

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DA MOLÉCULA
ORIENTADORA POR REPULSÃO A (RGMA) NA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA ATROFIADA POR DENERVAÇÃO

Samira Inácia Santos e Silva

Belo Horizonte, julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DA MOLÉCULA
ORIENTADORA POR REPULSÃO A (RGMA) NA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA ATROFIADA POR DENERVAÇÃO

Samira Inácia Santos e Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof. Dra. Érika Cristina Jorge

Co-orientadora: Prof. Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva

Belo Horizonte, julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todas as pessoas que fizeram parte desta minha jornada e que me ajudaram de alguma forma, independentemente de qual fosse, direta ou indiretamente ligada ao mestrado, a concluir mais esta etapa da minha vida.

Meus pais, William e Eliana, que mesmo não sabendo muito bem o que eu estava fazendo e não entendendo a minha rotina, estiveram ao meu lado, me incentivando a não desistir, comemorando minhas lágrimas de alegria quando algum experimento dava certo ou as enxugando quando algo saía dos eixos. Foram eles que estavam ali, segurando a expressão de “nossa, muito legal o seu projeto; estamos estendendo tudo” quando eu os pedia pra assistirem as minhas apresentações antes mesmo delas serem mostradas para o laboratório ou para os meus avaliadores. Foram eles que me lembravam de comer direito e de ter uma boa noite de sono, porque às vezes eu precisava de todos os minutos do dia pra completar alguma tarefa. Sem eles eu não teria chegado aonde cheguei, já que esse apoio e investimento vêm acontecendo desde quando eu era muito pequena. A eles o meu muito obrigado, a minha eterna gratidão e a mais essa etapa concluída.

Meus amigos de graduação e colégio, Luiza, Luara, Thiago, Nana, Clovis, Manu e Ana, os quais me distraíram do intenso trabalho científico e me ajudaram a renovar as energias para mais um dia de experimento.

Meus amigos de laboratório, que me fazem ter orgulho de ser LABODE todos os dias, e aos agregados que se tornaram parte da família, contribuindo para uma rotina mais produtiva e agradável. Em especial Íria, que estava sempre disposta a ajudar, seja com conselhos, com experimentos ou até mesmo com a verdade nua e crua. Foi ela quem ouviu meus desabafos, me ajudou a interpretar acontecimentos e resultados, entendeu o meu silêncio e me incitou a sempre tentar ser e dar o meu melhor. Igor, de quem eu me

aproximei muito no último ano e que me mostrou ser um grande amigo. Foi ele quem me fez rir nos momentos mais esperados e inesperados, desenvolveu uma parceria muito forte para assuntos ligados aos projetos e ao laboratório como um todo, me ajudou em diversas situações, me acompanhou nos rituais semanais e me ensinou, sem mesmo saber, a ser uma pessoa mais humilde, disposta e dedicada. Rayan, que mesmo não trabalhando comigo tão próximo como na época do TCC, ainda se fez muito presente na minha vida e no meu projeto de mestrado. Sempre muito disposto a ajudar e muito solícito, trazia mais ânimo, disposição e alegria toda vez que chegava ao laboratório. Foi ele quem também contribuiu muito intelectualmente no meu projeto, sempre trazendo perguntas e ideias e nos fazendo pensar além do que foi proposto. Bruno, que me permitiu vivenciar muitas experiências e me proporcionou diversas oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Foi ele quem também ouviu os meus desabafos e que por diversas vezes segurou a minha barra, me motivando a continuar e me mostrando que eu sou melhor do que imagino.

Minha orientadora Erika, que me mostrou que para fazer ciência, principalmente no Brasil, precisa de muita paixão, brilho nos olhos e foco! Foi ela que me ensinou que não basta querer, é preciso fazer acontecer, dar sangue, se dedicar, se organizar, planejar e, principalmente, amar aquilo que faz. Foi ela que reafirmou o fato de que sou eu quem está no controle da minha própria vida e das minhas ações e que se eu quiser alcançar o sucesso, tenho que fazer por onde, tenho que batalhar por isso. Minha co-orientadora Gerluza, que me mostrou um outro lado de se fazer ciência. Me ensinou que não basta fazermos pesquisas para nós mesmos. A ciência é de todos e é para todos.

Aos meus familiares, em especial minha avó Divina, a quem eu sou eternamente grata pelos sábios conselhos tanto quanto pelos momentos de

silêncio, nos quais apenas refletíamos sobre a vida, as atitudes, as pessoas, as decisões e os acontecimentos, e minha prima Grace, minha inspiração e exemplo de dedicação, esforço e amor pelo trabalho.

A todos vocês, meu muito obrigado mais uma vez. Não foi fácil chegar até aqui e, se cheguei, saibam que vocês contribuíram muito durante o processo. Esse mérito não é só meu, ele é de todos nós!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da via de sinalização dos processos de atrofia e hipertrofia muscular.....	17
Figura 2. Esquema da via ubiquitina-proteossoma.....	18
Figura 3. Processamento da molécula de RGMA.....	23
Figura 4. Nevo isquiático exposto após retração da fáscia e dos músculos bíceps femoral, gastrocnêmico e tibial cranial.....	29
Figura 5. Redução da largura da perna direita em comparação com a perna esquerda de um camundongo que sofreu axotomia do nervo isquiático.....	38
Figura 6. Músculos gastrocnêmios retirados 14 dias após a cirurgia de denervação.....	38
Figura 7. Histologia dos músculos gastrocnêmios aos 14 dias após a cirurgia de denervação.....	38
Figura 8. Análise da massa e tamanho das fibras do músculo gastrocnêmico da perna denervada e controle.....	39
Figura 9. Resultado de RT-PCRq para os atrogenes Atrogin-1 e MuRF-1.....	39
Figura 10. Nível de expressão relativa de RGMA no tecido muscular esquelético após 14 dias de denervação. Expressão relativa da análise temporal de RGMA nos períodos de 7 e 14 dias após a retirada de parte do nervo isquiático.....	41
Figura 11. <i>Western blot</i> para a proteína de RGMA.....	42
Figura 12. Padrão de expressão da porção de RGMA na musculatura denervada e controle.....	44
Figura 13. <i>Western blot</i> para BMP, Smad 1/5/8 e RohA.....	45

LISTA DE ABREVIACÕES

BLAST: *Basic Local Alignment Search*

BPM: Proteína Morfogenética Óssea

cDNA: DNA complementar

CEBIO: Centro de Bioterismo

cm: centímetro

DEPC: Dietil Pirocarbonato

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FoxO: *O-type Forkhead Transcription Factor*

h: horas

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

kg: quilogramas

MAFbx: *Muscle Atrophy F-box*

µg: micrograma

min: minuto

mg: miligrama

µL: micrograma

mL: mililitro

MuRF-1: *Muscle RING Finger 1*

NCBI: *National Center of Biotechnology Information*

pb: pares de bases

PBS: Tampão Fosfato-Salino

PFA: Paraformaldeído

RGMs: Moléculas Orientadoras por Repulsão

RNA: Ácido Ribonucleico

Rpm: rotação por minuto

RT-PCRq: Transcrição Reversa Quantitativa da Reação em Cadeia da Polimerase

TA: Temperatura Ambiente

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador β

vWF: Domínio de von Willebrand

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

°C: grau Celsius

ROBO: Roundabout receptor

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Musculatura esquelética.....	14
1.2. Plasticidade muscular.....	15
1.3. Atrofia muscular.....	16
1.4. Atrofia muscular por denervação.....	19
1.5. Moléculas orientadoras.....	20
1.6. Molécula Orientadora por Repulsão a (RGMa).....	21
1.7. Sinalização de RGMa.....	22
1.8. RGMa na musculatura esquelética.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Procedimento cirúrgico: axotomia do nervo isquiático.....	27
3.3. Comprovação da atrofia muscular após axotomia.....	28
3.3.1. Mensuração da área de secção transversal fibras musculares.....	28
3.3.2. RT-PCRq.....	29

3.3.3. Busca pelas sequências dos genes nos bancos de dados.....	29
3.3.4. Desenho dos iniciadores.....	29
3.3.5. Extração de RNA total.....	30
3.3.6. Preparação do cDNA (DNA complementar).....	31
3.3.7. RT-PCRq.....	32
3.4. Quantificação da expressão de RGMa na musculatura esquelética.....	32
3.4.1. RT-PCRq para RGMa.....	32
3.4.2. <i>Western blot</i> para RGMa.....	33
3.5. Padrão de expressão de RGMa na musculatura atrofica.....	34
3.5.1. Imunofluorescência nas fibras atroficas e controle.....	34
3.6. Quantificação da expressão de componentes da via BMP e neogenina na musculatura atrofica por <i>western blot</i>	35
3.7. Microscopia e documentação.....	35
3.8. Análises estatísticas.....	36
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Comprovação da atrofia muscular após axotomia.....	36
4.2. Caracterização da expressão da Molécula Orientadora por Repulsão a (RGMa) na musculatura atrofiada por denervação.....	38
4.2.1. Expressão de transcritos de <i>RGMa</i> na musculatura atrofiada por denervação.....	39
4.2.2. Nível de expressão de RGMa por <i>western blot</i>	40

4.2.3. Padrão de expressão de RGMa na musculatura atrofiada por denervação por imunofluorescência.....	41
4.3. Expressão de componentes da via de BMP e neogenina na musculatura atrofiada por denervação.....	42
5. DISCUSSÃO.....	44
5.1. Reprodução do modelo de atrofia muscular por denervação em camundongos.....	45
5.2. Expressão de RGMa na musculatura esquelética denervada.....	46
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

Diversos estímulos fisiológicos são capazes de causar modificações na musculatura esquelética, levando a um aumento ou uma perda de massa muscular. Várias moléculas estão envolvidas em ambos os processos e estudos recentes revelaram a presença de Molécula Orientadora por Repulsão a (RGMa), no sarcolema e sarcoplasma de células musculares esqueléticas, relacionando-a com a via de hipertrofia muscular. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel destas moléculas no processo de atrofia muscular e melhor compreender os seus mecanismos torna possível o desenvolvimento de terapias gênicas, para reverter ou evitar a atrofia muscular. O presente trabalho propôs investigar uma possível associação de RGMa com a regulação do tamanho das fibras musculares por meio do modelo de atrofia muscular por denervação. Foi possível observar um aumento da expressão de RNAm de RGMa, bem como da forma solúvel da molécula após denervação, sugerindo ativação de um mecanismo hipertrófico compensatório. A forma ancorada a membrana diminui. A expressão da molécula se restringe apenas a algumas fibras musculares atroficas, um padrão similar do encontrado para fibras musculares normais. A via de sinalização induzida pela forma solúvel de RGMa-BMP4/Smad1/5/8-RohA parece estar ativada durante a atrofia por denervação provavelmente para induzir a hipertrofia muscular e controlar a perda muscular. Nossos achados reforçam que RGMa pode estar de fato associado com a via de hipertrofia muscular.

Palavras chaves: atrofia muscular, RGMa, denervação, mecanismo compensatório.

ABSTRACT

Several physiological stimuli are capable of inducing modifications in the skeletal muscle, leading to an increase or loss of muscle mass. Many molecules are involved in both processes and recent studies have revealed the presence of the Repulsive Guidance Molecule a (RGMa) in the sarcolemma and sarcoplasm of skeletal muscle cells, relating it to the muscle hypertrophy pathway. However, little is known about the muscle atrophy process and understanding its mechanisms allows the development of gene therapies. The present work proposed to investigate a possible association of RGMa with the muscle fiber size regulation through the muscle atrophy by denervation model. It was possible to observe an increase in RGMa mRNA expression, as well as of the soluble form of the molecule after sciatic nerve axotomy, suggesting activation of a compensatory hypertrophic mechanism. The expression of the anchored form is downregulated. The expression of the molecule is restricted to only a few atrophic muscle fibers, in a similar pattern from that found for normal muscle fibers. The signaling pathway induced by the soluble form of RGMa-BMP4/Smad1/5/8-RohA appears to be activated during denervation, probably to induce muscle hypertrophy to control muscle loss. Our findings reinforce that RGMa may indeed be associated with the muscle hypertrophy pathway.

Key words: muscle atrophy, RGMa, denervation, compensatory mechanisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Musculatura esquelética

O músculo, tecido especializado em contrações, consiste em aproximadamente 34% da massa corporal total, sendo considerado o maior tecido corpóreo (Nie *et al.*, 2015). Sua classificação se dá de acordo com a presença de tecido conjuntivo entre as fibras musculares, sendo dividido entre muscular estriado, incluindo o esquelético e o cardíaco, os quais são voluntário e involuntário, respectivamente; e muscular liso, um músculo de contração involuntária (Collin, 2008).

Conectado aos ossos por meio de tendões, o músculo estriado esquelético, com mais de 6000 músculos individuais, é responsável por contrair-se para gerar força e movimento e participar ativamente do metabolismo corporal por meio da mobilização de glicose e da sensibilização à insulina (Stump *et al.*, 2006; Biressi *et al.*, 2007; Chal & Pourquié 2017). Além disso, é conhecido por sua notável habilidade de regeneração, a qual ocorre por meio de células-tronco musculares conhecidas como células satélites (Nie *et al.*, 2015). Em adição, tem sido sugerido que a musculatura esquelética em contração desempenha um papel como um órgão endócrino. Análises proteômicas do produto de secreção da musculatura esquelética revelaram um complexo de mais de 300 miocinas secretadas pelas células musculares (Chal & Pourquié 2017), tais como VGFA (Hoier & Hellsten, 2014), IL-6, miostatina, mionectina, irisina (Raschke & Eckel, 2013), IL-8 (Pedersen, 2011), IGF-1, FGF-2, IL-15, MMP2 (Hamrick, 2014), dentre outras.

O tecido muscular esquelético é composto por células cilíndricas, multinucleadas e alongadas de aproximadamente 30 cm, as quais contêm um grande número de filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis,

conhecidas como actina e miosina. Os músculos esqueléticos são delimitados por uma camada de tecido conjuntivo, o epimísio, do qual partem finos septos, compondo o perimísio. Esse, por sua vez, divide a musculatura em feixes de fibras, as quais são envolvidas individualmente pelo endomísio (Junqueira & Carneiro, 2008). Cada fibra muscular possui um diâmetro de 10 a 100 μm , sendo circundadas por um sarcolema, preenchidas por um sarcoplasma, que é composto por porções claras e escuras alternadas, e contendo miofibrilas embebidas (Collin, 2008).

