularmente severo.

O exercício físico induz alterações metabólicas e estruturais que são específicas do tipo de exercício praticado. São ativadas diferentes vias de sinalização durante o exercício físico, contribuindo para o desenvolvimento e adaptação do Músculo-Esquelético.

O treino aeróbico tem a capacidade de modular o tipo de fibras musculares e de interferir em diversos mecanismos musculares, incluindo a ativação de células satélite. Apesar do efeito deste tipo de treino a nível das células satélite ainda não estar completamente elucidado, este tipo de exercício tem mostrado efeitos benéficos sobre a integridade do músculo esquelético, mesmo em pessoas que sofrem de miopatias (Sveen et al., 2008). O treino aeróbico não é tipicamente associado a alterações do tamanho do músculo e da sua capacidade de gerar força. Existem poucos estudos a descrever os efeitos deste tipo de exercício na ativação e proliferação das células satélite. Appell mostrou que a ativação das células satélite não ocorre antes das 10 semanas de treino aeróbico (Appell et al., 1988). Mais recentemente foi mostrado o aumento do número de células satélite em homens idosos após 14 semanas de exercício aeróbico (Charifi et al., 2003).

O treino de resistência leva a um aumento da capacidade para gerar força, parcialmente devido à hipertrofia muscular. Nos humanos a principal causa de hipertrofia é o aumento do tamanho individual das fibras musculares, devido ao aumento de produção proteica e da adição de miofilamentos, miofibrilas e sarcómeros. Este processo pode resultar da ativação e fusão das células satélite, resultando na

adição de novos mionúcleos (Snijders et al., 2009, Marcotte et al., 2015). Existem, no entanto, diversos estudos animais em que há hipertrofia, sem ativação de células satélite ou incorporação de mionúcleos (Wang e McPherron, 2012, Lee et al., 2012). De forma similar ao treino de endurance existem diversos fatores e vias moleculares que regulam a massa muscular e a resposta hipertrófica. As duas vias mais importantes são a via IGF1-Akt-mTOR e a via Miostatina-Smad2/3 (Schiaffino et al., 2013, Hitachi e Tsuchida, 2013). A primeira pode ser ativada pelo cálcio e pela atividade mecânica. Na segunda via a Miostatina atua como um regulador negativo da massa muscular. Mutações do gene da Miostatina ou bloqueio desta via resulta na Hipertrofia muscular. Em modelos de atrofia por desuso o exercício de resistência reduziu, mas não evitou a perda de massa muscular. Em Humanos, exercício físico durante 14 dias numa perna imobilizada foi suficiente para preservar a massa do músculo quadríceps (Oates et al., 2010).

De forma a estimular a hipertrofia muscular com o exercício, a dieta tem um papel importante. Diversos estudos afirmam que ocorre um aumento no conteúdo proteico em apenas 24h após 92 contrações excêntricas em jovens e idosos. No entanto o aumento foi superior nos indivíduos jovens, sugerindo que a atividade das células satélite em idosos se encontra debilitada (Dreyer et al., 2006)

O Exercício físico melhora a massa e a força muscular, e aumenta a performance física em jovens e idosos (Smiles et al., 2016). Este processo é facilitado pela proliferação e/ou diferenciação das células satélite e controlado pela activação e ou supressão sequencial dos fatores reguladores da miogénese (i.e. Myf5, MyoD, Myogenin, and Mrf4). A expressão do mRNA destes fatores aumenta em resposta ao exercício quer nos indivíduos jovens quer nos adultos (Verdijk et al., 2009, Costa et al., 2007). O exercício físico permite a manutenção e do volume e da massa muscular. Estudos publicados mostram que o exercício físico após um período de desuso

aumenta a massa muscular, a área de secção transversa e a percentagem de fibras musculares de contração lenta (Hanson et al., 2010, Valero et al., 2012).

As células satélite respondem às alterações ambientais que ocorrem na atrofia por desuso. No entanto, o papel completo que estas desempenham no estabelecimento de um novo ambiente homeostático para as novas fibras musculares necessita de ser melhor elucidado.

Objetivos Gerais

A visão atual dos mecanismos de atrofia muscular considera várias teorias entre as quais o envolvimento das células satélite miogénicas. Não é claro ainda o processo de mobilização e diferenciação destas células, pelo que é objetivo deste trabalho estudar a interação entre as células satélite e o processo de atrofia muscular. É também nosso objetivo verificar qual o papel do exercício físico no processo de atrofia muscular por imobilização e na recuperação muscular pós-atrofia através da mobilização das células satélite.

Objectivos Específicos

- Identificar e quantificar as células satélite do músculo gastrocnémios, através de técnicas de imunohistoquímica por fluorescência, utilizando anticorpos para diferentes marcadores das células satélite (Pax-7, Myf-5 e c-MET).
- Avaliar as alterações nas células satélite do músculo sujeito a atrofia por imobilização e no músculo em recuperação após atrofia, por comparação com o controlo.
- Avaliar o papel do exercício físico nas células satélite no músculo normal, na atrofia muscular e na recuperação muscular pós atrofia, através da expressão dos marcadores anteriormente referidos.

Assim, através da avaliação da expressão de diferentes fatores, que são responsáveis pela ativação, proliferação, migração e diferenciação das células satélite, e do efeito do exercício físico nos mesmos, procuramos contribuir para a melhor caracterização do comportamento das células satélite miogénicas na atrofia muscular após imobilização.

Materiais e Métodos

Plano de trabalhos

De forma a estudar o efeito da imobilização e do exercício físico na activação e diferenciação das células satélite miogénicas foi usado um modelo animal sujeito a imobilização da pata traseira para indução de atrofia muscular com e sem exercício físico.

O exercício físico foi efectuado em tempos desencontrados para que a massa corporal e idade dos animais não interferissem nos resultados. Os grupos e programa de trabalho estão esquematizados na figura seguinte:

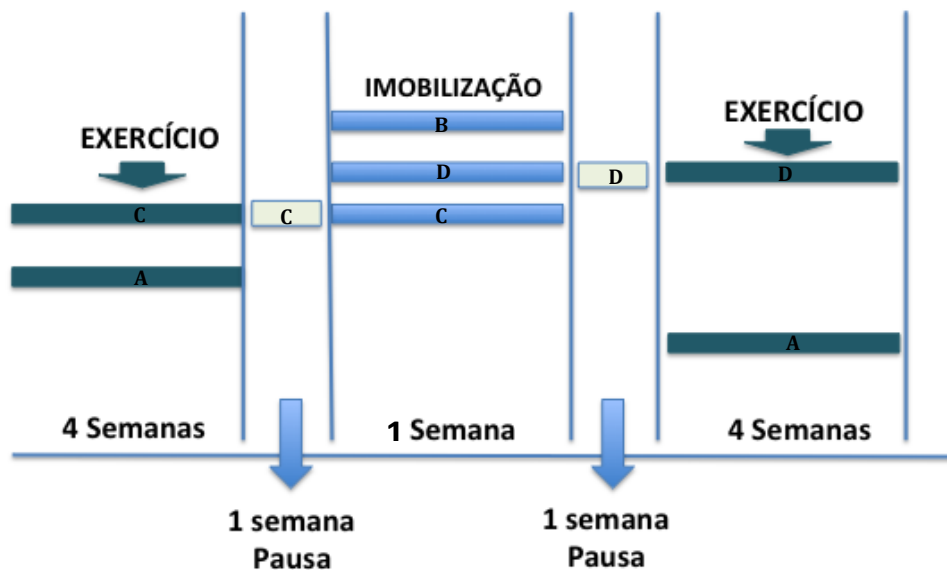


Figura 1: Plano de trabalho indicando os grupos em estudo e os tempos utilizados. *A*- Exercício Físico; *B*-Imobilização; *C*-Exercício Físico+Imobilização; *D*- Imobilização + Exercício Físico. Entre o período de Exercício Físico e a imobilização, e vice versa, foi realizado um período de repouso de uma semana.

Modelo animal

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos (com uma massa corporal de 200 – 250 g no início das experiências). Os animais foram mantidos 2 a 3 por caixa num biotério de manutenção sob ciclos de 12 h luz/noite sob temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e humidade controlada ($50 \pm 10\%$) com água e comida *ad libitum*.

