Vanessa Rodrigues Rizzato

Envolvimento da neuraminidase-1 na atrofia muscular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestra em Ciências

Programa de Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo
2014

Vanessa Rodrigues Rizzato

Envolvimento da neuraminidase-1 na atrofia muscular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestra em Ciências

Programa de Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rizzato, Vanessa Rodrigues

Envolvimento da neuraminidase-1 na atrofia muscular / Vanessa Rodrigues
Rizzato. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Neuraminidase 2.Sialidose 3.Atrofia muscular 4.Denervação
muscular 5.Camundongos Knockout 6.Autofagia 7.Glicoproteínas de membrana
associadas ao lisossomo 8.Quinase da glicogênio sintase 9.Complexos ubiquitina-
proteína ligase 10.Tecido conjuntivo/patologia 11.Colágeno tipo III

USP/FM/DBD-240/14

A minha família e ao André, pela
compreensão, auxílio e carinho principalmente
nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edmar Zanoteli, pela oportunidade de realizar este projeto, pelos conhecimentos transmitidos, pelo acompanhamento e ajuda em todas as etapas de realização do trabalho.

Aos colegas e colaboradores do Lim 45, Alan Fappi, Juliana de Carvalho Neves, Geiza Xavier, Mariana Miranda Garcia, Tiago Suzuki Godoy, Chary Ely Batista e Francisco Marcos Alencar Silva por todo o auxílio e apoio.

À pesquisadora Jessica Ruivo Maximino, pelas sugestões que ajudaram a enriquecer este estudo.

À Prof^a Alessandra d'Azzo do *St. Jude Children's Research Hospital* (Memphis, EUA) por ceder as matrizes dos camundongos utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Gerson Chadi pela cooperação.

Aos funcionários do LIM 45, Sarah de Souza Gomes, Gilmar Silva e Iolanda Oruê, pelo apoio.

Aos colegas dos LIMs 15, 22 e 24, especialmente à Eliene Campos pela disponibilização e o auxílio no uso de equipamentos.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^a. Dr^a. Lydia Uraco Yamamoto e Prof^a. Dr^a. Rosely Oliveira, pelas sugestões para o melhoramento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Nitrini e ao programa de pós-graduação, pela oportunidade.

A minha família e amigos por toda compreensão e apoio.

Ao meu querido André, por todo amor, auxílio e carinho durante essa etapa da minha vida.

À FAPESP (2011/03857-4) e CAPES pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	1
2.1 Função das Neuraminidases	1
2.2 Doenças envolvidas com a deficiência da enzima Neu1	2
2.3 Sialidoses I e II	3
2.4 Mecanismos fisiopatogênicos da sialidose	3
2.5 Atrofia muscular	4
2.6 Atrofia muscular relacionada ao sistema lisossomal/autofágico.....	5
2.7 Atrofia muscular relacionada ao sistema da ubiquitina-proteassomo	6
2.8 Modelo animal para estudo da sialidose.....	9
2.9 Neu1 e músculo esquelético.....	10
2.10 Neu1 e a capacidade invasiva de tecidos.....	11
2.11 Atrofia muscular induzida por desnervação.....	11
3. Justificativa	12
4. Objetivos	14
5. Métodos	16
5.1 Animais	16
5.2 Genotipagem e expansão da colônia	17
5.3 Indução de atrofia muscular in vivo através de desnervação.....	18
5.4 Análise histológica	19

5.5	Reação de fosfatase ácida.....	20
5.6	Análise ultraestrutural	21
5.7	Reações imunoistoquímicas	21
5.8	Eletroforese SDS-PAGE (Western blotting)	22
5.9	Extração de RNA e síntese de DNA complementar.....	25
5.10	PCR em tempo real (RT-PCR).....	25
5.11	Análise estatística.....	27
6.	Resultados	28
6.1	Peso dos animais e dos músculos gastrocnêmios	28
6.2	Análise histológica	29
6.3	Mensuração da atrofia muscular	33
6.4	Análise ultraestrutural	34
6.5	Análise da ativação do sistema lisossomal/autofágico	36
6.5.1	Expressão proteica de LC3.....	36
6.5.2	Fosfatase ácida.....	39
6.5.3	Análise da expressão proteica de catepsina L.....	40
6.5.4	Análise da expressão proteica de lamp1.....	41
6.6	Análise da expressão proteica de colágeno III	44
6.7	Análise da via IGF-1/PI-3k/Akt	44
6.8	Análise da ativação do sistema ubiquitina-proteassomo.....	47
6.9	Análise da expressão proteica de MyoD	48
6.10	Análise da expressão gênica de neuraminidases.....	48
7.	Discussão	51
8.	Conclusões.....	57
9.	Anexos	58
10.	Referências.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	do inglês <i>avidin biotin complex</i>
AIDS	do inglês <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Akt/PKB	do inglês <i>protein kinase-B</i>
ANOVA	do inglês <i>analysis of variance</i>
Apg	do inglês <i>autophagy protein</i>
Atg	do inglês <i>autophagy-related gene</i>
BSA	do inglês <i>bovine serum albumin</i>
DAB	diaminobenzidina
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	do inglês <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
ECM	do inglês <i>extracellular matrix</i>
EDTA	do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eIF2B	do inglês <i>eukaryotic initiation factor 2</i>
FITC	do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FoxO	do inglês <i>Forkhead box</i>
GA	gastrocnêmio
GAD	gastrocnêmio direito
GAE	gastrocnêmio esquerdo
β-gal	β-galactosidase
GAPDH	do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GS	galactosialidose
GSK3β	do inglês <i>glycogen synthase kinase-3</i>
H&E	hematoxilina & eosina
HECT	do inglês <i>homologous to the E6-AP carboxyl terminus</i>
IGF-1	do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>
IGF-2	do inglês <i>insulin-like growth factor 2</i>
IgG	imunoglobulina G
lamp1	do inglês <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
lamp2	do inglês <i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>