1.2. Plasticidade muscular

A musculatura estriada esquelética é composta por uma mistura heterogênea de tipos de fibras que são classificadas de acordo com a capacidade oxidativa, tempo de contração, resistência à fadiga e produção de força (Tessier & Storey, 2016). Buller e colaboradores (1960) revelaram pela primeira vez um fenótipo completamente reversível de miofibras de contração rápida para lenta e vice-versa (Buller *et al.*, 1960). Essa plasticidade celular é uma grande vantagem que deu aos mamíferos a habilidade de adaptar o aparato muscular baseado no estímulo fisiológico. Entretanto, condições patológicas fazem com que essa condição promova adaptações deletérias a organismos saudáveis (Tessier & Storey, 2016).

Diversos estímulos fisiológicos são capazes de alterar o tamanho, a capacidade funcional e o metabolismo da musculatura esquelética (Sartori *et al.*, 2014). O desenvolvimento, a resposta à sobrecarga mecânica ou a estimulação hormonal anabólica (testosterona e agonistas B2-adrenérgicos), por exemplo, são estímulos que induzem uma produção de proteínas pelas células musculares esqueléticas, processo conhecido como **hipertrofia muscular**. Já o envelhecimento, a fome, o câncer, a AIDS, o diabetes, a perda

de *input* neural (como a denervação) e as doenças neuromotoras são fatores que induzem uma degradação de proteínas musculares, processo conhecido como **atrofia muscular** (Schiaffino *et al.*, 2013). A quantidade de massa muscular é, portanto, determinado pelo balanço entre síntese de proteínas novas – **hipertrofia**; e degradação de proteínas existentes – **atrofia**.

1.3. Atrofia muscular

Independentemente da causa, a atrofia é caracterizada pelas diminuições de conteúdo proteico, diâmetro da fibra muscular, produção de força e resistência à fadiga (Jackman & Kandarian, 2004; Dutt *et al.*, 2015).

A atrofia do músculo esquelético é debilitante, comprometendo a qualidade de vida e, levando em consideração que as opções de tratamento e de resultados clínicos positivos são reduzidos, há um aumento da morbidade e da mortalidade (Lynch, 2001; Zinna & Yarasheski, 2003). Enquanto que um número considerável de pesquisas tem sido propostas para a identificação de mecanismos moleculares que controlam a atrofia muscular esquelética, as vias de sinalizações envolvidas e os tratamentos efetivos que podem prevenir, atenuar ou reverter a atrofia muscular ainda não foram claramente definidos (Foletta *et al.*, 2011).

Compreender os mecanismos moleculares que determinam a quantidade de massa muscular é, portanto, a base para que seja possível desenvolver terapias gênicas ou celulares na tentativa de aumentar o tamanho das fibras musculares, a força e a massa muscular de pacientes com atrofia do tecido muscular.

Para tanto, a descoberta de duas proteínas E3 ubiquitinas ligases músculo específicas, MAFbx, (Atrogin-1) e MuRF-1, renovaram as expectativas para a identificação de alvos músculo específicos para manipulação terapêutica em

casos de atrofia (Foletta *et al.*, 2011). MAFbx, juntamente com MuRF-1 aumentam suas atividades transcricionais na maioria das condições indutoras de atrofia muscular, o que sugere que ambos são regulados por um mesmo conjunto de fatores transcricionais. FoxO (*O-type Forkhead Transcription Fator*), fatores transcricionais presentes na musculatura esquelética, mais especificamente FoxO1, FoxO3a e FoxO4, são responsáveis por regular a transcrição de ambas as E3 ligases (Bodine & Baehr, 2014) (Figura 1). Estudos com a super-expressão de FoxO3 na musculatura esquelética adulta e com camundongos transgênicos para FoxO1 mostraram uma redução significativa da massa muscular e fibras atroficas, enquanto que camundongos *knockdown* para FoxO1 bloqueiam a regulação positiva da expressão de MAFbx durante a atrofia, prevenindo a perda muscular (Kamei *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2004; 2007; Southgate *et al.*, 2007).

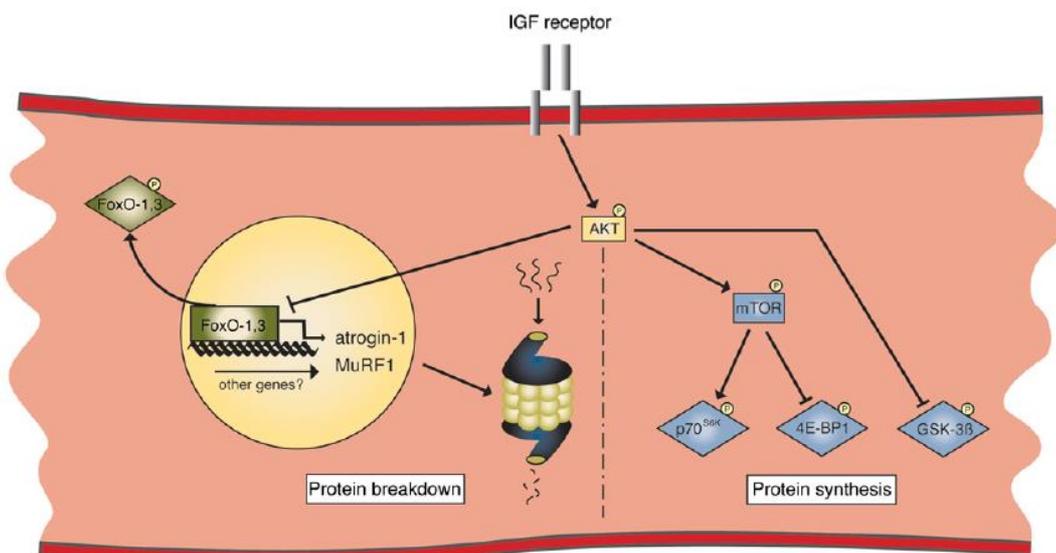


Figura 1. Esquema da via de sinalização dos processos de atrofia e hipertrofia muscular. Doucet *et al.*, 2007.

A ubiquitinação, processo que inclui uma série de reações envolvendo três classes de proteínas, E1, E2 e E3, começa com a ativação, pela E1, de ATP dependente de ubiquitina (Ub), a qual, uma vez ativada, é transferida para uma E2 (Bodine & Baehr, 2014). O processo final envolve a transferência da

ubiquitina de E2 para um substrato via E3. Estudos mostram que MAFbx e MuRF-1 estão envolvidos na ligação de substratos específicos para o processo de ubiquitinização e subsequente degradação de proteínas (Bodine & Baehr, 2014) (Figura 2).

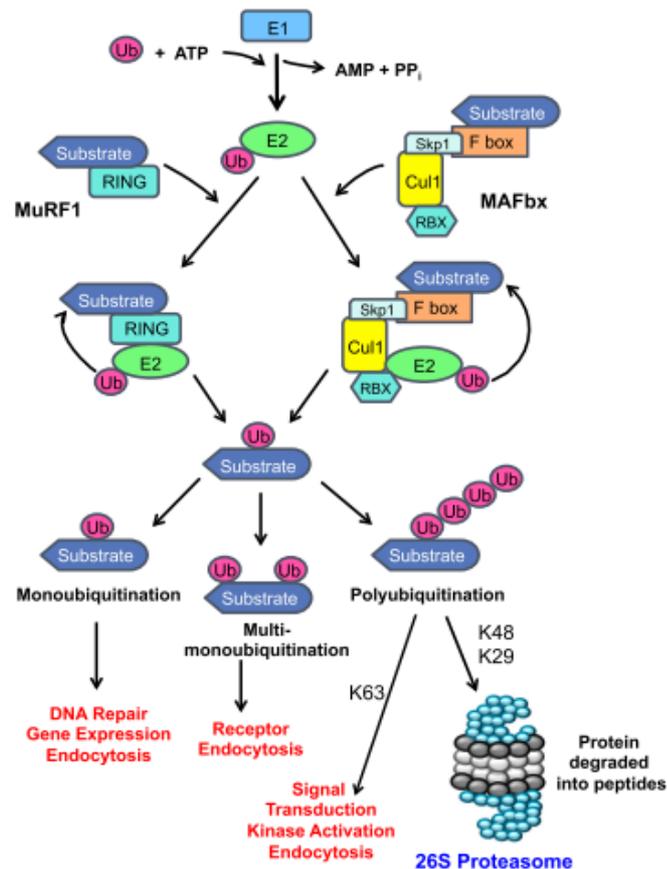


Figura 2. Esquema da via ubiquitina-proteossoma, evidenciando os atrogenes MuRF-1 e Atrogin-1, os quais aumentam sua expressão em casos de atrofia muscular. Bodine *et al.*, 2014.

Csib *et al.* (2010) e Tintignac *et al.* (2005) mostraram que MAFbx promove a degradação de MyoD, um fator transcricional muscular, e de eIF3-f, um importante ativador da síntese proteica. Além disso, Lokireddy *et al.* (2012) visualizaram a interação dessa proteína E3 com proteínas sarcoméricas, como miosina, desmina e vimentina; fatores transcpcionais; proteínas mitocondriais; e enzimas envolvidas nas vias de glicólise e gliconeogênese. Já MuRF-1 interage com e controla a meia-vida de proteínas musculares estruturais, como miosina de cadeia pesada (Clarke *et al.*, 2007; Fielitz *et al.*, 2007), troponina I

(Kedar *et al.*, 2004), actina (Polge *et al.*, 2011), miosina ligada à proteína C e miosinas de cadeia leve I e II (Cohen *et al.*, 2009).

1.4. Atrofia muscular por denervação

Uma rápida atrofia muscular ocorre quando a atividade neuromuscular é reduzida ou ausente. Durante esse estado catabólico, as proteínas musculares são rapidamente mobilizadas como fonte de aminoácidos para a gliconeogênese ou para a síntese de proteínas relacionadas ao estresse (Sacheck *et al.*, 2007). Estudos recentes mostram que a degradação de proteínas aumenta durante a atrofia por denervação, especialmente a quebra de proteínas miofibrilares. Mudanças similares na proteólise têm sido observadas na diminuição da carga ou na inativação de músculos inervados. Em músculos de roedores a maioria das proteínas é degradada por processos dependentes de ATP, requerendo ubiquitina e proteosoma (Furuno, *et al.*, 1990; Tischler, *et al.*, 1990; Haddad *et al.*, 2003; Sacheck *et al.*, 2007).

O controle da função do músculo esquelético pelo sistema nervoso tem sido alvo de interesse para muitos pesquisadores por mais de 100 anos (Baldwin *et al.*, 2013). O sistema nervoso controla o músculo esquelético por meio de dois mecanismos: (1) controle neuromuscular, no qual a contração muscular inicia-se com impulsos nervosos, gerados no córtex motor cerebral, que despolarizam o sarcolema, havendo um acoplamento eletromecânico e (2) controle neurotrópico, que é independente de atividade elétrica de neurônios motores, mas é dependente da liberação de fatores solúveis pelos terminais nervosos de neurônios motores nas junções neuromusculares (Cisterna *et al.*, 2014).

A perda do suprimento nervoso por uma fibra muscular também resulta em um quadro atrofico devido a um excesso de proteólise mediada por ubiquitina

por meio da via de proteossoma (Moresi *et al.*, 2010). Estudos de Macdonald *et al.* (2014) demonstraram, no entanto, que a atrofia causada por denervação não é induzida pela via Akt-FoxO3a-E3 ubiquitinas ligases e que não pode ser resgatada pela inibição da miostatina. Evidências mostraram que um aumento na ativação de Akt pode ser benéfico para o músculo durante os estágios iniciais da atrofia causada por denervação (Bodine *et al.*, 2001); mas Akt, mTOR e SGK não representam um alvo terapêutico promissor para indivíduos acometidos por uma denervação prolongada (Macdonald *et al.*, 2014). Assim, sugere-se que não há uma via universal responsável por todas as formas de atrofia e a denervação deve ser considerada como uma condição patogênica distinta (Macdonald *et al.*, 2014). Portanto, a atrofia muscular induzida por denervação ainda não tem seus mecanismos moleculares esclarecidos.

1.5. Moléculas orientadoras

A família de moléculas orientadoras foi primeiramente descrita no sistema nervoso como sendo responsável por determinar a formação e crescimento de axônios e dendritos em direção à região alvo (Chilton, 2006; Bonanomi & Paff, 2010). Até hoje são conhecidas cinco famílias de receptores/ligantes, sendo eles classificados como atrativos ou repulsivos. Efrinas e netrinas, por exemplo, são moléculas atrativas que atraem o crescimento axonal para determinada região por meio da polarização da atividade protrusiva (Bonami & Paff, 2010); enquanto que semaforinas, ROBO (Roundabout receptore) as moléculas orientadoras por repulsão (RGMs) repelem o crescimento dos axônios por meio da inibição da atividade protrusiva do cone de crescimento em suas extremidades (Monnier *et al.*, 2002; Gallo & Letouneau, 2004). Além de atuarem como pistas para o direcionamento do crescimento de axônios, as

moléculas orientadoras foram também identificadas como sendo responsáveis pela formação do padrão vascular (Adams & Eichmann, 2010).

As RGMs compõem uma família de moléculas orientadoras composta por RGMa, RGMb (DRAGON), RGMc (hemojuvelina, HJV, HFE2) e RGMd. As quatro RGMs expressas em vertebrados dividem, em média, 40-50% de identidade na primeira sequência de aminoácidos. Sua estrutura geral é composta por uma região N-terminal como peptídeo sinal, um domínio von Willebrand (vWF) tipo D parcial, o qual inclui regiões altamente conservadas e um sítio de clivagem catalítica, e uma âncora GPI C-terminal (Tian & Liu, 2013).

Dentre as funções já conhecidas, as RGMs foram identificadas no câncer, promovendo a proliferação celular de linhagens celulares para o câncer de cólon e acelerando o crescimento tumoral (Shi *et al.*, 2015); e em processos inflamatórios, inibindo a migração leucocitária e suprimindo a resposta inflamatória durante o desenvolvimento embrionário (Mirakaj *et al.*, 2011).

1.6. Molécula Orientadora por Repulsão a (RGMa)

Como molécula orientadora da axonogênese, os papéis biológicos exercidos por RGMa foram melhor caracterizados. Transcritos de RGMa podem ser detectados durante o desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de galinha, na maioria das vezes sobrepondo-se a RGMb (Jorge *et al.*, 2012). Em embriões de camundongos, RGMa começa a ser expressa no estágio E8.5 e perdura durante todo o restante do processo (Schmidtmer & Engelkamp, 2003), podendo ser identificada no mesencéfalo, hipocampo, parte do tronco cerebral e da medula espinhal (Brinks *et al.*, 2004; Niederkofler *et al.*, 2004; Oldekamp *et al.*, 2004). Foi ainda observado que a molécula está envolvida em processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência de neurônios (Matsunaga *et al.*, 2006). Estudos de Hata e colaboradores (2006)

revelaram que há um aumento de expressão de RGMA após injúria no sistema nervoso central, além de que, *in vitro*, a molécula se comporta como um inibidor da formação de neuritos cerebelares. Recentemente, RGMA vem sendo associada com esclerose múltipla, encefalomielite autoimune e doença de Parkinson (Nohra *et al.*, 2010, Demicheva *et al.*, 2015; Harada *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016).