Os animais foram manuseados com o cuidado possível de modo a minimizar o stress ambiental. Todas as experiências foram realizadas de acordo com a legislação em vigor e supervisionadas por investigador credenciado para o trabalho com animais. Neste trabalho foram utilizados apenas quatro animais em cada grupo por se tratar de um estudo piloto.

Os animais foram randomizados nos diversos grupos em estudo: controlo ou sedentários (X); exercício (A); imobilização (B); exercício físico + imobilização (C), imobilização + exercício físico (D) e apenas imobilização. Entre o exercício e a imobilização foi realizado repouso de uma semana.

Imobilização

De forma a induzir atrofia muscular da pata direita traseira procedeu-se à imobilização com a pata em extensão. Foi utilizada uma ligadura rígida para o efeito.

Todos os animais foram monitorizados diariamente, relativamente à ligadura roída, abrasões cutâneas, e estado neurovascular.

Protocolo de Exercício Físico

Os animais realizaram um protocolo de exercício físico durante 4 semanas em tapete rolante adaptado da metodologia proposta por Fontes Ribeiro (Fontes-Ribeiro et al., 2011). Desta forma, os animais que foram submetidos a protocolo de exercício sofreram um período de adaptação ao tapete rolante de forma a condicionar a adaptação motora. O exercício consistiu num plano de corrida durante quatro semanas

num tapete rolante para animais de pequeno porte (Panlab/Letica LE8706, Barcelona, Spain), com aumento da velocidade ao longo da duração do protocolo (de 15 min no início até 50 min na última semana) e da intensidade (velocidade diária máxima aumenta de 12 cm/s até 54 cm/s e com 5% de inclinação na quarta semana). O grupo controlo foi acondicionado durante 10 minutos, uma vez por semana a velocidade reduzida de modo a minimizar possíveis interferências do sistema nervosa central e manutenção das habilidades motoras.

Extração dos Músculos

Após os tratamentos de cada grupo, os animais foram sacrificados com sobredosagem de anestésico cetamina com clorpromazina, seguido da extração dos músculos gastrocnémios. Antes da remoção dos músculos, foram medidos os diâmetros lateral e anteroposterior de cada uma das patas posteriores ao nível do ventre do gastrocnémios.

Os músculos removidos foram divididos em dois grupos: um primeiro para análise histológicas e um segundo grupo para estudos moleculares. Os músculos foram armazenados a -80° para análises futuras.

Análise histológica

Tal como acima descrito foi realizada uma análise histológica dos músculos extraídos. Foi realizada uma coloração de hemotoxilina-eosina (HE) para verificar a integridade dos músculos, possíveis alterações (a ser confirmadas por outras técnicas) e também como controlo para a técnica de Imunohistoquímica.

Para estas técnicas foram cortadas secções transversais de músculo congelado com uma espessura de 10 µm num criostato Leica CM 1850 UV a -25°C e colhidos numa lâmina de vidro, 24°—32 mm.

Análise por Imunohistoquímica

Os cortes de músculo foram fixados com acetona a -20°C durante 10 minutos. Seguidamente, as amostras foram rehidratadas com um tampão salino (PBS) a 10% duas vezes durante 5 minutos. Após delimitação das amostras com uma caneta hidrofóbica, procedeu-se à permeabilização do tecido com PBS-0,25% e Triton X-100 por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura húmida. Após a permeabilização efectuou-se o bloqueio com soro de Cabra a 10% em 1% de albumina sérica bovina (BSA) durante 30 minutos numa câmara escura húmida. De seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos primários em PBS-1% BSA numa câmara escura húmida (4°C) em regime overnight. Dos 4 anticorpos primários utilizados, foi necessário adicionar a Pax-7 e Myf-5 anticorpo secundário ao passo que Laminina e C-Met já incluíam fluoróforo: Pax-7 (PAX7) (sc-81648 Mouse Monoclonal – Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:500; Myf-5 (C-20; sc-302 Rabbit Polyclonal – Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:500; Lamin A/C [4C11; Mouse mAb (Alexa Fluor® 488 Conjugate): #8617 Cell Signaling] na diluição 1:200; Phospho-Met [(Tyr1234/1235) (D26) XP Rabbit mAb (Alexa Fluor® 594 Conjugate): #8564 Cell Signaling] na diluição 1:200.

No dia seguinte procedeu-se a três lavagens com PBS de 10 minutos cada à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (1:500) em PBS-1% BSA numa câmara escura revestida a alumínio durante 60 minutos. Foi igualmente incubadas amostras apenas com anticorpo secundário como controlo negativo.: Goat Antimouse (1:500) - Alexa Fluor® 488 e Goat AntiRabbit (1:500) – Alexa Fluor® 568

Terminada a incubação, procedeu-se a 3 lavagens em PBS durante 10 minutos à temperatura ambiente. De seguida, as amostras foram incubadas com DAPI (1:5000)

em PBS durante 10 minutos à temperatura ambiente e em câmara escura. Seguiram-se 3 lavagens em PBS durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Para terminar, foi adicionado o meio de montagem *GlycerGel* previamente aquecido às amostras seguido da lamela. Quando este solidificou, colocou-se verniz em redor da lamela a fim de esta manter-se fixa.

Análise das imagens

As amostras foram analisadas num microscópio de fluorescência *Zeiss Axio Observer*. Z1, com recurso a uma objetiva Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 e análise de imagem AxioCam MR R3. O sistema microscópio foi manuseado através do Software *Zen 2.3* (Blue Edition).

Análise Estatística

A normalidade das amostras foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk. Para comparar os diferentes grupos foi utilizado o teste t-student.

A análise estatística foi realizada através do programa informático Prism7 (GraphPad®)

Resultados

De forma a alcançar os objetivos propostos, era necessário averiguar se imobilização da pata traseira (direita) induzia atrofia, não apenas a nível molecular mas também a nível macroscópico. Desta forma, os músculos foram pesados e a pata medida.

A massa de músculo da pata imobilizada (em valor absoluto ou corrigida pela massa corporal) demonstrou que a imobilização induziu atrofia muscular. Porém, as condições da imobilização condicionaram a atrofia resultante. Como podemos observar pela leitura do gráfico 1 a imobilização, por si só, induziu atrofia muscular ($p \leq 0,05$). No entanto, a atrofia foi mais acentuada no grupo de animais que tinham previamente feito quatro semanas de exercício aeróbio ($p \leq 0,01$). Este tipo de exercício não induz hipertrofia como se pode também observar no gráfico 1.

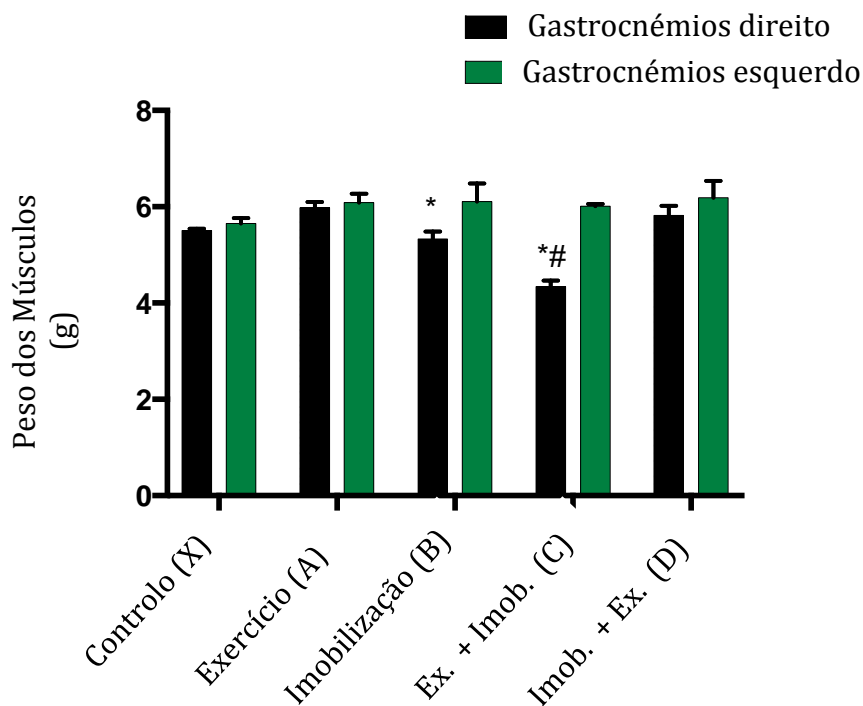


Gráfico 1: O Gráfico apresenta a massa dos músculos gastrocnémios direito e esquerdo dos vários grupos em estudo. Cada grupo apresenta um $n = 4$. As barras representam a média dos valores individuais e os traços verticais o desvio padrão. * $p \leq 0,05$ relativamente ao controlo; *# $p \leq 0,01$ relativamente ao grupo com imobilização e ao músculo contralateral.

Porém, quando o exercício foi feito após a imobilização o tamanho do músculo, não diferiu significativamente do grupo controle.

A nível microscópico, através da coloração histológica com hematoxilina-eosina foi possível identificar padrões característicos nos vários grupos em estudo. O padrão normal, visível na figura 2 mostra-se alterado em todos os grupos em estudo.

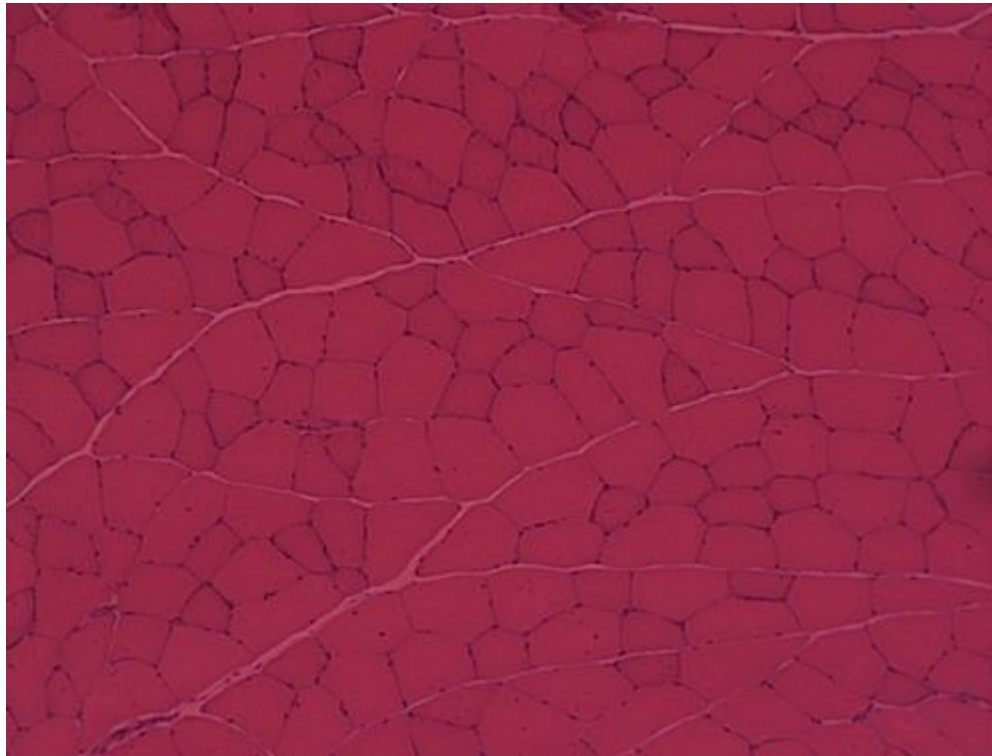


Figura 2: Imagem de um músculo normal com o padrão característico das fibras musculares. A coloração foi feita com Hematoxilina-eosina (HE) podendo identificar-se os núcleos (azuis) de cada uma das células. Ampliação x 100

Os animais que apenas realizaram exercício físico (A), apresentam um padrão típico da adaptação ao exercício, células mais pequenas com núcleo central sugestivo de fibras novas como consequência do padrão de mudança na tipologia das fibras.

Os músculos dos animais com atrofia por imobilização (B) apresentam agregados de células inflamatórias, fibrose, grande espessamento do perimísio e células em apoptose. Os animais que praticaram exercício seguido de imobilização (C) apresentam infiltrado de células inflamatórias, um espessamento ligeiro do perimísio e células musculares pequenas com núcleo central (células novas). No caso dos animais

que foram submetidos a imobilização seguida de exercício físico (D), o padrão é semelhante ao dos animais só submetidos a imobilização, mas no entanto sem a presença de fibrose.

Estas alterações parecem estar relacionadas com o comportamento das células satélite. Neste trabalho foram usados marcadores que refletem os vários estágios das células satélite no processo de miogénese, podendo ser observados na figura 4, 5 e 6. Na figura 3 apresentamos uma marcação por laminina. O Pax-7 reflete a ativação das células satélite, o Myf-5 a sua proliferação/diferenciação e o c-met a migração, regeneração e proliferação das referidas células.

Através do gráfico 2 podemos verificar que o número de células com marcação (+) para o Pax-7 é tendencialmente maior no grupo de animais que fizeram apenas exercício (A) mas com uma expressão (+) significativamente maior no grupo com imobilização (B) em comparação com o grupo controlo (X) ($p \leq 0,05$). Porém, no grupo B, o número de células com marcação positiva para Myf-5 e c-met é menor que o grupo A. Nos grupos com exercício e imobilização antes ou após (C e D) a positividade de células para pax-7 e Myf-5 não difere do grupo controlo (X), no entanto há um considerável número de células marcadas com c-met contrariamente ao grupo controlo que não tem marcação para este anticorpo.

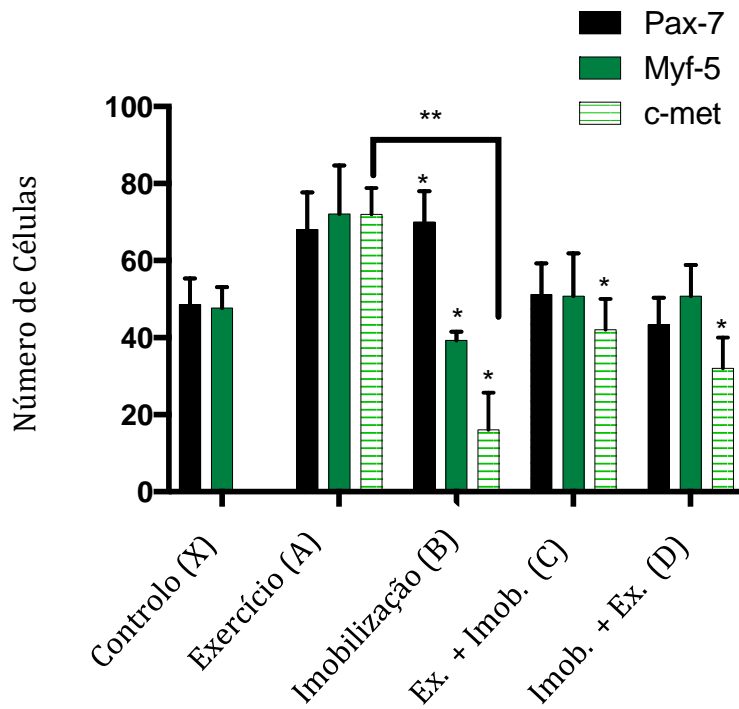


Gráfico 2: Marcação das células satélite com Pax7, Myf-5 e c-met numa área fixa de tecido muscular do músculo gastrocnemios direito. As barras representam médias e os traços verticais o desvio padrão, e em que cada amostra foi quantificada em triplicado. * $p \leq 0,05$ em relação ao controlo. ** $p \leq 0,05$ entre o grupo com exercício e o grupo com imobilização