No entanto, o estudo da expressão também revelou transcritos de RGMA em vários tecidos não-neurais, em estágios embrionários e adultos, sugerindo um papel mais amplo, além de molécula orientadora. Além dos tecidos neurais, RGMA foi detectada na cóclea, pulmão, membros em desenvolvimento (Oldekamp *et al.*, 2004), intestino (Metzger *et al.*, 2005), coração, fígado, pele, testículo, rins (Babitt *et al.*, 2005), em células mesenquimais ao redor do gânglio da raiz dorsal e nos somitos, estruturas embrionárias transitórias responsáveis pela origem da musculatura esquelética do tronco, derme e coluna vertebral e vértebras (Jorge *et al.*, 2012).

1.7. Sinalização de RGMA

No tecido nervoso, a molécula de RGMA é capaz de exercer seus efeitos ao se ligar ao receptor de neogenina (Kang *et al.*, 2004; Rajagopalan *et al.*, 2004). Neogenina é composta por quatro domínios semelhantes a imunoglobulinas e seis domínios de fibronectina tipo III em sua porção extracelular, um domínio transmembrana e uma porção intracelular (Rajagopalan *et al.*, 2004; Fitzgerald *et al.*, 2006; Hata *et al.*, 2006; Vielmetter *et al.*, 2009; Tassew *et al.*, 2014). Tanto o orientador de axônio netrina, quanto RGMA se ligam ao domínio de fibronectina, mas RGMA apresenta maior afinidade de ligação a esse receptor (Geisbrecht *et al.*, 2003; Rajagopalan *et al.*, 2004). Evidências mostram que, na orientação axonal, a ligação RGMA-

neogenina é responsável por mediar a ativação de RhoA GTPase, pequenas proteínas que são importantes na dinâmica do citoesqueleto de actina (Conrad *et al.*, 2007), funcionando como mediadores principais ligando o sinal de orientação à dinâmica do citoesqueleto (Conrad *et al.*, 2007).

O processamento da molécula de RGMa envolve clivagens autocatalítica e proteolítica, promovidas por meio das enzimas SKI-1 e Furina (Figura 3). O processo origina sete formas diferentes desta proteína, sendo quatro formas ancoradas à membrana (33 kDa, 37 kDa e duas formas de 60 kDa) e três solúveis (60 kDa e duas formas de 30 kDa) e todos esses produtos se ligam ao mesmo domínio 3-4 da Fibronectina III no receptor Neogenina (Tassew *et al.*, 2012).

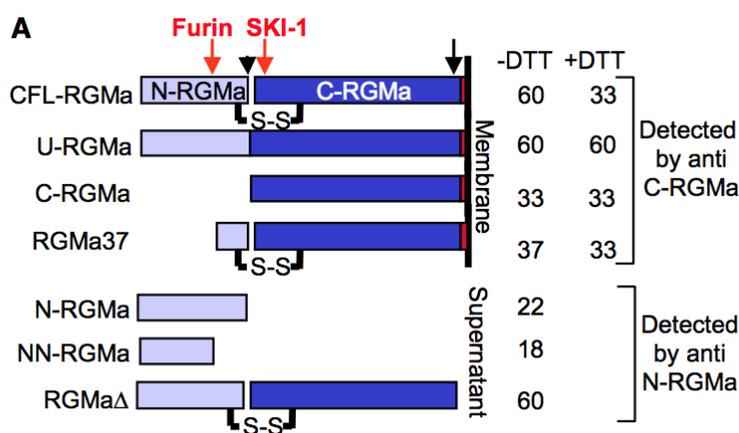


Figura 3: Processamento da molécula de RGMa pelas enzimas furina e SK1, gerando sete formas diferentes da proteína.

Além disso, todos os membros da família RGM também foram identificados como correceptores da sinalização induzida por BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas). Estudos de Samad e colaboradores (2006) demonstraram a potencialização da sinalização de BMP2 e BMP4 *in vitro* por RGMb. Posteriormente, a mesma capacidade foi descoberta para RGMa (Babitt *et al.*, 2005) e RGMc (Babitt *et al.*, 2006).

As BMPs, juntamente com outros fatores de crescimento e diferenciação (*Growth and Differentiation Factors*, GDFs), se ligam a uma combinação de

receptores tipo II, incluindo BMPRII, ActRIIA e ActRIIB, antes de promover o recrutamento de receptores do tipo I, como BMPRIA (ALK3), BMPIB (ALK6) e ActRIA (ALK2) (Yamashita *et al.*, 1995; Rosenzweig *et al.*, 1995). O complexo formado pela ligação dos receptores tipo I e II fosforilam e heterotrimerizam proteínas Smad1/5/8 que, em associação com Smad4, são translocados para o núcleo para induzir a regulação transcricional de genes alvo (Massague *et al.*, 2011). RGMa forma um complexo com os receptores de BMP tipo I (ALK3 e ALK6), liga-se à BMP2 e BMP4, o que facilita a associação deste complexo ao receptor tipo II (ActRIIA e BMPRII), e ativa a via de sinalização de Smad1/5/8, induzindo a proteína Id1 em neurônios (Babitt *et al.* 2005; Xia *et al.* 2007).

1.8. RGMa na musculatura esquelética

Como dito anteriormente, o papel biológico de RGMa vai além da repulsão axonal durante a embriogênese. Em 2010, Jorge e colaboradores sugeriram pela primeira vez uma associação de RGMa com a musculatura esquelética. O grupo de pesquisa, durante seus estudos, identificou transcritos de RGMa exclusivamente expressos no tecido muscular esquelético (Jorge *et al.*, 2010). O padrão de expressão durante o desenvolvimento embrionário de galinhas sugeriu um papel biológico para RGMa e RGMb também na miogênese (Jorge *et al.*, 2012). Transcritos de RGMa e RGMb foram detectados nos somitos, estruturas precursoras do esqueleto axial e do músculo estriado esquelético (Jorge *et al.*, 2012). Especificamente, transcritos para RGMa foram detectados nos somitos exatamente no momento e local de origem dos precursores musculares e das células tronco musculares, as células satélites; enquanto que RGMb foi identificado nos locais de células musculares já diferenciadas (Jorge *et al.*, 2012).

RGMa foi ainda identificada na musculatura adulta. Martins e colaboradores (2015) detectaram, por imunofluorescência, RGMa na célula muscular esquelética adulta de camundongos, apresentando-se com um padrão estriado no sarcoplasma, e também por todo o sarcolema. Em análises *in vitro*, a super-expressão de RGMa em células musculares induziu a formação de miotubos mais largos e com maior eficiência de fusão de mioblastos em miotubos; enquanto que o *knockdown* desta molécula nestas células induziu a formação de células menores, com características atróficas (Martins *et al.*, 2015).

Paralelamente, estudos recentes demonstraram que a sinalização BMP possui um papel no controle funcional de células satélites, as células-tronco musculares, durante a miogênese de células musculares adultas (Sartori & Sandri, 2015). Durante sua ativação e proliferação, as células satélites induzem a expressão de altos níveis de ALK3, o que induz a fosforilação de Smad1/5/8 (Sartori & Sandri, 2015). A super-expressão de ALK3 no tecido muscular aumentou os níveis de forforilação de Smad1/5/8, resultando em um aumento do tamanho da fibra e, assim, culminando em uma hipertrofia muscular (Sartori *et al.*, 2013). Por outro lado, a expressão de Noggin, um antagonista de BMP, reduziu a forforilação de Smad1/5/8, causando um quadro atrófico (Sartori *et al.*, 2013). Os mecanismos responsáveis por promover um quadro hipertrófico por meio de BMP envolvem, aparentemente, uma conexão entre BMP/ALK3/Smad1/5/8 e Akt/mTOR, já que, como mostrado por Sartori & Sandrio (2015) a inibição da sinalização por mTOR é suficiente para parcialmente prevenir a hipertrofia da musculatura esquelética mediada por BMP.

Portanto, os resultados obtidos pela indução/ausência de RGMa em células musculares *in vitro* e com BMP na musculatura esquelética foram similares e ambos sugeriram um papel para a via de sinalização RGMa/BMP/Smad1/5/8 na regulação do tamanho da fibra muscular esquelética. Mas esta associação não foi estudada até o momento.

Como próximo passo na comprovação desta hipótese, este trabalho procurou analisar a expressão de RGMa em um modelo animal que apresentasse uma alteração de massa muscular rápida e que fosse possível de ser reproduzida no laboratório. Entre os modelos disponíveis, optamos pela denervação, que apresenta efeitos evidentes na morfologia da atrofia muscular, mas com via de sinalização ainda não completamente caracterizada. Além disso, a presença de uma molécula orientadora no sarcolema da célula muscular esquelética sugere um papel para RGMa na comunicação que se estabelece entre o sistema nervoso e muscular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar uma possível associação de RGMa com os mecanismos moleculares reguladores do tamanho da fibra muscular, em modelo animal de atrofia muscular por denervação.

2.2. Objetivos específicos

- Reproduzir o modelo de atrofia muscular por denervação em camundongos adultos, por axotomia do nervo isquiático;

- Comprovar a indução da atrofia muscular após denervação por: (a) RT-PCRq para os marcadores Atrogin-1 e MuRF-1; e (b) mensuração das fibras musculares atroficas e controle, por morfometria;
- Quantificar a expressão de RGMa na musculatura atrofica por RT-PCRq e *western blot*;
- Avaliar o padrão de expressão de RGMa na musculatura atrofica adulta por imunofluorescência.
- Quantificar a expressão de componentes da via de sinalização de BMP e Neogenina na musculatura atrofica *western blot*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos machos, da linhagem *Swiss* (seis semanas de idade) foram utilizados para axotomia do nervo isquiático, a fim de desenvolver o modelo de atrofia muscular por denervação. Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos na sala de experimentação animal do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, em ciclo de luminosidade claro/escuro de 12:12 h e ração e água disponibilizados *ad libitum*. Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram executados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, sob protocolo de número 446/2015.

3.2. Procedimento cirúrgico: axotomia do nervo isquiático

Três grupos de cinco animais foram previamente anestesiados, via intraperitoneal, com uma associação de cloridrato de xilazina (8 mg/kg) (Xilazin®, Ceva) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg) (Cetamin®, Syntec). Foi feita a tricotomia da coxa direita e incisão cirúrgica paralela ao fêmur. O nervo isquiático foi exposto pela retração da fáscia e dos músculos bíceps femoral, gastrocnêmio e tibial cranial e uma porção de 1 cm do mesmo foi extraída (Figura 4; Batt & Brain, 2013). Posteriormente, a pele foi suturada com fio de nylon 4.0 e agulha de 20 mm. A perna esquerda sofreu o mesmo procedimento, exceto pela extração do nervo isquiático, sendo então utilizada como controle. No pós-cirúrgico os animais receberam cloridrato de tramadol (4 mg/kg) (Tramal®, Pfizer) no dia da cirurgia e diariamente durante um período de três dias. Os camundongos foram eutanasiados 7 e 14 dias após a axotomia, por sobredose anestésica de cloridrato de xilazina (Xilazin®, Ceva) e cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec), via intraperitoneal. O músculo gastrocnêmio direito foi coletado para análises e comprovação da atrofia muscular e o músculo gastrocnêmio esquerdo foi coletado para controle.



Figura 4. Exposição de nervo isquiático: nevo isquiático exposto após retração da fáscia e dos músculos bíceps femoral, gastrocnêmico e tibial cranial.

3.3. Comprovação da atrofia muscular após axotomia

3.3.1. Mensuração da área de secção transversal fibras musculares

Os músculos gastrocêmios controle e denervado foram coletados 14 dias após o procedimento de retirada de uma porção do nervo isquiático. Os músculos foram fixados em PFA 4% por 48 horas e desidratados em uma série ascendente de álcool. As amostras foram diafanizadas em três banhos de xilol, submetidas a três banhos de parafina e emblocadas em parafina para posterior microtomia. Secções transversais de 6 µm foram obtidas e submetidas à técnica de coloração em hematoxilina-eosina. Foram analisadas 100 células, em 14 campos aleatórios, em fotomicroscópio de fluorescência BX500F4 Olympus com o auxílio da objetiva de 10x, a fim de se determinar o comprimento e a largura das fibras. Os dados foram avaliados por cálculo da média com desvio padrão após obtenção da área e do diâmetro das mesmas, como indicado por BRITO *et al.*, 2006 e PAIXÃO *et al.*, 2011.

3.3.2.RT-PCRq

Os iniciadores necessários para técnica de RT-PCRq foram desenhados pelo *software* Primer3 Plus, com base nas sequências de *Mus musculus* depositadas no *GenBank*. Foram obtidos iniciadores para os atrogenes (*Atrogin-1*, *MuRF-1*) e GAPDH, que foi usado como gene referência.

3.3.3.Buscas pelas sequências dos genes nos bancos de dados

As sequências de nucleotídeos dos genes *Atrogin-1* e *MuRF-1* de *Mus musculus* foram obtidas a partir do banco *GenBank* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov. O sub-banco “Gene” foi utilizado para identificar transcritos de *Atrogin-1* e *MuRF-1* já sequenciados. As sequências identificadas apresentaram ID: 67731 e ID: 433766 para *Atrogin-1* e *MuRF-1*, respectivamente.

3.3.4.Desenhos dos iniciadores

Os amplicons desejados foram de 200 a 300 pares de bases (pb) e as sequencias obtidas para Atrogin-1 foram F – 5' CTGTAAGGCAAGGGGTGGT 3' e R – 5' GSTATGGAGCAGGGATTGGAG 3' e para MuRF-1 foram F – 5' GGTGCCTACTTGCTCCTTGT 3' e R – 5' GGTGGTGGCTATTCTCCTTG. Para GAPDH foram obtidos os seguintes iniciadores: F – 5' GTGAAGGTCGGTGTGAACG 3' e R – 5' ATTTGATGTTAGTGGGGTCTCG 3' (ID: 14433).

Os iniciadores fornecidos pelo *Primer3 Plus* foram avaliados pelo programa *Netprimer* (para avaliar o potencial de formação de dímeros, estabilidade, formação de *hairpin*); e, em seguida, pelas ferramentas de domínio público fornecidas pelo NCBI, disponíveis em www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, foi realizado um *Basic Local Alignment Search* (BLASTN), para a certificação de que as sequências a serem amplificadas corresponderiam especificamente aos genes *Atrogin-1* e *MuRF-1* em *Mus musculus*.

3.3.5.Extração de RNA total

O RNA total das amostras de tecidos musculares de camundongo adultos que sofreram a cirurgia de denervação foi extraído seguindo as instruções dos fabricantes do Trizol Reagent (Life Technologies). Resumidamente, aproximadamente 100 mg dos músculos atrofico e controle foram macerados, separadamente, em nitrogênio líquido, com o auxílio de um cadinho e pistilo. Os materiais macerados foram imediatamente transferidos para um tubo falcon de 15 mL, contendo 1 mL de Trizol Reagent. Após alguns minutos de mistura por vortex, as soluções foram aliquotadas em eppendorfs. A estes, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e, após mistura por inversão, os materiais foram incubados por 3 min em temperatura ambiente (TA). Os materiais foram centrifugados por 15 min a 13400 rpm para separação do RNA total (de cor

transparente e pouco denso), do DNA (de cor vermelha e muito densa) e das proteínas (de cor branca e densidade intermediária). Aproximadamente 400 µL da fase contendo o RNA total foram transferidos para um novo eppendorf e 500 µL de isopropanol foram adicionados ao mesmo. Após mistura por inversão, os materiais foram incubados por 20 min em freezer -20°C. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 13400 rpm e o isopropanol foi descartado. Os *pellets* resultantes foram lavados com 1 mL de etanol 75% gelado. Após mistura em vórtex, os materiais foram centrifugados por 5 min a 12500 rpm e ao final do processo o etanol foi descartado. A etapa do etanol foi repetida mais uma vez, para garantia de limpeza das amostras. Os eppendorfs com os *pellets* formados foram deixados para secar em termomixer por 5 min a 38°C. Os *pellets* foram hidratados utilizando 20 µL de água DEPC (0.1%) e incubados por 5 min a 55°C. Ao final do processo, os produtos obtidos foram avaliados quanto à concentração e qualidade em espectrofotômetro, observando-se a absorbância em 260/280 nm neste aspecto. Em seguida, uma eletroforese em gel de agarose 1% (para RNA, preparado com soluções contendo água tratada com dietilpirocarbonato - DEPC 0,1%), corado com GelRed™, foi realizada para a verificação da integridade dos RNAs, bem como se não houve contaminação com DNA.

3.3.6.Preparação do cDNA (DNA complementar)

Cerca de 1 µg de RNA total foi convertido em DNA complementar (cDNA), seguindo as instruções dos fabricantes do *kit RevertAid™ H. Minus First Stand cDNA Synthesis* (Fermentas). O processo ocorreu em duas reações. Resumidamente, a primeira reação correspondeu a adição de 1 µL de Oligo dT (100µM), 1 µL de *random primer* e 1 µg de RNA total em um volume final de reação de 12 µL; seguindo-se incubação em termociclador, a 65°C por 5 min.

Em seguida a reação permaneceu por 1 min em gelo, para que ocorresse o anelamento do *primer* à cauda Poli(A) do RNAm presente na amostra total. A segunda reação foi realizada após este período de incubação, com a adição de 1 µL da enzima Transcriptase Reversa (*RevertAidTM H Minus*), 2 µL de dNTP MIX (10 mM), 1 µL de inibidor de RNase (*RiboLockTM*) e 4 µL de Buffer 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 250 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 50 mM DTT). A reação foi incubada a 42°C por 1h, para permitir a polimerização das cópias do RNAm em moléculas de cDNA e 70°C por 5 min, para inativação das enzimas.

3.3.7.RT-PCRq

As expressões dos genes alvo (*Atrogin-1* e *MuRF-1*) e referência (GAPDH) foram avaliadas em equipamento da BioRad (CX96), utilizando o *kit Platinum Sybr Green qPCR supermix-UDG* (Life Technologies). Resumidamente, 1 µL de cDNA (1:10, v/v) foi adicionado a 0,4 µL de cada iniciador (F e R, ambos a 10µM) e 5 µL de *SYBR® Green qPCR Supermix-UDG* (Life Tchnologies) em um volume final de reação de 10 µL. Os experimentos foram realizados em triplicata, em placa MultiplateTM PCR Plates 96-well, clear (BIORAD), contendo um controle negativo para cada iniciador. A reação ocorreu seguindo os seguintes parâmetros: 50°C por 2 min; 95°C por 2 min seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 s; 60-62°C por 30 s e 72°C por 20 s.

3.4. Quantificação da expressão de RGMa na musculatura atrofica

3.4.1.RT-PCRq para RGMa

Após busca da sequência de RGMa e produção dos iniciadores, como previamente descrito para os genes *Atrogin-1* e *MuRF-1*, foi realizada a avaliação da expressão gênica de RGMa na musculatura atrofica, utilizando GAPDH como referência. A sequência de RNAm para RGMa de *Mus musculus* de ID 244058 foi utilizada como molde na síntese dos iniciadores. As

sequências dos iniciadores para RGMA foram obtidas conforme descrito no item 3.3.2.2, sendo: F – 5' CCACATCAGGAAGGCAGAAG 3' e R – 5' GCGTAGCACTGGGTAGGAAG 3'. Uma comparação temporal foi realizada entre os grupos eutanasiados 7 e 14 dias após a extração de parte do nervo isquiático.

3.4.2. Western blot para RGMA

Amostras de 200 mg de músculos gastrocnêmios atrofico e controle foram sonicados em 400 µL de PBS 1% (proporção 2:1) na presença de inibidores de protease, sendo eles: pepstatina A (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich), E64 {N-[N-(L-3-trans-carboxiirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina; [1-[N-[(L-3-trans-carboxioxirane-2-carbonil)-L-leucil]amino]-4-guanidinobutano]} (Sigma-Aldrich), PMSF (Sigma-Aldrich), ortovanato de sódio (Sigma-Aldrich) e triton-X 100 (Gibco) em falcon de 15 mL. Os lisados foram transferidos para eppendorfs de 1,5 mL e centrifugados por 20 min a 4°C a 4500 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para eppendorfs de 0,5 mL e 30 µg de proteína ((quantificação por Bredford) foram adicionadas a tampão de amostra contendo SDS 10%, glicerol, azul de bromofenol 0,2%, Tris 0,5 M (pH 6.8) e β-mercaptoetanol num volume final de 20 µL. As amostras foram fervidas por 5 min a 100°C e, em seguida, foram separadas eletroforicamente em gel de SDS-poliacrilamida 12% a 25 mA por 2:30 h e transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) a 100 V por 1 h. O bloqueio para amostras a serem incubadas com o anticorpo primário anti-GAPDH (coelho monoclonal 1:1000 IgG, Sigma) foi realizado com BSA 1% e para as amostras a serem incubadas com os anticorpos primários anti-RGMA para a porção C-terminal (cabra policlonal 1:500 IgG, Santa Cruz Biotechnology) e anti-RGMA para a porção central da forma de membrana da

molécula de RGMa (coelho policlonal 1:500 IgG 1:500, Abcam) foi realizado com TBS (*Tris Buffered Saline*) contendo 0,1% Tween-20 e caseína (TBS-TC) por 5 min. A incubação com os anticorpos primários anti-GAPDH e anti-RGMa (C-terminal e porção central da forma de membrana da molécula de RGMa) foi realizada por 30 min a TA. Após lavar com PBST, as membranas marcadas com GAPDH e com o anticorpo para a porção central da molécula de RGMa foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (IgG) (Dako), por 30 min a TA; e a membrana marcada com C-RGMa foi incubada com o anticorpo secundário biotilado anti-cabra (IgG) (Vectastain) por 30 min a TA, lavado com PBST e incubado novamente com Vectastain® ABC Reagent por 30 min a TA. Após lavar as membranas com PBST, elas foram reveladas com 3,30-diaminobenzina (DAB; Sigma-Aldrich), cloronaftol (Amresco) e peróxido de hidrogênio 35% (Sigma-Aldrich) por 1 min a TA. As imagens foram obtidas usando um scanner Epson Perfection 4990 (Epson).

3.5. Padrão de expressão de RGMa na musculatura atrófica

3.5.1. Imunofluorescência nas fibras atróficas e controle

Os músculos gastrocnêmios previamente coletados e seccionados transversalmente a 6 µm foram submetidos a dois banhos de xilol para desparafinização e a uma série descendente de álcool para hidratação. Em seguida os aldeídos foram bloqueados com um banho de 30 min de metanol, as amostras foram incubadas TBS-TC por 30 min para bloqueio de ligações inespecíficas. Os cortes foram então incubados com o anticorpo primário anti-RGMa (C-terminal, cabra policlonal 1:200 IgG, Santa Cruz Biotechnology) e anti-RGMa (N-terminal, coelho policlonal 1:200 igG, Abcam), diluídos em PBS à 1:100, a 4°C *overnight*, para determinar o padrão de expressão das moléculas. Os anticorpos secundários Alexa Fluor 555 (1:500) Alexa Fluor 488 (1:500)

foram incubados por 90 min em TA, para associação com os anticorpos anti-RGMA C-terminal e anti-RGMA N-terminal, respectivamente, os núcleos foram contracolorados com DAPI (Molecular Probe, Life Technologies) e as lâminas foram montadas com glicerol 50% diluído em PBS 1x.

3.6. Quantificação da expressão de componentes da via BMP e neogenina na musculatura atrofica por *western blot*

Os músculos gastrocnêmios destinados quantificação da expressão de componentes da via BMP e Neogenina foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente para a molécula de RGMA. O bloqueio de ligações inespecíficas, entretanto, foi realizado com BSA 1%. A incubação com os anticorpos primários anti-BMP4 (cabra policlonal 1:500 IgG, Santa Cruz Biotechnology), anti-Smad 1/5/8 (cabra policlonal 1:500 IgG, Santa Cruz Biotechnology) e anti-RohA (coelho policlonal 1:500 IgG, Santa Cruz Biotechnology) foi realizada por 30 min a TA. Após lavar com PBST, a membrana marcada com RhoA foi incubada com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (IgG) (Dako), por 30 min a TA; e as membranas marcadas com BMP4 e Smad 1/5/8 foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-cabra (IgG) (Vectastain) por 30 min a TA, lavado com PBST e incubado novamente com Vectastain® ABC Reagent por 30 min a TA. Após lavar as membranas com PBST, elas foram reveladas com 3,30-diaminobenzina (DAB; Sigma-Aldrich), cloronaftol (Amresco) e peróxido de hidrogênio 35% (Sigma-Aldrich) por 1 min a TA. As imagens foram obtidas usando um scanner Epson Perfection 4990 (Epson).

3.7. Microscopia e documentação

A microscopia e fotodocumentação das lâminas submetidas às técnicas de coloração de hematoxilina-eosina e imunofluorescência foram realizadas com a

utilização do fotomicroscópio de fluorescência BX500F4 Olympus acoplado ao sistema de captura Q-Color 3/Olympus. As imagens foram montadas utilizando o Adobe Photoshop.

3.8. Análises estatísticas

Os dados foram analisados por meio do software Prism, versão 6.01 (GraphPad, San Diego, CA) e REST 2009. A avaliação dos resultados quanto a sua normalidade foi realizada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Teste T pareado foi utilizado quando os dados assumiam distribuição normal e Wilcoxon quando os mesmos não eram paramétricos. One-way ANOVA foi utilizado para avaliação de múltiplos resultados, corrigidos de acordo com as análises de Bonferroni. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Comprovações da atrofia muscular após axotomia

Inicialmente, os músculos gastrocnêmios das patas denervada e controle foram avaliados quanto à quantidade de massa, tamanho das fibras musculares e expressão de atrogenes a fim de confirmar o sucesso do protocolo de axotomia na indução da atrofia muscular.

Já macroscopicamente foi possível observar uma evidente redução da largura da pata e do músculo gastrocnêmio direito 14 dias após a retirada do nervo isquiático (Figuras 5 e 6, respectivamente). A análise histológica em cortes transversais revelou a redução da área da secção transversal das fibras musculares, bem como um aumento do número de núcleos (Figura 7B), em comparação com as fibras controles (Figura 7A). A atrofia muscular também

pode ser comprovada por meio da mensuração da massa muscular e morfometria das fibras musculares (Figura 8). Os resultados indicaram uma redução de aproximadamente 65% da massa do músculo atrofiado (Figura 8A); e de cerca de 70% da área das fibras deste músculo que sofreu axotomia (Figura 8B), comparado com as amostras controles.

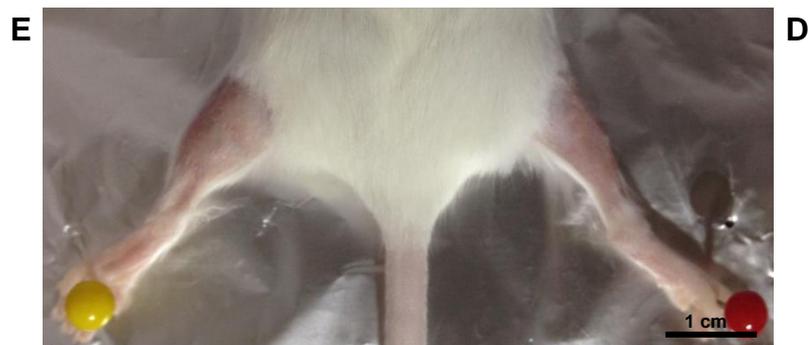


Figura 5. Comparação de patas: redução da largura da pata direita em comparação com a pata esquerda de um camundongo que sofreu axotomia do nervo isquiático.

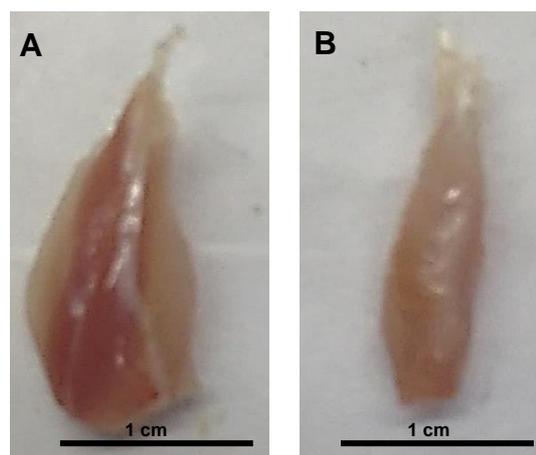


Figura 6. Comparação de músculos gastrocnêmicos: músculos gastrocnêmios retirados 14 dias após a cirurgia de denervação. Em (A) o músculo da perna controle e em (B) o músculo da perna que sofreu a retirada do nervo isquiático.