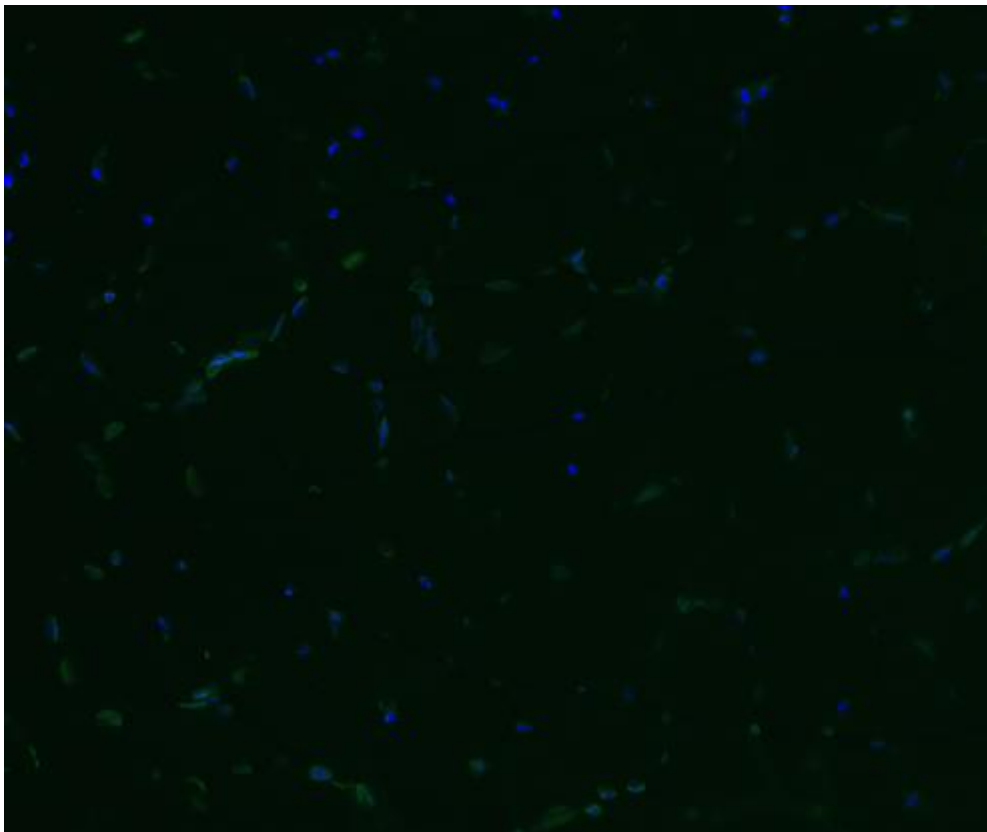


Figura 3: Marcação por Laminina

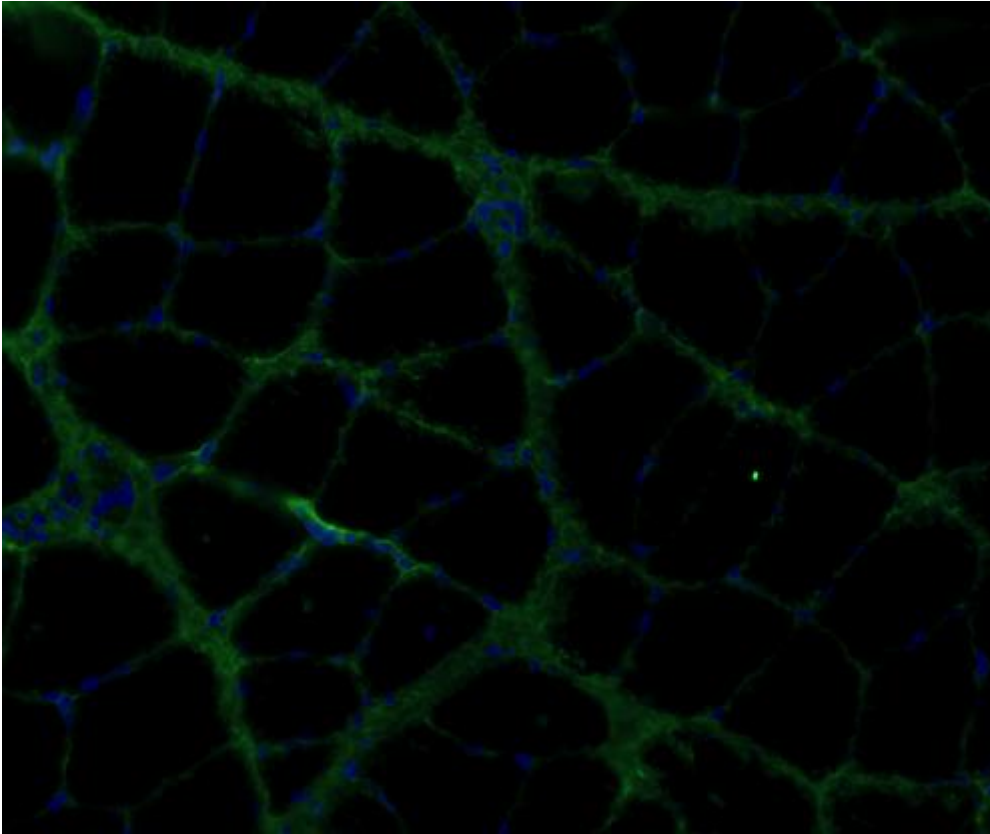


Figura 4: Marcação por Pax-7

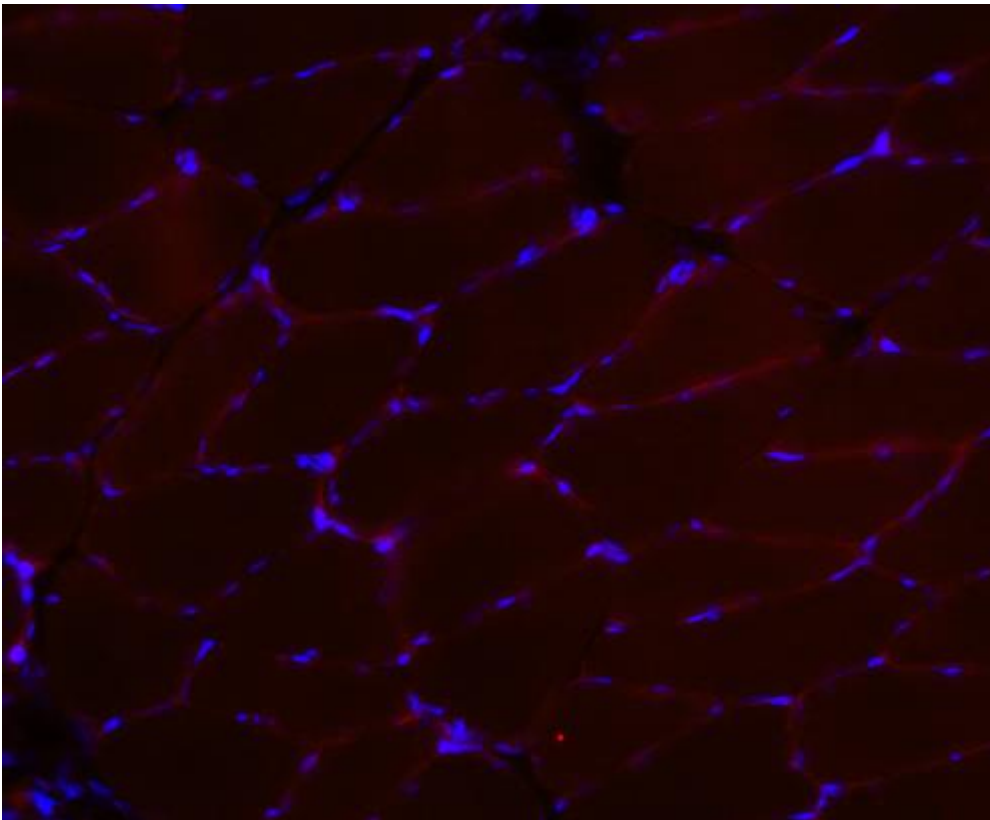


Figura 5: Marcação por Myf-5

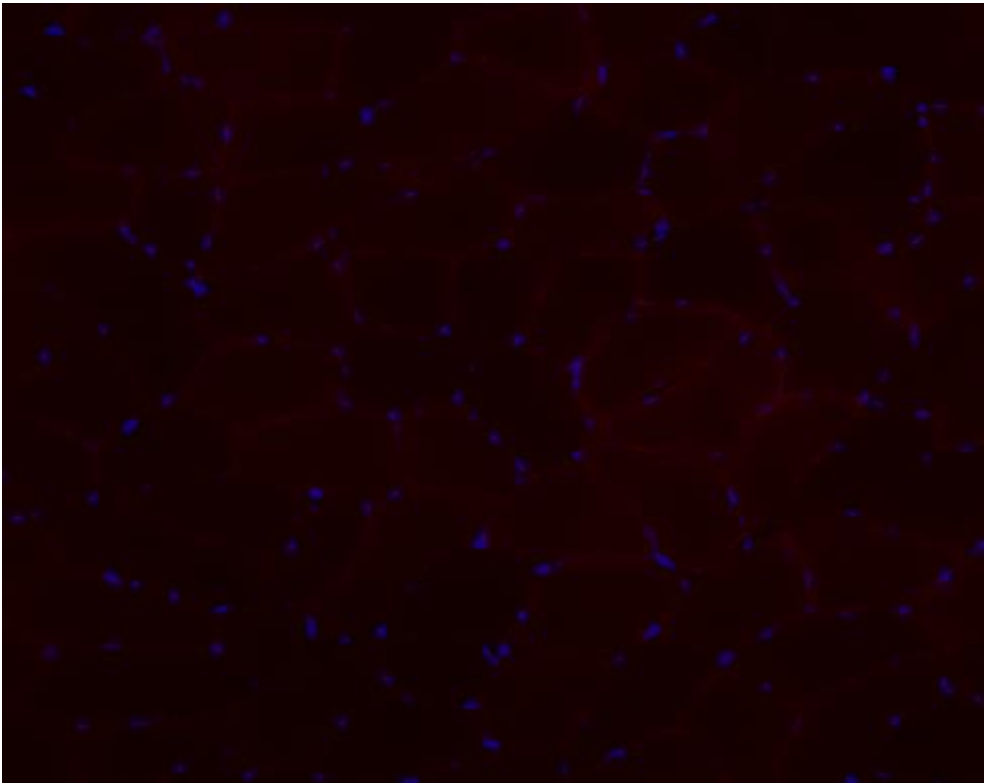


Figura 6: Marcação por c-met

Discussão

O conceito de adaptação traduz uma mudança de comportamento em resposta a uma alteração do meio ambiente. A adaptação no contexto do músculo esquelético, traduz uma alteração na sua estrutura e função, em resposta a estímulos como por exemplo, o exercício físico, a imobilização e o trauma. A capacidade para o músculo responder a estes estímulos, baseia-se na sua capacidade regenerativa, devido à presença de células miogénicas indiferenciadas, conhecidas como células satélite (Otto et al., 2009). De forma a estudar o efeito da imobilização e do exercício físico na activação e diferenciação das células satélite miogénicas foi usado um modelo animal sujeito a imobilização da pata traseira para indução de atrofia muscular com e sem exercício físico. O modelo de imobilização utilizado simula situações do dia-a-dia, em que é necessária a realização de uma imobilização gessada. Foi escolhido, dado não ter sido possível manter uma imobilização gessada no membro dos animais num período superior a 6 horas, dado que a retiravam com facilidade. Num contexto de imobilização a vulnerabilidade do músculo à atrofia depende do tipo de fibra e do grau de contração imposto pela posição de imobilização. Sabe-se que nos músculos de contração lenta a atrofia tende a ocorrer primeiro que nos músculos de contração rápida e que os músculos em posição de encurtamento têm uma maior redução da função em comparação com os não encurtados (Cho et al., 2016) . No nosso trabalho utilizamos o músculo gastrocnémios, dada a experiência do grupo no seu manuseamento. O membro foi imobilizado em extensão, sem encurtamento das fibras musculares. Desta forma, procurou-se diminuir o stress dos animais.

Neste trabalho verificou-se que a imobilização induziu atrofia muscular, dada a perda de massa de músculo da pata imobilizada. Definiu-se um período de imobilização de uma semana. Em idosos, um período de imobilização de 5 dias, leva a uma perda de 1,5% da área de secção transversal do quadríceps (Wall et al., 2013). No grupo imobilização (B) a imobilização, por si só, induziu atrofia muscular ($p \leq 0,05$). No entanto, a atrofia foi mais acentuada no grupo de animais que tinham previamente feito quatro semanas de exercício aeróbio ($p \leq 0,01$). O exercício físico é um modulador primário da plasticidade muscular e ativa diferentes vias de sinalização que medeiam o desenvolvimento e a adaptação do músculo esquelético. Sabemos que o exercício físico aeróbio provoca alterações no tipo de fibras musculares, principalmente nas tipo II, promovendo a transformação de fibras tipo IIb para IIa, resultando num músculo mais oxidativo (Yan et al., 2011) e com mais capacidades regenerativas, traduzidas por um aumento das células satélite, mitocôndrias e capilares (Qaisar et al., 2016). O exercício físico aeróbio permite limitar o stress oxidativo durante o processo atrofico, através de um aumento dos sistemas antioxidantes, e da alteração do fenótipo das mitocôndrias, de forma a resistirem melhor ao stress oxidativo. Paradoxalmente o exercício físico aumenta o stress oxidativo de forma transitória no músculo esquelético. Esta resposta serve de estímulo para a formação de antioxidantes endógenos (Wiggs, 2015). No caso de atletas sabe-se que após a imobilização ocorre uma grande perda de massa muscular, dependendo do tempo de imobilização (Milsom et al., 2014). Como podemos observar pela leitura do gráfico 1 a atrofia foi mais acentuada no grupo de animais que tinham previamente feito quatro semanas de exercício aeróbio ($p \leq 0,01$). Porém, quando o exercício foi feito após a imobilização o peso do músculo, não diferiu significativamente do grupo controlo. Após a atrofia

muscular, o exercício físico permitiu a regeneração muscular (Hanson et al., 2010, Itoh et al., 2014, Cornachione et al., 2014).