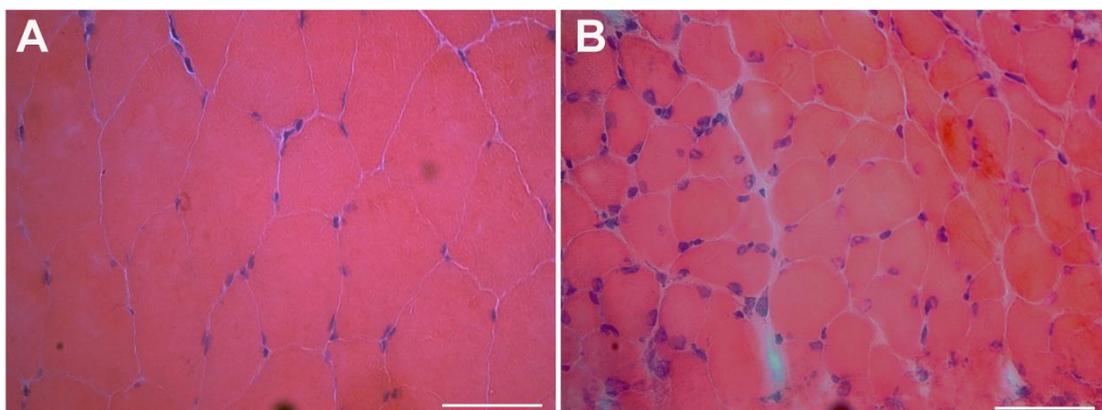


Figura 7. Comparação da área da secção transversal das fibras musculares: histologia dos músculos gastrocnêmios aos 14 dias após a cirurgia de denervação. Em (A) fibras musculares da amostra controle e em (B) fibras musculares da amostra que teve parte do nervo isquiático extraído. Aumento de 40x.

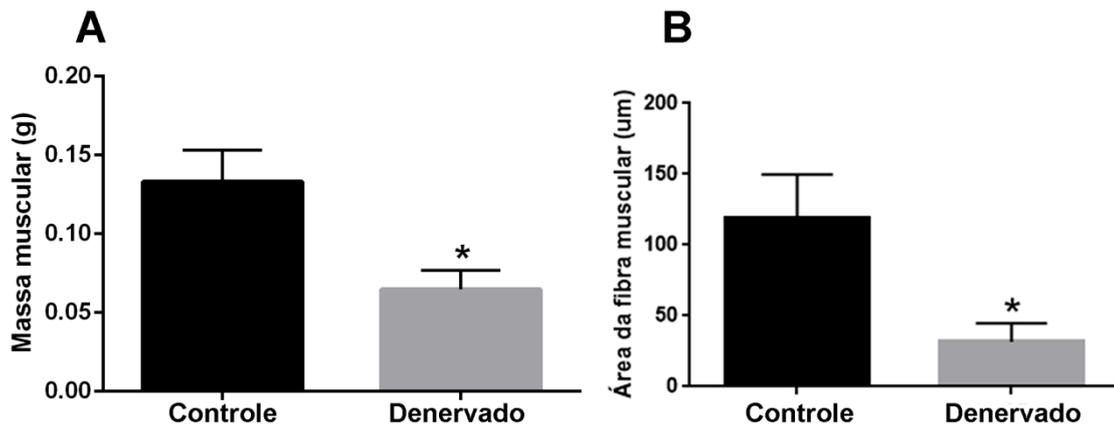


Figura 8. Massa muscular e área da secção transversal das fibras musculares: análise da massa e tamanho das fibras do músculo gastrocnêmio da perna denervada e controle. Em (A), redução da massa muscular e (B) da área das fibras musculares do músculo gastrocnêmio direito 14 dias após a retirada de parte do nervo isquiático.

Por fim, a quantificação da expressão dos atrogenes evidenciou, por PCR quantitativa, um aumento de Atrogin-1 e MuRF-1 de aproximadamente 10 e 4 vezes, respectivamente (Figura 9). Com base nos resultados de comprovação da atrofia muscular, pode-se inferir que o modelo de atrofia muscular por denervação pode ser reproduzido com sucesso. Juntos, estes resultados comprovaram a indução da atrofia muscular após a denervação.

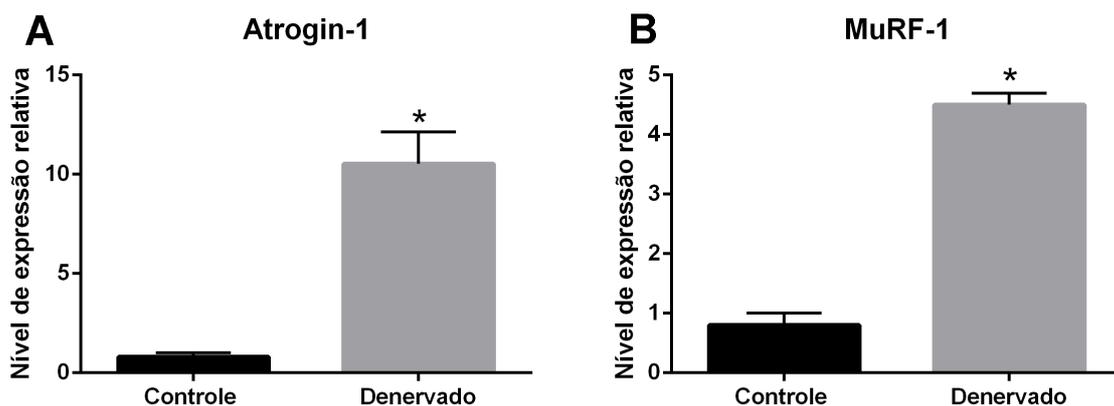


Figura 9. Quantificação de atrogenes nos músculos gastrocnêmicos: resultado de RT-PCRq para os atrogenes Atrogin-1 (A) e MuRF-1 (B). Houve um aumento para os genes de atrofia nas amostras que sofreram extração de parte do nervo isquiático. * $p < 0.05$.

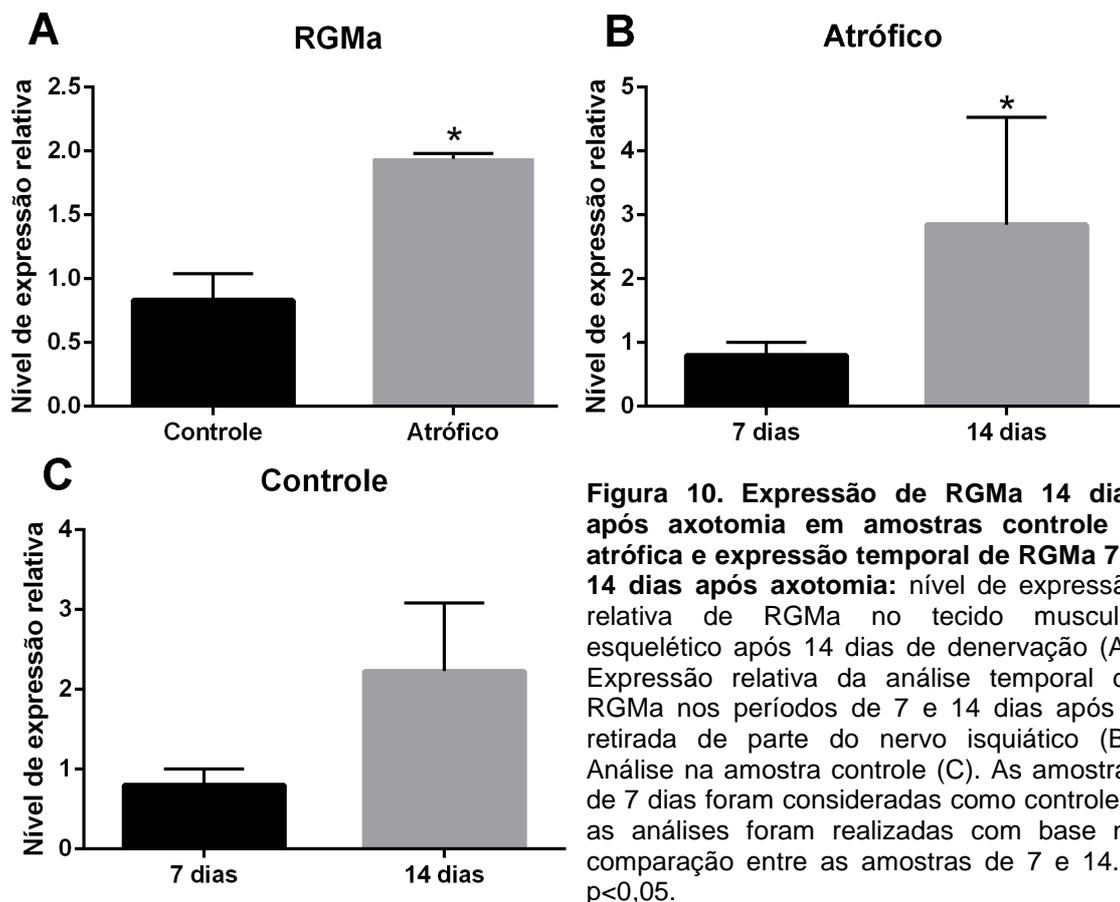
4.2. Caracterização da expressão da Molécula Orientadora por Repulsão a (RGMa) na musculatura atrofiada por denervação

4.2.1. Expressão de transcritos de *RGMa* na musculatura atrofiada por denervação

Confirmado os efeitos na musculatura esquelética deste modelo de denervação, este trabalho buscou então caracterizar o nível e o padrão de expressão da Molécula Orientadora Repulsiva a (*RGMa*) no músculo gastrocnêmio atrofiado por axotomia.

A primeira análise realizada foi a quantificação da expressão de transcritos de *RGMa* na musculatura atrofiada por denervação por RT-PCR quantitativa (Figura 10). O resultado indicou um aumento significativo de duas vezes na expressão de transcritos de *RGMa* na musculatura denervada em relação à pata controle (Figura 10A), sugerindo que há um aumento compensatório da molécula a fim de controlar a perda muscular.

A análise também foi realizada a fim de comparar a expressão de *RGMa* no início do processo de atrofia muscular após denervação (após 7 dias de axotomia), com os níveis detectados aos 14 dias (quando os efeitos foram evidenciados). Os resultados mostraram um aumento significativo da expressão de *RGMa* na musculatura atrofiada por denervação após 14 dias em relação ao detectado aos 7 dias (Figura 10B), diferença não observada na musculatura da pata controle (Figura 10C). Tais resultados sugerem que há um aumento graativo da molécula, entretanto, para maior veracidade, os experimentos referentes a esses resultados necessitam de revisão.



4.2.2. Nível de expressão de RGMa por *western blot*

A expressão da proteína de RGMa no músculo gastrocnêmio controle e atrofiado por denervação também foi avaliada por *western blot*, utilizando-se dois anticorpos anti-RGMa: (1) um que detecta a porção C-terminal da proteína (de 33KDa), região onde se localiza a âncora-GPI que liga a proteína à membrana plasmática; e (2) outro que detecta a porção central (entre os aminoácidos 200-300), de 60KDa, que pelo tamanho indica detectar tanto a forma solúvel quanto a ancorada à membrana da proteína. Um anticorpo anti-GAPDH foi utilizado como controle.

Os resultados de *western blot* obtidos com o anticorpo que detecta a porção C-terminal de RGMa revelaram uma diminuição da expressão de RGMa na musculatura atrofiada por denervação em relação ao detectado no controle (Figura 11A). No entanto, o anticorpo que detecta a porção central da proteína

revelou um resultado oposto: a denervação parece ter induzido um aumento na expressão de RGMa em relação ao controle (Figura 11B). Com base nesses resultados, podemos inferir que a forma solúvel da proteína aumenta sua expressão de forma compensatória na tentativa de controle da perda muscular.

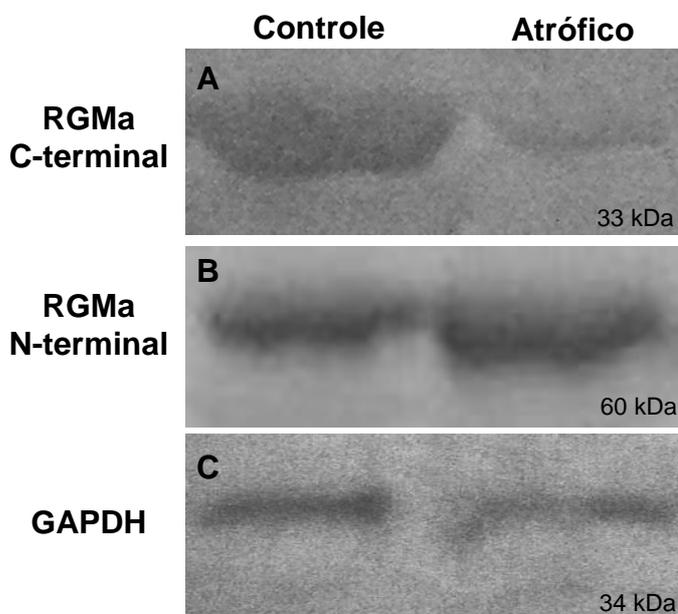


Figura 11. Quantificação de duas formas da proteína de RGMa: *western blot* para a porção C-terminal da proteína de RGMa (A), porção central de RGMa (B) e para o gene constitutivo GAPDH (C). A primeira coluna representa a amostra controle enquanto que a segunda coluna representa a amostra atrófica.

4.2.3. Padrão de expressão de RGMa na musculatura atrofiada por denervação por imunofluorescência

Imunofluorescência foi realizada utilizando-se os anticorpos anti-RGMa que detecta a porção C-terminal e, após inferências utilizando-se os achados nas análises de *western blot*, a porção N-terminal da proteína (forma solúvel), para permitir a caracterização do padrão de expressão da proteína RGMa na musculatura controle e atrofiada por denervação. Além disso, também se objetivou verificar *in situ* os resultados obtidos com a *western blot* que revelaram efeitos diferentes entre os anticorpos.

Utilizando-se o anticorpo que detecta a porção C-terminal na musculatura controle, os resultados indicaram a presença de RGMa no sarcolema e sarcoplasma de algumas fibras musculares esqueléticas (Figura 12A). O outro anticorpo anti-RGMa, que detecta a forma solúvel da proteína, revelou um resultado similar de padrão de expressão de RGMa na musculatura de ambas as amostras (Figura 12G, controle, e J, atrófico). Esses resultados nos indicam que o padrão de expressão da molécula se mantém em ambas as amostras e para ambos os anticorpos. Entretanto, a preferência de RGMa por algumas fibras indicam que a molécula pode estar relacionada com algum tipo de fibra muscular em específico.

4.3. Expressão de componentes de via de BMP e neogenina na musculatura atrofiada por denervação

Além de detectar os níveis de expressão de RGMa, este trabalho também buscou avaliar, por *western blot*, os níveis de expressão de moléculas associadas à sinalização induzida por RGMa. RGMa tem neogenina como receptor e também atua como co-receptor da sinalização BMP. Por isso, a expressão de RhoA (mensageiro secundário da sinalização induzida via neogenina), BMP4 e seu mensageiro secundário Smad1/5/8 foram avaliados nas musculaturas controle e atrofiada por denervação (Figura 13).