Relativamente aos resultados da análise histológica verificou-se que nos animais que praticaram exercício físico (A) ou exercício físico seguido de imobilização (C) haviam células pequenas com núcleo central, tradutoras da regeneração muscular. Como já referido anteriormente, exercício físico aeróbio provoca uma resposta inflamatória transitória, que terá uma influência citoprotetora, essencial à regeneração celular (Wiggs, 2015), traduzida pelo aumento das células satélite (Qaisar et al., 2016). No caso dos animais que foram submetidos a imobilização seguida de exercício físico, o padrão é semelhante ao dos animais só submetidos a imobilização, no entanto sem a presença de fibrose. Após o processo de atrofia muscular, o exercício físico estimula a regeneração celular, mas antes tem de ocorrer morte celular (Laumonier e Menetrey, 2016). Estas alterações parecem estar relacionadas com o comportamento das células satélite. Desde a sua descoberta (Mauro, 1961), as células satélite têm sido consideradas a principal fonte de novos mionúcleos nas células musculares. No músculo adulto, as células satélite tipicamente residem num estado de quiescência. No entanto, sob estimulação, são ativadas, proliferam e diferenciam-se. Este programa miogénico, é coordenado por fatores de transcrição, designados por fatores de regulação Miogénica. Inicialmente, as células satélite apresentam-se no estado de quiescência (fase G0 do ciclo celular) e expressam o Pax-7, mas não o MyoD ou a Miogenina. Fatores extrínsecos como o trauma ou o exercício, podem ativar as células satélite, fazendo com que entrem no ciclo celular. Inicia-se o processo de proliferação celular, com expressão de MyoD e Myf-5. Após a proliferação, as células satélite podem seguir um processo de auto-renovação, contribuindo para a manutenção das reservas das células satélite, ou diferenciando-se em mioblastos adultos. O processo de diferenciação, inicia-se com a regulação negativa do Pax-7. De seguida a fusão e a

diferenciação terminal relaciona-se com a expressão da Miogenina e do MyoD (Tierney e Sacco, 2016, Fu et al., 2015). Após a lesão, as células satélite são ativadas, proliferam e migram como mioblastos para o local da lesão onde se tornam miócitos e se fundem para formar novo músculo. O processo de migração dos mioblastos ainda permanece pouco conhecido. Sabe-se que o c-met, um receptor tirosina quinase é ativado pelo fator de crescimento dos hepatócitos. É expresso nas células satélite adultas quiescentes, durante a ativação mioblástica e a diferenciação dos miócitos, sendo regulado de forma negativa, nos novos miotúbulos (Wozniak et al., 2005) (Tatsumi et al., 1998, Fu et al., 2015). Trata-se de um receptor com um papel importante na regeneração muscular após lesão aguda (Webster and Fan, 2013). Neste trabalho, verificou-se que o número de células com marcação (+) para o Pax-7 é tendencialmente maior no grupo de animais que fizeram apenas exercício (A) mas com uma expressão (+) significativamente maior no grupo com imobilização (B) em comparação com o grupo controlo (X) ($p \leq 0,05$). O processo inflamatório desencadeado pelo exercício físico leva da ativação das células satélite (Snijders et al., 2015). No caso do grupo B, o aumento da expressão (+) do Pax-7 pode estar relacionado com o processo inflamatório. Sabe-se que em ratos, ocorre uma diminuição do número de células satélite com a imobilização (Kujawa et al., 2005), no entanto, esta é dependente do tempo de imobilização (Ferreira et al., 2006). Desta forma, a intensidade e a duração do processo atrófico são importantes para a interpretação destes resultados. A literatura mais recente indica que há uma diminuição do número de células satélite em animais, enquanto que nos humanos esse número se mantém estável ou até aumenta, a não ser que o ambiente atrófico seja particularmente severo (Verdijk et al., 2012, Suetta et al., 2013). No grupo B, o número de células com marcação positiva para Myf-5 e c-met é menor que no grupo A. Este resultado deve-se ao fato do exercício físico promover a proliferação das células