Os resultados indicaram um aumento da sinalização induzida por BMP4/Smad1/5/8 e RhoA na musculatura atrofiada por denervação em relação ao controle (Figura 13A, B e C, respectivamente) e, juntamente com os resultados de aumento da molécula e da forma solúvel da proteína de RGMa, podemos inferir que RGMa, via neogenina e BMP podem estar sendo favorecidos a fim de controlar a perda muscular.

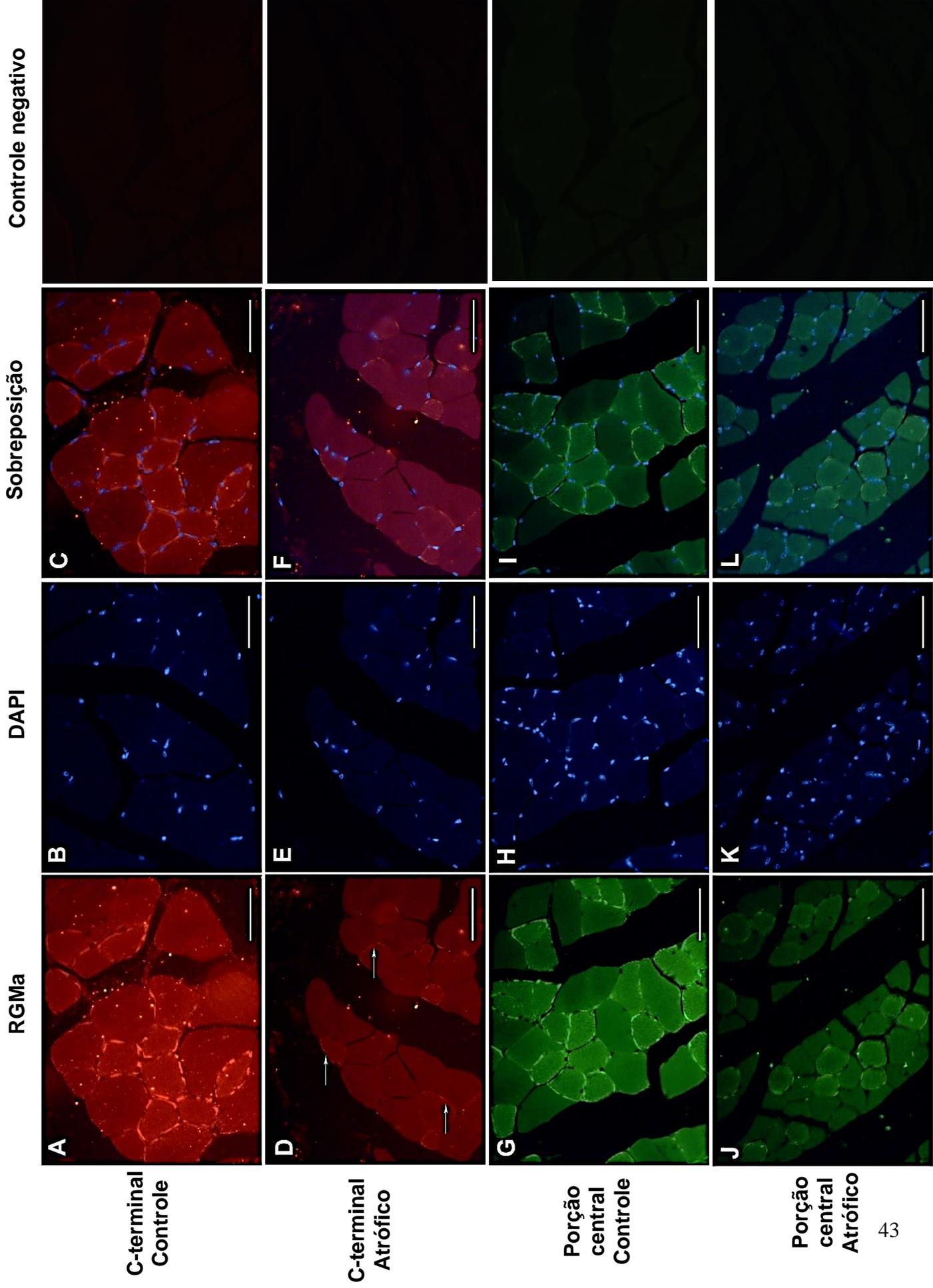


Figura 12. Imunofluorescência para duas formas da proteína de RGMa: padrão de expressão da porção C-terminal de RGMa na musculatura atrofiada e controle (D e A, respectivamente) e da porção central da proteína na amostra denervada (J) e controle (G). Contracoloração com DAPI (B, E, H e K) e sobreposição de ambas as marcações (C, F, L). Controle negativo da técnica se encontra na quarta coluna. Setas (D) indicam local de expressão de RGMa, estando presente tanto no sarcolema de algumas fibras, quanto no citoplasma de ambas as amostras, para ambos os anticorpos. Aumento de 40x.

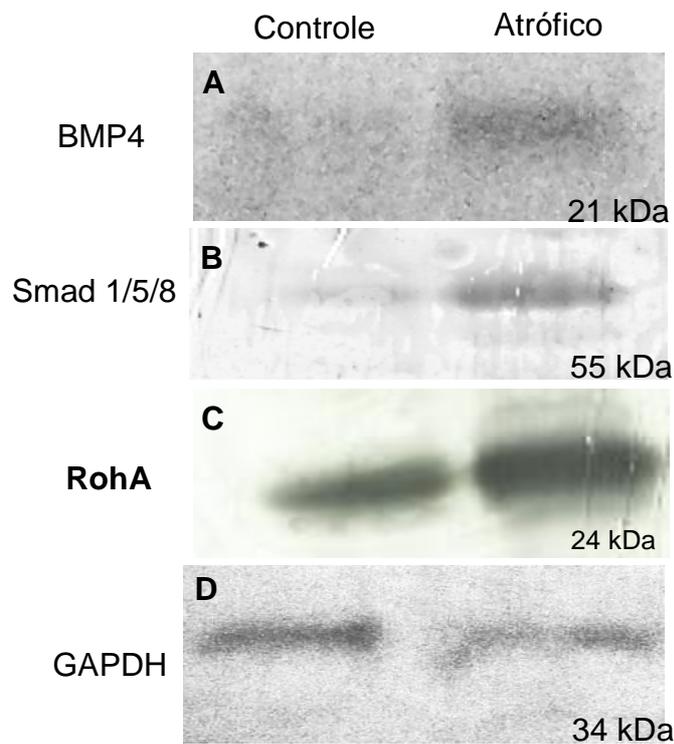


Figura 13. Quantificação de componentes da via de BMP4 e neogenina: *western blot* para BMP (A), Smad 1/5/8 (B), RohA (C) e para o gene constitutivo GAPDH (D). A primeira coluna representa a amostra controle enquanto a segunda a amostra atrófica.

5. DISCUSSÃO

Originalmente descobertas como fatores indutores de crescimento neuronal, as moléculas orientadoras por repulsão (RGMs) são atualmente consideradas peças chaves em processos fundamentais, como migração celular, apoptose e desenvolvimento, diferenciação, metabolismo de ferro e homeostase de diversos tecidos (Siebold *et al.*, 2016).

Na musculatura esquelética as moléculas orientadoras foram primeiramente detectadas durante o desenvolvimento de embriões de galinha. Trabalhos de Jorge e colaboradores (2012) mostraram a expressão de RGMA no mesoderma paraxial, o qual é organizado em uma série de estruturas celulares, denominadas somitos, que são os precursores do esqueleto axial e do músculo estriado esquelético. Mais tarde, Martins e colaboradores (2015) associaram a molécula de RGMA com a fusão de mioblastos em miotubos

multinucleados e à hipertrofia muscular, sugerindo que a molécula orientadora poderia fazer parte da via de sinalização do processo hipertrófico.

Compreender os mecanismos moleculares que controlam a massa muscular torna possível o desenvolvimento de terapias gênicas celulares, permitindo o aumento do tamanho das fibras musculares, da força e da massa muscular de pacientes com atrofia da musculatura esquelética. Para tanto, identificar as vias e as moléculas envolvidas no processo de ganho e perda muscular se tornam essenciais (Bonalo & Sandri 2013). Tendo em vista os achados de Martins e colaboradores (2015) e que síntese e degradação de proteínas são dois processos que estão intimamente conectados (Schiaffino *et al.*, 2013), estes trabalhos anteriores sugerem um papel para RGMA no controle do tamanho da fibra muscular.

5.1. Reprodução do modelo de atrofia muscular por denervação em camundongos

Neste trabalho optou-se pelo uso do modelo de denervação como forma de promover uma alteração *in vivo* na musculatura esquelética de forma rápida e evidente, para que fosse possível avaliar o papel de RGMA como regulador do tamanho da fibra. Optou-se pela denervação muscular, que além de induzir uma perda efetiva de massa muscular em pouco tempo, é possível associar a perda do nervo isquiático aos efeitos do processo no tecido muscular esquelético.

Por isto, este estudo procurou primeiramente reproduzir o modelo de atrofia muscular por denervação. Camundongos Swiss, na idade adulta, foram submetidos à técnica de extração de parte do nervo isquiático (Batt & Brain, 2013) e duas semanas após a cirurgia já foi possível notar macroscopicamente uma redução da massa muscular do membro operado. A análise microscópica

permitiu identificar células menores nas amostras que passaram pelo processo de denervação, corroborando com o esperado de diminuição da área das mesmas (Nicks *et al.*, 1989; Brooks & Myburgh, 2015). Além disso, o aumento dos núcleos das fibras atroficas indicou um aumento da síntese de RNA total, corroborando com os achados de Sacheck e colaboradores (2006) em seus experimentos com o mesmo modelo de atrofia.

Durante a atrofia muscular, genes aumentam sua expressão para que as vias de sinalização do processo sejam ativadas. Atrogin-1/MAFbx e MURF-1, ou atrogenes, fazem parte da via ubiquitina-proteosoma, a qual está envolvida com o processo de degradação proteica na musculatura esquelética (Bodine *et al.*, 2001; Bodine *et al.*, 2001a; Gomes *et al.*, 2001; Folleta *et al.*, 2011). Para tanto, fez-se necessária a quantificação da expressão de ambos os genes a fim de comprovar a reprodução do modelo de atrofia muscular por denervação. Análises de PCR quantitativa mostraram há um aumento de ambos os atrogenes nas amostras que foram denervadas em relação ao membro controle, estando Atrogin-1 cerca de dez vezes mais expresso na amostra denervada, enquanto que MURF-1 aumentou sua expressão em, aproximadamente, quatro vezes. De acordo com a literatura (Sacheck *et al.*, 2006), o aumento da expressão Atrogin-1 é maior do que a de MuRF-1, uma vez que há um maior número de substratos para atuação.

Juntos estes dados corroboraram com trabalhos de Macdonald e colaboradores (2014) e Bongers e colaboradores (2013) para a reprodução do modelo de atrofia muscular por denervação.

5.2. Expressão de RGMA na musculatura esquelética denervada

Após a reprodução do modelo, foi possível analisar a expressão da molécula de RGMA na atrofia por denervação.

Neste trabalho *RGMa* (RNAm) se mostrou mais expresso no modelo desenvolvido. A super-expressão *in vitro* da molécula em células tanto de culturas primária quanto imortalizadas da linhagem C2C12 induziu o aumento da largura dessas células, bem como do número de núcleos, enquanto que seu *knockdown* levou a formação de células com características atróficas (Martins *et al.*, 2015). Esperava-se, então, que a expressão de *RGMa* em células musculares atróficas fosse menor, se comparado com células normais, o que foi encontrado nas análises de expressão proteica para a forma C-terminal (forma associada à membrana) da molécula de *RGMa*. Entretanto, a análise do RNAm e da forma N-terminal (forma solúvel) da molécula indicou um aumento do nível de expressão do RNAm de *RGMa* após 14 dias, sugerindo que a denervação induz uma resposta compensatória da célula, na tentativa de aumentar a expressão deste RNAm, da forma N-terminal e da via de sinalização hipertrófica induzida por ele, para recuperar a perda de massa muscular pela denervação.

O organismo se adapta à atrofia muscular, ativando vias de sinalização para conter a degradação proteica. Os atrogenes estão altamente expressos logo no início do desenvolvimento da atrofia muscular por denervação, diminuindo sua expressão ao longo do tempo (Sacheck *et al.* 2007), além de haver um aumento na produção de RNA total (Sacheck *et al.* 2007; Glass 2010; Bonaldo & Sandri, 2013). A indução da expressão de *RGMa* na musculatura denervada ocorreu apenas após 14 dias da cirurgia. Levando em consideração que os efeitos de uma atrofia muscular já podem ser notados 7 dias após uma denervação (Sacheck *et al.*, 2006), pode-se inferir que o organismo foi se adaptando gradativamente para conter o desenvolvimento da

condição atrófica. Entretanto, os experimentos para tais análises necessitam de revisão, a fim de garantir a veracidade dos resultados.

Mantendo a investigação no sentido de que RGMa aumenta sua expressão a fim de conter a perda muscular, partimos para análises proteicas. Neste trabalho, dois anticorpos anti-RGMa foram usados: um para a forma de RGMa aderida à membrana (porção C-terminal da proteína, proteína de 33KDa) e outro que detecta a porção central de RGMa, proteína de 60KDa, que pode ser tanto a forma de membrana quanto a solúvel de RGMa. Nossos achados demonstraram uma diminuição da expressão da molécula aderida à membrana; mas um aumento do anticorpo que detecta a porção central de RGMa. Como os resultados foram opostos e levam em consideração ao tamanho da proteína, juntos eles indicam que o anticorpo que detecta a porção central da proteína esteja detectando a forma solúvel de RGMa. Estes resultados nos sugerem então que, na denervação, a forma de RGMa solúvel esteja sendo favorecida para a compensação da perda muscular e indução da hipertrofia muscular (Martins *et al.*, 2015).

Em 2002, Monnier e colaboradores descreveram pela primeira vez a associação das RGMs com a membrana plasmática por meio da âncora GPI em sua extremidade C-terminal. Esperava-se, então, que tais moléculas se localizassem nas membranas das células musculares esqueléticas, o que pôde ser confirmado por Martins e colaboradores (2015), após submeterem o tecido à técnica de imunofluorescência. RGMa, b e c foram identificadas no sarcolema das células musculares, um padrão que foi confirmado após co-localização com a proteína de membrana distrofina (Martins *et al.*, 2015). RGMa foi ainda identificado no sarcoplasma das fibras musculares, com padrão estriado de expressão (Martins *et al.*, 2015). Neste trabalho, o padrão de expressão de

RGMa nas fibras musculares observado anteriormente pôde ser confirmado: cortes transversais do músculo gastrocnêmio revelaram a presença de RGMa no sarcolema e como pontos no sarcoplasma, conforme observado em Martins e colaboradores (2015). Seu padrão de expressão se manteve o mesmo em ambas as amostras – atrófica e controle – para ambos os anticorpos utilizados (RGMa C-terminal e RGMa N-terminal), entretanto foi possível observar que, em ambas as amostras e marcações, a expressão da molécula se intensificava no sarcolema de apenas algumas fibras musculares, sugerindo que RGMa pode estar associado ao tipo de fibra.