satélites e a regeneração muscular (Wiggs, 2015). No caso do grupo B, num ambiente atrófico, não ocorre proliferação e diferenciação das células satélite. Nos grupos com exercício e imobilização antes ou após (C e D) a positividade de células para pax-7 e Myf-5 não difere do grupo controlo (X). O processo inflamatório criado pela prática do exercício físico leva a um aumento da ativação das células satélite, com aumento da apoptose das células musculares danificadas e síntese de novas fibras musculares. Os grupos C e D, apresentam um considerável número de células marcadas com c-met, o que demonstra a sua capacidade regenerativa. A ativação e a proliferação das células satélite são essenciais no processo de regeneração muscular. Em contexto de lesão muscular a ausência de células satélite faz com que o músculo esquelético perca a sua capacidade regenerativa (Sambasivan et al., 2011), pelo contrário o aumento de células satélite, por exemplo a partir da prática de exercício físico, permite a regeneração muscular, demonstrando a importância destas células neste processo.

Conclusão

Os resultados obtidos por este estudo piloto levam-nos a sugerir que:

- O processo de atrofia muscular conduz a uma diminuição da massa muscular;
- O pré-condicionamento com exercício físico em ratos imobilizados, conduz a um aumento da atrofia muscular;
- O pré-condicionamento com exercício físico em ratos imobilizados estimula a regeneração muscular;
- A prática de exercício físico após atrofia estimula a regeneração muscular;
- A prática de exercício físico conduz a um aumento da ativação das células satélite;
- A atrofia muscular conduz a um aumento da ativação das células satélite, devido ao processo inflamatório gerado, entanto não ocorre proliferação e diferenciação em novas fibras;

Tratou-se de um estudo piloto, em que se pretende encontrar linhas orientadoras para estudos com amostras maiores no futuro. A atrofia por imobilização é uma condição patológica muito frequente, debilitante, que se traduz em gastos avultados pela Sociedade anualmente. Este estudo constitui um primeiro passo para se entender melhor, através da nossa experiência, o papel das células satélite na atrofia muscular. Foi procurado também perceber o papel do exercício físico no processo de atrofia muscular por imobilização e na recuperação muscular pós-atrofia através da mobilização das células satélite. O objetivo futuro da continuação deste trabalho é clarificar estes mecanismos de forma a se oferecer às pessoas uma alternativa terapêutica não farmacológica para esta condição patológica.

Bibliografia

- ALKNER, B. A. & TESCH, P. A. 2004. Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol*, 93, 294-305.
- APPELL, H. J., FORSBERG, S. & HOLLMANN, W. 1988. Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neoformation. *Int J Sports Med*, 9, 297-9.
- ARNOLD, H. H. & BRAUN, T. 2000. Genetics of muscle determination and development. *Curr Top Dev Biol*, 48, 129-64.
- AULEHLA, A. & POURQUIE, O. 2010. Signaling gradients during paraxial mesoderm development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000869.
- BASHAN, N., KOVSAN, J., KACHKO, I., OVADIA, H. & RUDICH, A. 2009. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev*, 89, 27-71.
- BENTZINGER, C. F., WANG, Y. X. & RUDNICKI, M. A. 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- BICKEL, C. S., SLADE, J. M., HADDAD, F., ADAMS, G. R. & DUDLEY, G. A. 2003. Acute molecular responses of skeletal muscle to resistance exercise in able-bodied and spinal cord-injured subjects. *J Appl Physiol (1985)*, 94, 2255-62.
- BJORNSON, C. R., CHEUNG, T. H., LIU, L., TRIPATHI, P. V., STEEPER, K. M. & RANDO, T. A. 2012. Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells*, 30, 232-42.
- BODINE, S. C. 2013. Disuse-induced muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2200-8.
- BODINE, S. C., LATRES, E., BAUMHUETER, S., LAI, V. K., NUNEZ, L., CLARKE, B. A., POUYMIROU, W. T., PANARO, F. J., NA, E., DHARMARAJAN, K., PAN, Z. Q., VALENZUELA, D. M., DECHIARA, T. M., STITT, T. N., YANCOPOULOS, G. D. & GLASS, D. J. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294, 1704-8.
- BOONEN, K. J. & POST, M. J. 2008. The muscle stem cell niche: regulation of satellite cells during regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 14, 419-31.
- BRACK, A. S., CONBOY, I. M., CONBOY, M. J., SHEN, J. & RANDO, T. A. 2008. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*, 2, 50-9.
- BROOKS, N. E. & MYBURGH, K. H. 2014. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. *Front Physiol*, 5, 99.
- BROSKEY, N. T., GREGGIO, C., BOSS, A., BOUTANT, M., DWYER, A., SCHLUETER, L., HANS, D., GREMION, G., KREIS, R., BOESCH, C., CANTO, C. & AMATI, F. 2014. Skeletal muscle mitochondria in the elderly: effects of physical fitness and exercise training. *J Clin Endocrinol Metab*, 99, 1852-61.
- CAI, D., FRANTZ, J. D., TAWA, N. E., JR., MELENDEZ, P. A., OH, B. C., LIDOV, H. G., HASSELGREN, P. O., FRONTERA, W. R., LEE, J., GLASS, D. J. & SHOELSON, S. E. 2004. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, 119, 285-98.
- CARON, A. Z., DROUIN, G., DESROSIERS, J., TRENSZ, F. & GRENIER, G. 2009. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol (1985)*, 106, 2049-59.
- CHARGE, S. B. & RUDNICKI, M. A. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84, 209-38.
- CHARIFI, N., KADI, F., FEASSON, L. & DENIS, C. 2003. Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. *Muscle Nerve*, 28, 87-92.
- CHEUNG, T. H., QUACH, N. L., CHARVILLE, G. W., LIU, L., PARK, L., EDALATI, A., YOO, B., HOANG, P. & RANDO, T. A. 2012. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature*, 482, 524-8.

- CHO, S. H., KIM, J. H. & SONG, W. 2016. In Vivo Rodent Models of Skeletal Muscle Adaptation to Decreased Use. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 31, 31-7.
- COLLINS, C. A., OLSEN, I., ZAMMIT, P. S., HESLOP, L., PETRIE, A., PARTRIDGE, T. A. & MORGAN, J. E. 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 122, 289-301.
- CONBOY, I. M. & RANDO, T. A. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell*, 3, 397-409.
- CORNACHIONE, A. S., CACAO-BENEDINI, L. O., CHESCA, D. L., MARTINEZ, E. Z. & MATTIELLO-SVERZUT, A. C. 2014. Effects of eccentric exercise in rehabilitation of phasic and tonic muscles after leg immobilization in rats. *Acta Histochem*, 116, 1216-24.
- CORNELISON, D. D., OLWIN, B. B., RUDNICKI, M. A. & WOLD, B. J. 2000. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol*, 224, 122-37.
- COSTA, A., DALLOUL, H., HEGYESI, H., APOR, P., CSENDE, Z., RACZ, L., VACZI, M. & TIHANYI, J. 2007. Impact of repeated bouts of eccentric exercise on myogenic gene expression. *Eur J Appl Physiol*, 101, 427-36.
- CRIST, C. G., MONTARRAS, D. & BUCKINGHAM, M. 2012. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell*, 11, 118-26.
- CRUZ-JENTOFT, A. J., BAEYENS, J. P., BAUER, J. M., BOIRIE, Y., CEDERHOLM, T., LANDI, F., MARTIN, F. C., MICHEL, J. P., ROLLAND, Y., SCHNEIDER, S. M., TOPINKOVA, E., VANDEWOUDE, M., ZAMBONI, M. & EUROPEAN WORKING GROUP ON SARCOPENIA IN OLDER, P. 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, 39, 412-23.
- DAVIS, T. A. & FIOROTTO, M. L. 2009. Regulation of muscle growth in neonates. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12, 78-85.
- DREYER, H. C., BLANCO, C. E., SATTLER, F. R., SCHROEDER, E. T. & WISWELL, R. A. 2006. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve*, 33, 242-53.
- DUMONT, N. A., BENTZINGER, C. F., SINCENNES, M. C. & RUDNICKI, M. A. 2015a. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol*, 5, 1027-59.
- DUMONT, N. A., WANG, Y. X. & RUDNICKI, M. A. 2015b. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development*, 142, 1572-81.
- FANZANI, A., CONRAADS, V. M., PENNA, F. & MARTINET, W. 2012. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 3, 163-79.
- FERREIRA, R., NEUPARTH, M. J., ASCENSAO, A., MAGALHAES, J., VITORINO, R., DUARTE, J. A. & AMADO, F. 2006. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol*, 97, 340-6.
- FONTES-RIBEIRO, C. A., MARQUES, E., PEREIRA, F. C., SILVA, A. P. & MACEDO, T. R. 2011. May exercise prevent addiction? *Curr Neuropharmacol*, 9, 45-8.
- FRE, S., HUYGHE, M., MOURIKIS, P., ROBINE, S., LOUVARD, D. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435, 964-8.
- FRIMEL, T. N., KAPADIA, F., GAIDOSH, G. S., LI, Y., WALTER, G. A. & VANDENBORNE, K. 2005. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle Nerve*, 32, 672-4.
- FRONTERA, W. R., HUGHES, V. A., FIELDING, R. A., FIATARONE, M. A., EVANS, W. J. & ROUBENOFF, R. 2000. Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol (1985)*, 88, 1321-6.
- FRONTERA, W. R. & OCHALA, J. 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96, 183-95.
- FU, X., WANG, H. & HU, P. 2015. Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. *Cell Mol Life Sci*, 72, 1663-77.
- GARCIA-PRAT, L., SOUSA-VICTOR, P. & MUNOZ-CANOVES, P. 2013. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *FEBS J*, 280, 4051-62.

- GOPINATH, S. D., WEBB, A. E., BRUNET, A. & RANDO, T. A. 2014. FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal. *Stem Cell Reports*, 2, 414-26.
- HANSON, A. M., STODIECK, L. S., CANNON, C. M., SIMSKE, S. J. & FERGUSON, V. L. 2010. Seven days of muscle re-loading and voluntary wheel running following hindlimb suspension in mice restores running performance, muscle morphology and metrics of fatigue but not muscle strength. *J Muscle Res Cell Motil*, 31, 141-53.
- HITACHI, K. & TSUCHIDA, K. 2013. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front Physiol*, 4, 408.
- HOKAMA, J. Y., STREPPER, R. S. & HENRIKSEN, E. J. 1997. Voluntary exercise training enhances glucose transport in muscle stimulated by insulin-like growth factor I. *J Appl Physiol (1985)*, 82, 508-12.
- HUGHES, V. A., FRONTERA, W. R., WOOD, M., EVANS, W. J., DALLAL, G. E., ROUBENOFF, R. & FIATARONE SINGH, M. A. 2001. Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56, B209-17.
- ISHIKAWA, H. 1965. The Fine Structure of Myo-Tendon Junction in Some Mammalian Skeletal Muscles. *Arch Histol Jpn*, 25, 275-96.
- ITO, Y., HAYAKAWA, K., MORI, T., AGATA, N., INOUE-MIYAZU, M., MURAKAMI, T., SOKABE, M. & KAWAKAMI, K. 2014. Stand-up exercise training facilitates muscle recovery from disuse atrophy by stimulating myogenic satellite cell proliferation in mice. *Physiol Rep*, 2.
- JAGOE, R. T. & GOLDBERG, A. L. 2001. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 4, 183-90.
- JORGENSEN, L. & JACOBSEN, B. K. 2001. Changes in muscle mass, fat mass, and bone mineral content in the legs after stroke: a 1 year prospective study. *Bone*, 28, 655-9.
- KANG, J. S. & KRAUSS, R. S. 2010. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13, 243-8.
- KERN, H., BARBERI, L., LOFLER, S., SBARDELLA, S., BURGGRAF, S., FRUHMANN, H., CARRARO, U., MOSOLE, S., SARABON, N., VOGELAUER, M., MAYR, W., KRENN, M., CVECKA, J., ROMANELLO, V., PIETRANGELO, L., PROTASI, F., SANDRI, M., ZAMPIERI, S. & MUSARO, A. 2014. Electrical stimulation counteracts muscle decline in seniors. *Front Aging Neurosci*, 6, 189.
- KUANG, S., CHARGE, S. B., SEALE, P., HUH, M. & RUDNICKI, M. A. 2006. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol*, 172, 103-13.
- KUANG, S., KURODA, K., LE GRAND, F. & RUDNICKI, M. A. 2007. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 129, 999-1010.
- KUJAWA, M., BARAN, W. & JANKOWSKA-STEIFER, E. 2005. Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilized after soleus muscle denervation. *Exp Mol Pathol*, 78, 78-85.
- KURODA, K., TANI, S., TAMURA, K., MINOGUCHI, S., KUROOKA, H. & HONJO, T. 1999. Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem*, 274, 7238-44.
- LAUMONIER, T. & MENETREY, J. 2016. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop*, 3, 15.
- LE GRAND, F., JONES, A. E., SEALE, V., SCIME, A. & RUDNICKI, M. A. 2009. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell*, 4, 535-47.
- LECKER, S. H., SOLOMON, V., MITCH, W. E. & GOLDBERG, A. L. 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, 129, 227S-237S.
- LEE, S. J., HUYNH, T. V., LEE, Y. S., SEBALD, S. M., WILCOX-ADELMAN, S. A., IWAMORI, N., LEPPER, C., MATZUK, M. M. & FAN, C. M. 2012. Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E2353-60.
- LIU, G., MAC GABHANN, F. & POPEL, A. S. 2012a. Effects of fiber type and size on the heterogeneity of oxygen distribution in exercising skeletal muscle. *PLoS One*, 7, e44375.

- LIU, W., WEN, Y., BI, P., LAI, X., LIU, X. S., LIU, X. & KUANG, S. 2012b. Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation. *Development*, 139, 2857-65.
- MARCOTTE, G. R., WEST, D. W. & BAAR, K. 2015. The molecular basis for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *Calcif Tissue Int*, 96, 196-210.
- MAURO, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9, 493-5.
- MCGEACHIE, J. K. 1989. Sustained cell proliferation in denervated skeletal muscle of mice. *Cell Tissue Res*, 257, 455-7.
- MIDRIO, M. 2006. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol*, 98, 1-21.
- MILSOM, J., BARREIRA, P., BURGESS, D. J., IQBAL, Z. & MORTON, J. P. 2014. Case study: Muscle atrophy and hypertrophy in a premier league soccer player during rehabilitation from ACL injury. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 24, 543-52.
- MOREY-HOLTON, E. R. & GLOBUS, R. K. 2002. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol (1985)*, 92, 1367-77.
- MOTOHASHI, N. & ASAKURA, A. 2014. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front Cell Dev Biol*, 2, 1.
- OATES, B. R., GLOVER, E. I., WEST, D. W., FRY, J. L., TARNOPOLSKY, M. A. & PHILLIPS, S. M. 2010. Low-volume resistance exercise attenuates the decline in strength and muscle mass associated with immobilization. *Muscle Nerve*, 42, 539-46.
- OLGUIN, H. C., YANG, Z., TAPSCOTT, S. J. & OLWIN, B. B. 2007. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol*, 177, 769-79.
- OTTO, A., COLLINS-HOOPER, H. & PATEL, K. 2009. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. *J Anat*, 215, 477-97.
- PIERRE, N., APPRIOU, Z., GRATAS-DELAMARCHE, A. & DERBRE, F. 2016. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radic Biol Med*, 98, 197-207.
- POWERS, S. K., SMUDER, A. J. & CRISWELL, D. S. 2011. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxid Redox Signal*, 15, 2519-28.
- QAISAR, R., BHASKARAN, S. & VAN REMMEN, H. 2016. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free Radic Biol Med*, 98, 56-67.
- RELAIX, F. & MARCELLE, C. 2009. Muscle stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 748-53.
- RELAIX, F. & ZAMMIT, P. S. 2012. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development*, 139, 2845-56.
- SAMBASIVAN, R. & TAJBAKSH, S. 2007. Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 870-82.
- SAMBASIVAN, R., YAO, R., KISSENFENNIG, A., VAN WITTENBERGHE, L., PALDI, A., GAYRAUD-MOREL, B., GUENOU, H., MALISSEN, B., TAJBAKSH, S. & GALY, A. 2011. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*, 138, 3647-56.
- SCADDEN, D. T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441, 1075-9.
- SCHIAFFINO, S., DYAR, K. A., CICILLOT, S., BLAAUW, B. & SANDRI, M. 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*, 280, 4294-314.
- SCHIAFFINO, S., GORZA, L., SARTORE, S., SAGGIN, L., AUSONI, S., VIANELLO, M., GUNDERSEN, K. & LOMO, T. 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil*, 10, 197-205.
- SCHIAFFINO, S. & REGGIANI, C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91, 1447-531.
- SCHMALBRUCH, H. 1976. The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue Cell*, 8, 673-92.
- SCHUSTER-GOSSLER, K., CORDES, R. & GOSSLER, A. 2007. Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 537-42.