RGMa foi identificado em outros tecidos atuando em duas vias de sinalização: (1) via o receptor Neogenina (Kang *et al.*, 2004; Rajagopalan *et al.*, 2004; Hata *et al.*, 2006; Conrad *et al.*, 2007); e (2) como co-receptor da via de sinalização induzida por BMP4 (Babitt *et al.* 2005; Samad *et al.* 2005; Babitt *et al.* 2006). Curiosamente, ambas as vias já foram associadas à indução da hipertrofia muscular. A superexpressão de neogenina em células C2C12 induziu um aumento do índice de fusão de mioblastos em miotubos multinucleados (Kang *et al.* 2004) e a inibição da sinalização BMP induziu a atrofia muscular e exarcebou os efeitos de perda de massa da musculatura denervada (Sartori *et al.* 2013). Existem ainda evidências que indicam que neogenina e BMP são vias funcionalmente ligadas pela ação de RGMa solúvel (Zhou *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013; Tassew *et al.*, 2014; Siebold *et al.*, 2016). De acordo com Siebold e colaboradores (2016), RGMa solúvel estabiliza e dimeriza o ecotomínio de neogenina e aumenta a via de sinalização subsequente. Este trabalho indicou um aumento da expressão de BMP4, Smad1/5/8 e RhoA na musculatura denervada em relação a controle. Juntos, estes resultados sugerem que a denervação induz um aumento da

forma solúvel de RGMa, para promover a sinalização conjunta BMP-neogenina, na tentativa de recuperar o quadro atrófico, induzindo a hipertrofia muscular.

Pode-se inferir que o aumento da expressão de RGMa se dá de fato como uma forma compensatória, a fim de controlar o processo de perda muscular. Seria agora importante avaliar os níveis de expressão de SK1 e Furina nessas amostras, enzimas que promovem a clivagem de RGMa para a produção da forma solúvel (Tassew *et al.*, 2012) (Figura 3); identificar quais são os alvos diretos da indução dessa sinalização (indutores de hipertrofia); e, por fim, relacionar à expressão da molécula com os tipos de fibras musculares.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os achados deste trabalho, podemos concluir que:

- A denervação induziu um aumento no nível de expressão do RNAm para RGMa, sugerindo a ativação de um mecanismo hipertrófico compensatório após 14 dias do processo cirúrgico.
- A forma ancorada à membrana de RGMa diminui na denervação.
- É possível que a forma solúvel de RGMa é induzida após a denervação.
- O padrão de expressão de RGMa no tecido muscular esquelético controle e atrofiado por denervação não é alterado.
- A via de sinalização induzida por RGMa solúvel, BMP4-Smad1/5/8 e RhoA parece estar ativada durante a denervação muscular, sugerindo que a recuperação da massa muscular é dependente das vias BMP e Neogenina funcionando juntas via a presença de RGMa.

- Este é o primeiro trabalho associando a molécula orientadora por repulsão a com a indução de uma via hipertrófica na musculatura esquelética *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. H.; EICHMANN, A. (2010). *Axon Guidance Molecules in Vascular Patterning*. Cold Spring Harb Perspect Bio. 2(5): a001875;

BABITT, J. L.; ZHANG, Y.; SAMAD, T. A.; XIA, Y.; TANG, J.; CAMPAGNA, J. A.; SCHNEYER, A. L.; WOOLF, C. J.; LIN, H. Y. (2005). *Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor*. J. Biol. Chem., 280, pp. 29820-29827;

BABITT, J. L.; HUANG, F. W.; WRIGHTING, D. M.; XIA, Y.; SIDIS, Y.; SAMAD, T. A.; CAMPAGNA, J. A.; CHUNG, R. T.; SCHNEYER, A. L.; WOOLF, C. J.; ANDREWS, N. C.; LIN, H. Y. (2006). *Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression*. Nat. Genet., 38, pp. 531-539;

BALDWIN, K. M. & HADDAD, F. (2002). *Skeletal muscle plasticity: Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms*. Am J Phys Med Rehabil, 81, pp. 40-51;

BALDWIN, K. M.; HADDAD, F.; PANDORF, C. E.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. (2013). *Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms*. Front. Physiol., 4 (284), pp. 1-13;

BATT, J. A. E. & BRAIN, J. R. (2013). *Tibial nerve transection – a standardized model for denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice*. Journal of Visualized Experiments, 81, pp. 1-6;

BIRESSI, S.; MOLINARO, M.; COSSU, G. (2007). *Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development*. Dev. Biol.; 308 (2), pp. 281-293;

BODINE, S. C. & BAEHR, L. M. (2014). *Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 307, pp. 469-484;

BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B. A.; POUHEYMIROU, W. T.; PANARO, F. J.; NA, E.;

DHARMARAJAN, K. (2001a). *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 294, pp. 1704-1708;

BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B. A.; POUHEYMIROU, W. T.; PANARO, F. J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z. Q.; VALENZUELA, D. M.; CECHIARA, T. M.; STITT, T. N.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J. (2001). *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science 294, pp. 1704-1708;

BONALDO, P. & SANDRI, M. (2013). *Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy*. Dis Model Mech. 6(1), pp. 25-39;

BONGERS, K. S.; FOX, D. K.; EBERT, S. M.; KUNKEL, S. D.; DYLE, M. C.; BULLARD, S. A.; DIERDORFF, J. M.; ADAMS, C. M. (2013). *Skeletal muscle denervation causes skeletal muscle atrophy through a pathway that involves both Gadd45a and HDAC4*. Am J Physiol Endocrinol Metab., 305(7), pp. 907-15;

BONANOMI, D.; PAFF, S. L. (2010). *Motor axon pathfinding*. Cold Sping Harb Perspect Bio., 2(3): a001735;

BRINKS, H.; CONRAD, S.; VOGT, J.; OLDEKAMP, J.; SIERRA, A.; DEITINGHOFF, L.; BECHMANN, I.; ALVAREZ-BOLADO, G.; HEIMRICH, B.; MONNIER, P. P.; MUELLER, B. K.; SKUTELLA, T. (2004). *The repulsive guidance molecule RGMA is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus*. J. Neurosci., 24(15), pp. 3862-9;

BROOKE, M. H. & KAISER, K. K. (1970). *Muscle Fiber Types: How Many and What Kind?* Arch Neurol., 23(4), pp. 369-79;

BROOKS, N. E. & MYBURGH, K. H. (2014). *Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the respond and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways*. Front Physiol. 17, pp.5-99;

BULLER, A. J.; ECCLES, J. C.; ECCLES, R. M. (1960). *Differentiation of fast and slow muscles in cat hind limb*. J Physiol., 150, pp. 399-416;

BUMHAM, R.; MARTIN, T.; STEIN, R.; BELL, G.; MACLEAN, I.; STEADWARD, R. (1997). *Skeletal muscle fiber type transformation following spinal cord injury*. Spinal Cord, 35(2), pp. 86-91;

CAIOZZO, V. J. (2002). *Plasticity of skeletal muscle phenotype: Mechanical consequences*. Muscle & nerve, 26, pp. 740-768;

CENTNER, T.; YANO, J.; KIMURA, E.; MCELHINNY, A. S.; PELIN, K.; WITT, C. C.; BANG, M. L.; TROMBITAS, K.; GRANZIER, H.; GREGORIO, C. C.; SORIMACHI, H.; LABEIT, S. (2001). *Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain*. J. Mol. Biol., 306, pp. 717-726;

CISTERNA, B. A.; CARDOZO, C.; SÁEZ, J. C. (2014). *Neuronal involvement in muscular atrophy*. Frontiers in Cellular Neuroscience. 4(405), pp.1-11;

CHAL, J & POURQUIÉ, O. (2017). *Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro*. Development, 144, pp. 2104-2122;

CHILTON, J. K. (2006). *Molecular mechanisms of axon guidance*. Dev. Bio., 292(1), pp. 13-24;

CLARKE, B. A.; DRUJAN, D.; WILLIS, M. S.; MURPHY, L. O.; CORPINA, R. A.; BUROVA, E.; RAKHILIN, S. V.; STITT, T. N.; PATTERSON, C.; LATRES, E. (2007). *The E3 ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle*. Cell Metab., 6, pp. 376–385;

COHEN, S.; BRAULT, J. J.; GYGI, S. P.; GLASS, D. J.; VALENZUELA, D. M.; GARTNER, C.; LATRES, E.; GOLDBERG, A. L. (2009). *During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation*. J. Cell Biol., 185, pp. 1083–1095;

COLLIN, P. H. *Muscular tissue*. Disponível em: http://search.credoreference.com.ezproxy.uwe.ac.uk/content/entry/acbmedterm/muscle_tissue_muscular_tissue/0 [acessado em 09 de junho de 2017];

CONRAD, S.; GENTH, H.; HOFMANN, F.; JUST, I.; SKUTELLA, T. (2007). *Neogenin-RGMA signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC*. The Journal of Biological Chemistry, 282, pp. 16423-16433;

CORRADINI, E.; BABITT, J. L.; LIN, H. Y. (2009). *The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors*. Cytokine Growth Factor Rev., 20, pp. 389-398;

CSIBI, A.; CORNILLE, K.; LEIBOVITCH, M. P.; POUPON, A.; TINTIGNAC, L. A.; SANCHEZ, A. M.; LEIBOVITCH, S. A. (2010). *The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse*. PLoS One, 5(2), pp. 1-14;

DEMICHEVA, E.; CUI, Y. F.; BARDWELL, P.; BARGHORN, S.; KRON, M.; MEYER, A. H.; SCHMIDT, M.; GERLACH, B.; LEDDY, M.; BARLOW, E.;

O'CONNOR, E.; CHOI, C. H.; HUANG, L.; VELDMAN, G. M.; RUS, H.; HABANZADEH, A. P.; TASSEW, N. G.; MONNIER, P. P.; MÜLLER, T.; CALABRESI, P. A.; SCHOEMAKER, H.; MUELLER, B. K. (2015). *Targeting repulsive guidance molecule A to promote regeneration and neuroprotection in multiple sclerosis*. Cell. Rep., 10(11), pp. 1887-98;

DIMARIO, J. X.; STOCKDALE, F. E. (1997). *Both myoblast lineage and innervation determine fiber type and are required for expression of the slow myosin heavy chain 2 gene*. Developmental Biology, 188(1), pp. 167-80;

DUTT, V.; GUPTA, S.; DABUR, R.; INJETI, I.; MITTAL, A. (2015). *Skeletal muscle atrophy: potential therapeutic agents and their mechanisms of action*. Pharmacological Research, 99 (2015), pp. 86-100;

FIELITZ, J.; KIM, M. S.; SHELTON, J. M.; LATIF, S.; SPENCER, J. A.; GLASS, D. J.; RICHARDSON, J. A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. (2007), *Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3*. J. Clin. Invest., 117, pp. 2486–2495;

EBERT, S. M.; DYLE, M. C.; KUNKEL, S. D.; BULLARD, S. A.; BONGERS, K. S.; FOX, D. K.; DIERDOFF, J. M.; FOSTER, E. D.; ADAMS, C. M. (2012). *Stress-Induced Skeletal Muscle Gadd45a Expression Reprograms Myonuclei and Causes Muscle Atrophy*. J Bio Chem, 287(33), pp. 27290-301;

FITZGERALD, D. P.; SEAMAN, C.; COOPER, H. M. (2006). *Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo*. Dev. Dyn., 235(6), pp. 1720-5;

FOLETTA, V. C.; WHITE, L. J.; LARSEN, A. E.; LÉGER, B.; RUSSELL, A. P. (2011). *The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy*. Pflugers Arch., 461(3), pp. 325-35;

FURUNO, K.; GOODMAN, M. N.; GOLDBERG, A. L. (1990). *Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy*. J. Biol. Chem., 265, pp. 8550-8557;

GALLO, G.; LETOURNEAU, P.C.(2004). *Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues*. Journal of Neurobiology, 58(1), pp. 92-102;

GEISBRECHT, B. V.; DOWD, K. A.; BARFIELD, R. W.; LONGO, P. A.; LEAHY, D. J. (2003). *Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin*. The Journal of Biological Chemistry, 278(35), pp. 32561-8;

- GLASS, D. J. (2010). *PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 346, pp. 267-78;
- GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A.; GOLBERG, A. L. (2001). *Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 4;98(25);
- HADDAD, F.; ROY, R.; ZHONG, H.; EDGERTON, V.; BALDWIN, K. (2003) *Atrophy responses to muscle inactivity. I. Cellular markers of protein deficits*. *J. Appl. Physiol.*, 95, pp. 781-790;
- HAMRICK, M. W. (2014). *The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle-bone crosstalk*. *BoneKEy*, 1;
- HARADA, K.; FUJITA, Y.; YAMASHITA, T. (2016). *Repulsive guidance molecule A suppresses angiogenesis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 469(4), pp. 993-9;
- HATA, K.; FUJITANI, M.; YASUDA, Y.; DOYA, H.; SAITO, T.; YAMAGISHI, S.; MUELLER, B. K.; YAMASHITA, T. (2006). *RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury*. *J. Cell. Biol.*, 173(1), pp. 47-58;
- HITACHI, K. & TSUCHIDA, K. (2014). *Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy*. *Frontier in Physiology*, 4 (408), pp. 1-7;
- HOIER, B. & HELLSTEN, Y. (2014). *Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF*. *Microcirculation*, 21, pp. 301-314;
- JACKMAN, R. W. & KANDARIAN, S. C. (2004). *The molecular basis of skeletal muscle atrophy*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 287, pp. 834-843;
- JORGE, E. C.; MELO, C. M. R.; ROSÁRIO, M. F.; ROSSI, J. R. .; LEDUR, M. C.; MOURA, A. S. A. M. T.; COUTINHO, L. L. (2010) *Chicken skeletal muscle-associated macroarray for gene discovery*. *Genet. Mol. Res.*, 9(1), pp. 188-207;
- JORGE, E. C.; AHMED, M. U.; BOTHE, I.; COUTINHO, L. L.; DIETRICH, S. (2012). *RGMa and RGMb expression pattern during chicken development suggest unexpected roles for these repulsive guidance molecules in notochord formation, somitogenesis, and myogenesis*. *Developmental Dynamics*, 241, pp. 1886-1900;

JUQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. (2008). *Histologia Básica*. 11^a ed. Guanabara Koogan, 2008, pp. 183;

KAMEI, Y.; MIURA, S.; SUZUKI, M.; KAI, Y.; MIZUKAMI, J.; TANIGUCHI, T.; MOCHIDA, K.; HATA, T.; MATSUDA, J.; ABURATANI, H. (2004). *Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control*. *J. Biol. Chem.*, 279, pp. 41114-41123;

KANG, J. S.; YI, M. J.; ZHANG, W.; FEINLEIB, J. L.; COLE, F.; KRAUSS, R. S. (2004). *Netrins and neogenin promote myotube formation*. *The Journal of Cell Biology*, 167, pp. 493-504;

KEDAR, V.; MCDONOUGH, H.; ARYA, R.; LI, H. H.; ROCKMAN, H. A.; PATTERSON, C. (2004). *Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(52), pp. 18135-18140;

KUNINGER, D.; KUZMICKAS, R.; PENG, B.; PINTAR, J.; ROTWEIN, P. (2004). *Gene discovery by microarray: identification of novel genes induced during growth factor-mediated muscle cell survival and differentiation*. *Genomics*, 84, pp. 876-889;

KUNINGER, D.; KUZMICKAS, R.; PENG, B.; PINTAR, J.; ROTWEIN, P. (2004). *Gene discovery by microarray: identification of novel genes induced during growth factor-mediated muscle cell survival and differentiation*. *Genomics*, 84, pp. 876-889;

LIZUKA, K.; MACHIDA, T.; HIRAFUJI, M. (2014). *Skeletal muscle is an endocrine organ*. *J. Pharmacol.*, 125, pp. 125-131;

LOKIREDDY, S.; WIJESOMA, I. W.; SZE, S. K.; MCFARLANE, C.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M. (2012). *Identification of atrogin-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 303, pp. 512–529;

LYNCH, G. S. (2001). *Therapies for improving muscle function in neuromuscular disorders*. *Exerc. Sport. Sci.*, 29, pp. 141-148;

MACDONALD, E. M.; ANDRES-MATEOS, E.; MEJIAS, R.; SIMMERS, J. L.; MI, R.; PARK, J.-S.; YING, S.; HOKE, A.; LEE, S.-J.; COHN, R. D. (2014). *Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition*. *Disease Models & Mechanisms*, 7, pp. 471-481;

MASSAGUE, J.; Seoane, J; Wotton, D. (2011). *Smad transcription factors*. Genes Dev., 19(23), pp. 2783-810;

MARTINS, A. F.; NETO, J. X.; AZAMBUJA, A.; SERENO, M. L.; FIGUEIRA, A.; CAMPOS-JUNIOR, P. H.; ROSÁRIO, M. F.; TOLEDO, C. B. B.; SILVA, G. A. B.; KITTEN, G. T.; COUTINHO, L. L.; DIETRICH, S.; JORGE, E. C. (2015). *Repulsive guidance molecules a,b and c are skeletal muscle proteins, and repulsive guidance molecule promotes cellular hypertrophy and is necessary for myotube fusion*. Cells Tissue Organs;

MATSUNAGA, E.; NAKAMURA, H.; CHÉDOTAL, A. (2006). *Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance*. J. Neurosci., 26(22), pp. 6082-8;

METZGER, M.; CONRAD, S.; ALVAREZ-BOLADO, G.; SKUTELLA, T.; JUST, L. (2005). *Gene expression of the repulsive guidance molecules during development of the mouse intestine*. Dev Dyn; 234, pp.169-175;

MIRAKAJ, V.; BROWN, S.; LAUCHER, S.; STEINL, C.; KLEINM, G.; KOHLER, D.; SKUTELLA, T.; MEISEL, C.; BROMMER, B.; ROSENBERGER, P.; SCHWAB, J. M. (2011). *Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation*. Proc Natl Acad Sci USA, 108(16), pp. 6555-60;

MITCH, W. E. & GOLDBERG, A. L. (1996). *Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway*. N. Engl. J. Med., 335, pp. 1897-1905;

MONNIER, P.P.; SIERRA, A.; MACCHI, P.; DEITINGHOFF, L.; ANDERSEN, J.S.; MANN, M.; FLAD, M.; HORNBERGER, M.R.; STAHL, B.; BONHOEFFER, F.; MUELLER, B.K. (2002). *RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons*. Nature 419, pp. 392-395;

MORESI, V.; WILLIAMS, A. H.; MEADOWS, E.; FLYNN, J. M.; POTTHOFF, M. J.; MCANALLY, J.; SHELTON, J. M.; BACKS, J.; KLEIN, W. H.; RICHARDSON, J. A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. (2010). *Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases*. Cell, 143, pp. 35-45;

MÜLLER, T.; TROMMER, I.; MUHLACK, S.; MUELLER, B. K. (2016). *Levodopa increases oxidative stress and repulsive guidance molecule A levels: a pilot study in patients with Parkinson's disease*. J. Neural Transm. (Vienna), 123(4), pp. 401-6;

MUSUMECI, C.; CASTROGIOVANNI, P.; COLEMAN, R.; SZYCHLINSKA, M. A.; SALVATORELLI, L.; PARENTI, R.; MAGRO, G.; IMBESI, R. (2015).

Somitogenesis: From somite to skeletal muscle. Acta Histochem., 117 (4-5), pp. 313-28;

NICKS, D. K.; BENEKE, W.; KEY, R. (1989). *Muscle fiber size and number following immobilization atrophy.* Journal of Anatomy, 163, pp. 1-5;

NIE, M.; DENG, Z. L.; LIU, J.; WANG, D. Z. (2015). *Noncoding RNAs, emerging regulators of skeletal muscle development and diseases.* BioMed Res. Int., 2015, pp. 1-17;

NIEDERKOFLE, V.; SALIE, R.; SIGRIST, M.; ARBER, S. (2004). *Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system.* J. Neurosci., 24(4), pp. 808-18;

NOHRA, R.; BEYEEN, A. D.; GUO, J. P.; KHADEMI, M.; SUNDQVIST, E.; HEDREUL, M. T.; SELLEBJERG, F.; SMESTAD, C.; OTURAI, A. B.; HARBO, H. F.; WALLSTRÖM, E.; HILLERT, J.; ALFREDSSON, L.; KOCKUM, I.; JAGODIC, M.; LORENTZEN, J.; OLSSON, T. (2010). *RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis.* Genes Immun., 11(4), pp. 279-93;

OLDEKAMP, J.; KRAMER, N.; ALVAREZ-BOLADO, G.; SKUTELLA, T. (2004). *Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development.* Gene Expr. Patterns, 4, pp. 283-288;

PATERSON, D. A.; REID, C. P.; ANDERSON, T. J.; HAWKINS, R. A. (1990). *Assessment of oestrogen receptor content of breast carcinoma by immunohistochemical techniques on fixed and frozen tissue and by biochemical, ligand binding assay.* J. Clin Pathol, pp. 46-51;

PEDERSEN, B. K. (2011). *Muscle and their myokines.* J. Exp. Biol., 214, pp. 337-346;

POLGE, C.; HENG, A. E.; JARZAGUET, M.; VENTADOUR, S.; CLAUSTRE, A.; COMBARET, L.; BECHET, D.; MATONDO, M.; UTTENWEILER-JOSEPH, S.; MONSARRAT, B. (2011). *Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1.* FASEB J., 25, pp. 3790–3802;

RAJAGOPALAN, S.; DEITINGHOFF, L.; DAVIS, D.; CONRAD, S.; SKUTELLA, T.; CHEDOTAL, A.; MUELLER, B. K.; STRITTMATTER, S. M. (2004). *Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule.* Nature Cell Biology, 6, pp. 756-762;

RASCHKE, S. & ECKEL, J. (2013). *Adipo-myokines: two sides of the same coin – mediators of inflammation and mediators of exercise*. *Mediat Inflamm*, 320724;

ROSENZWEIG, B. L.; IMAMURA, T.; OKADOME, T.; COX, G. N.; YAMASHITA, H.; TEN DIJKE, P. (1995). *Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(17), pp. 7632-6;

SACHECK, J. M.; HYATT, J. P. K.; RAFFAELLO, A.; JAGOE, R. T.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. (2007). *Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic disease*. *The FASEB Journal*, 21, pp. 140-155;

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRI, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. (2004). *Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy*. *Cell*, 117, pp. 399-412;

SAMAD, T. A.; REBBAPRAGADA, A.; BELL, E.; ZHANG, Y.; SIDIS, Y.; JEONG, S. J.; CAMPAGNA, J. A.; PERUSINI, S.; FABRIZIO, D. A.; SCHENEYER, A. L.; LIN, H. Y.; BRIVANIOU, A. H.; ATTISANO, L.; WOOLF, C. J. (2005). *DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor*. *J. Biol. Chem.*, 280, pp. 14122-14129;

SARTORI, R.; SCHIRWIS, E.; BLAAU, B.; BORTOLANZA, S.; ZHAO, J.; ENZO, E.; STANTZOU, A.; MOUISEL, E.; TONIOLO, L.; FERRY, A.; STRICKER, S.; GOLDBERG, A. L.; DUPONT, S.; PICCOLO, S.; AMTHOR, H.; SANDRIL, M. (2013). *BMP signaling controls muscle mass*. *Nat Genet.* 45(11), pp. 1309-18;

SCHIAFFINO, S.; DYAR, K. A.; CICILIOT, S.; BLAAUW, B.; SANDRI, M. (2013). *Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy*. *FEBS J.*, 280(17), pp. 4294-314;

SCHMIDTMER, J. & ENGELKAMP, D. (2004). *Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm*. *Gene Expr Patterns*, 4(1), pp. 105-10;

SCOTT, H. S.; KUDOH, J.; WATTENHOFER, M.; SHIBUYA, K.; BERRY, A.; CHRAST, R.; GUIPPONI, M.; WANG, J.; KAWASAKI, K.; ASAKAWA, S.; MINOSHIMA, S.; YOUNUS, F.; MEHDI, S. Q.; RADHAKRISHNA, U.; PAPASAVVAS, M. P.; GEHRIG, C.; ROSSIER, C.; KOROSTISHEVSKY, M.; GAL, A.; SHIMIZU, N.; BONNE-TAMIR, B.; ANTONARAKIS, S. E. (2001). *Insertion of β -satellite repeats identifies a transmembrane protease causing*

both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. Nat Genet, 27, pp. 59-63;

SACHECK, J. M.; HYATT, J. P.; RAFAELLO, A.; JAGOE, R. T.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. (2007). *Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic disease. FASEB J., 21(1), pp. 140-55;*

SCHMIDTMER, J.; ENGELKAMP, D. (2003). *Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick RGM. Gene Expr. Patterns., 4(1), pp.105-10;*

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. (2003). *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell, 113(6), pp. 685-700;*

SHI, J.; WANG, E.; MILAZZO, J. P.; WANG, Z.; KINNEY, J. B.; VAKOC, C. R. (2015). *Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. Nature Biotechnology, 33, pp. 661-667;*

SIEBOLD, C; YAMASHITA, T.; MONNIER, P. P.; MUELLER, B. K.; PASTERKAMP, R. J. (2017). *RGMs: Structural Insights, Molecular Regulation, and Downstream Signaling. Trends Cell Biol., 27(5), pp. 365-378;*

SOUTHGATE, R. J.; NEIL, B.; PRELOVSEK, O.; EL-OSTA, A.; KAMEI, Y.; MIURA, S.; EZAKI, O.; MCLOUGHLIN, T. J.; ZHANG, W.; UTERMAN, T. G. (2007). *FOXO 1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. J. Biol. Chem., 282, pp. 21176-21186;*

STARON, R. S.; PETTE, D. (1993). *The continuum of pure and hybrid myosin heavy chainbased fibre types in rat skeletal muscle. Histochemistry, 100, pp. 149-153;*

TASSEW, N. G.; CHARISH, J.; SEIDAH, N. G.; MONNIER, P. P. (2012). *SKI-1 and Furin generate multiple RGMa fragments that regulate axonal growth. Dev. Cell., 22(2), pp. 391-402;*

TESSIER, S. N. & STOREY, K. B. (2016). *Lessons from mammalian hibernators: molecular insights into striated muscle plasticity and remodeling. Biomol. Concepts, 7(2), pp. 69-92;*

TEWS, D. S. (2005). *Muscle-fiber apoptosis in neuromuscular diseases. Muscle & nerve, 32, pp. 443-458;*

TIAN, C. & LIU, J. (2013). *Repulsive guidance molecules (RGMs) and neogenin in bone morphogenetic protein (BMP) signaling*. Mol. Reprod. Dev., 80(9), pp. 700-1;

TINTIGNAC, L. A.; LAGIRAND, J.; BATONNET, S.; SIRRI, V.; LEBOVITCH, M. P.; LEBOVITCH, S. A. (2005). *Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase*. J. Biol. Chem., 280, pp. 2847–2856;

TISCHLER, M. E.; ROSENBERG, S.; SATARUG, S.; HENRIKSEN, E. J.; KIRBY, C. R.; TOME, M.; CHASE, P. (1990) *Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle*. Metab. Clin. Exp., 39, pp. 756-763;

VAN DAM, P. A.; WATSON, J. V.; LOWE, D. G.; CHARD, T.; SHEPHERD, J. H. (1992). *Comparative Evaluation of Fresh, Fixed, and Cryopreserved Solid Tumor Cells for Reliable Flow Cytometry of DNA and Tumor Associated*. Cytometry, 13(7), pp. 722-729;

VAN DEN HEUVEL, D. M. A.; HELLEMOS, A. J. C. G. M.; PASTERKAMP, R. J. (2013). *Spatiotemporal Expression of Repulsive Guidance Molecules (RGMs) and Their Receptor Neogenin in the Mouse Brain*. Plos One, 8(2): e55828;

VIELMETTER, J.; KAYYEM, J. F.; ROMAN, J. M.; DREYER, W. J. (2009). *Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer*. J. Cell Biol., 127(6 pt 2), pp. 2009-20;

XIA, Y.; YU, P. B.; SIDIS, Y.; BEPPU, H.; BLOCH, K. D.; SCHNEYER, A. L.; LIN, H. Y. (2007). *Repulsive Guidance Molecule RGMa Alters Utilization of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptors by BMP2 and BMP4*. The Journal of Biological Chemistry, 282, 25, pp. 18129-18140;

YAMASHITA, H.; TEN DIJKE, P.; HUYLEBROECK, D.; SAMPATH, T. K.; ANDRIES, M.; SMITH, J. C. (1995). *Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activating-like effects*. J. Cell Biol., 130(1), pp. 217-26;

ZINNA, E. M.; YARASHESKI, K. E. (2003). *Exercise treatment to counteract protein wasting of chronic diseases*. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 6, pp. 87-93.