- SEALE, P., SABOURIN, L. A., GIRGIS-GABARDO, A., MANSOURI, A., GRUSS, P. & RUDNICKI, M. A. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102, 777-86.
- SHEA, K. L., XIANG, W., LAPORTA, V. S., LICHT, J. D., KELLER, C., BASSON, M. A. & BRACK, A. S. 2010. Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. *Cell Stem Cell*, 6, 117-29.
- SMILES, W. J., HAWLEY, J. A. & CAMERA, D. M. 2016. Effects of skeletal muscle energy availability on protein turnover responses to exercise. *J Exp Biol*, 219, 214-25.
- SNIJDERS, T., NEDERVEEN, J. P., MCKAY, B. R., JOANISSE, S., VERDIJK, L. B., VAN LOON, L. J. & PARISE, G. 2015. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front Physiol*, 6, 283.
- SNIJDERS, T., VERDIJK, L. B. & VAN LOON, L. J. 2009. The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res Rev*, 8, 328-38.
- SNIJDERS, T., WALL, B. T., DIRKS, M. L., SENDEN, J. M., HARTGENS, F., DOLMANS, J., LOSEN, M., VERDIJK, L. B. & VAN LOON, L. J. 2014. Muscle disuse atrophy is not accompanied by changes in skeletal muscle satellite cell content. *Clin Sci (Lond)*, 126, 557-66.
- STENHOLM, S., HARRIS, T. B., RANTANEN, T., VISSER, M., KRITCHEVSKY, S. B. & FERRUCCI, L. 2008. Sarcopenic obesity: definition, cause and consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 693-700.
- STEVENS, L., BASTIDE, B., HEDOU, J., CIENIEWSKI-BERNARD, C., MONTEL, V., COCHON, L., DUPONT, E. & MOUNIER, Y. 2013. Potential regulation of human muscle plasticity by MLC2 post-translational modifications during bed rest and countermeasures. *Arch Biochem Biophys*, 540, 125-32.
- SUETTA, C., FRANDBSEN, U., MACKAY, A. L., JENSEN, L., HVID, L. G., BAYER, M. L., PETERSSON, S. J., SCHRODER, H. D., ANDERSEN, J. L., AAGAARD, P., SCHJERLING, P. & KJAER, M. 2013. Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. *J Physiol*, 591, 3789-804.
- SVEEN, M. L., JEPPESEN, T. D., HAUERSLEV, S., KOBER, L., KRAG, T. O. & VISSING, J. 2008. Endurance training improves fitness and strength in patients with Becker muscular dystrophy. *Brain*, 131, 2824-31.
- TATSUMI, R., ANDERSON, J. E., NEVORET, C. J., HALEVY, O. & ALLEN, R. E. 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*, 194, 114-28.
- THERIAULT, M. E., PARE, M. E., LEMIRE, B. B., MALTAIS, F. & DEBIGARE, R. 2014. Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 15, 35.
- TIERNEY, M. T. & SACCO, A. 2016. Satellite Cell Heterogeneity in Skeletal Muscle Homeostasis. *Trends Cell Biol*, 26, 434-44.
- TRAPPE, S., TRAPPE, T., GALLAGHER, P., HARBER, M., ALKNER, B. & TESCH, P. 2004. Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *J Physiol*, 557, 501-13.
- TRAPPE, S. W., TRAPPE, T. A., LEE, G. A., WIDRICK, J. J., COSTILL, D. L. & FITTS, R. H. 2001. Comparison of a space shuttle flight (STS-78) and bed rest on human muscle function. *J Appl Physiol (1985)*, 91, 57-64.
- VALERO, M. C., HUNTSMAN, H. D., LIU, J., ZOU, K. & BOPPART, M. D. 2012. Eccentric exercise facilitates mesenchymal stem cell appearance in skeletal muscle. *PLoS One*, 7, e29760.
- VERDIJK, L. B., DIRKS, M. L., SNIJDERS, T., PROMPERS, J. J., BEELEN, M., JONKERS, R. A., THIJSSSEN, D. H., HOPMAN, M. T. & VAN LOON, L. J. 2012. Reduced satellite cell numbers with spinal cord injury and aging in humans. *Med Sci Sports Exerc*, 44, 2322-30.
- VERDIJK, L. B., GLEESON, B. G., JONKERS, R. A., MEIJER, K., SAVELBERG, H. H., DENDALE, P. & VAN LOON, L. J. 2009. Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64, 332-9.
- VISSER, M., KRITCHEVSKY, S. B., GOODPASTER, B. H., NEWMAN, A. B., NEVITT, M., STAMM, E. & HARRIS, T. B. 2002. Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the health, aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc*, 50, 897-904.

- VON MALTZAHN, J., CHANG, N. C., BENTZINGER, C. F. & RUDNICKI, M. A. 2012. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol*, 22, 602-9.
- WALL, B. T., DIRKS, M. L. & VAN LOON, L. J. 2013. Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. *Ageing Res Rev*, 12, 898-906.
- WANG, Q. & MCPHERRON, A. C. 2012. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. *J Physiol*, 590, 2151-65.
- WEBSTER, M. T. & FAN, C. M. 2013. c-MET regulates myoblast motility and myocyte fusion during adult skeletal muscle regeneration. *PLoS One*, 8, e81757.
- WEISLEDER, N., BROTTTO, M., KOMAZAKI, S., PAN, Z., ZHAO, X., NOSEK, T., PARNES, J., TAKESHIMA, H. & MA, J. 2006. Muscle aging is associated with compromised Ca²⁺ spark signaling and segregated intracellular Ca²⁺ release. *J Cell Biol*, 174, 639-45.
- WIGGS, M. P. 2015. Can endurance exercise preconditioning prevent disuse muscle atrophy? *Front Physiol*, 6, 63.
- WOZNIAK, A. C., KONG, J., BOCK, E., PILIPOWICZ, O. & ANDERSON, J. E. 2005. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle Nerve*, 31, 283-300.
- WRAY, C. J., MAMMEN, J. M., HERSHKO, D. D. & HASSELGREN, P. O. 2003. Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 698-705.
- XU, J., HWANG, J. C., LEES, H. A., WOHLGEMUTH, S. E., KNUTSON, M. D., JUDGE, A. R., DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E., MARZETTI, E. & LEEUWENBURGH, C. 2012. Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. *Exp Gerontol*, 47, 100-8.
- YAN, Z., OKUTSU, M., AKHTAR, Y. N. & LIRA, V. A. 2011. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 110, 264-74.
- YIN, H., PRICE, F. & RUDNICKI, M. A. 2013. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*, 93, 23-67.
- ZAMMIT, P. S., GOLDING, J. P., NAGATA, Y., HUDON, V., PARTRIDGE, T. A. & BEAUCHAMP, J. R. 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol*, 166, 347-57.
- ZAMMIT, P. S., RELAIX, F., NAGATA, Y., RUIZ, A. P., COLLINS, C. A., PARTRIDGE, T. A. & BEAUCHAMP, J. R. 2006. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci*, 119, 1824-32.