LC3	do inglês <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
MAFbx	do inglês <i>muscle atrophy F-box</i>
MEC	matriz extracelular
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MMP	do inglês <i>matrix metalloproteinase</i>
MRFs	do inglês <i>myogenic regulatory factors</i>
mTOR	do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i>
Myf	do inglês <i>myogenic factor</i>
MuRF1	do inglês <i>muscle RING-finger protein-1</i>
MyHC	do inglês <i>myosin heavy chain</i>
MyoD	do inglês <i>myogenic differentiation factor D</i>
NaCl	cloreto de sódio
Neu1	N-acetil- α -neuraminidase1
Neu2	N-acetil- α -neuraminidase2
Neu3	N-acetil- α -neuraminidase3
Neu4	N-acetil- α -neuraminidase4
P-Akt	do inglês <i>phosphorylated Akt</i>
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	do inglês <i>phosphate buffered saline with tween</i>
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF-BB	do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>
P-GSK3 β	do inglês <i>phosphorylated GSK3β</i>
PI-3K	do inglês <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPCA	do inglês <i>serine carboxypeptidase protective protein/cathepsin A</i>
PVDF	do inglês <i>polyvinylidene fluoride</i>
qPCR	do inglês <i>quantitative PCR</i>
RIPA	do inglês <i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	do inglês <i>real time PCR</i>
SCF	do inglês <i>Skp1-Cul1-F-box</i>
SDS	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SUP	sistema ubiquitina-proteassomo
TBS	do inglês <i>tris buffered saline</i>
TBS-T	do inglês <i>tris buffered saline with tween</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
WB	do inglês <i>Western blot</i>

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para genotipagem.	18
Quadro 2: Lista de anticorpos utilizados no estudo.....	24
Quadro 3: Oligonucleotídeos utilizados no estudo de expressão gênica através de RT-PCR.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas intracelulares de degradação proteica	5
Figura 2. Formação de autofagossomos em células de mamíferos	6
Figura 3. Imagem representativa do nocauteamento do gene <i>Neu1</i> realizado no modelo animal <i>Neu1^{-/-}</i>	9
Figura 4. Imagem comparativa de animal <i>Neu1^{+/+}</i> e de animal <i>Neu1^{-/-}</i>	17
Figura 5. Genotipagem dos camundongos	18
Figura 6. Procedimento de secção do nervo ciático	19
Figura 7. Mensuração da área de secção transversa de fibra muscular	20
Figura 8. Peso dos animais	28
Figura 9. Pesos dos músculos gastrocnêmios	29
Figura 10: Análise histológica após 0 e 3 dias de desnervação	30
Figura 11: Análise histológica após 7 dias de desnervação	31
Figura 12. Análise histológica após 14 dias de desnervação	32
Figura 13. Análise histológica após 21 dias de desnervação	33
Figura 14. Área de secção transversa das fibras musculares após desnervação	34
Figura 15. Ultraestrutura de músculos de animais <i>Neu1^{+/+}</i> e <i>Neu1^{-/-}</i>	35
Figura 16. Reação de imunofluorescência indireta com anticorpo anti-LC3	37
Figura 17. Expressão proteica de LC3	39
Figura 18. Análise histológica de atividade lisossomal	40
Figura 19: Expressão proteica de catepsina L	41
Figura 20. Reação de imunofluorescência indireta com anticorpo anti-lamp1	42
Figura 21. Expressão proteica de lamp1	43
Figura 22. Reação de imunoistoquímica com anticorpo anti-colágeno III	44

Figura 23. Expressão proteica de Akt e GSK3 β	46
Figura 24. Expressão relativa dos genes <i>Atrogin-1</i> e <i>MuRF1</i>	47
Figura 25. Expressão proteica de MyoD	48
Figura 26. Expressão relativa do gene <i>Neu1</i>	49
Figura 27. Expressão relativa do gene <i>Neu2</i>	49
Figura 28. Expressão relativa do gene <i>Neu3</i>	50
Figura 29. Expressão relativa do gene <i>Neu4</i>	50

Rizzato, VR. *Envolvimento da neuraminidase-1 na atrofia muscular* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Resumo

Sialidose é uma doença neurossomática causada pela deficiência congênita da neuraminidase-1 (Neu1), enzima envolvida na regulação do catabolismo de sialoglicoconjugados nos lisossomos. Com o acúmulo de sialoglicoconjugados, ocorre comprometimento sistêmico e neurológico. Achados histológicos musculares incluem expansão da matriz extracelular (MEC) devido à proliferação anormal de fibroblastos, invasão das fibras musculares por componentes da MEC, fragmentação do citoplasma, formação vacuolar e atrofia das fibras musculares. Entretanto o mecanismo da atrofia muscular na deficiência de Neu1 não está completamente esclarecido, sendo o objetivo desse estudo. Desnervou-se o músculo gastrocnêmio direito de camundongos com deficiência de Neu1 (*Neu1^{-/-}*) e de controles *Neu1^{+/+}*. Os animais foram eutanasiados 0, 3, 7, 14 e 21 dias pós desnervação. Os músculos desnervados e contralaterais foram submetidos às seguintes análises: 1) histologia geral e medida da área transversa das fibras; 2) autofagia, através da avaliação da presença de vacúolos autofágicos por estudo ultraestrutural e da análise da expressão da proteína LC3; 3) ativação do sistema lisossomal, por reação de fosfatase ácida e análise da expressão proteica de catepsina L e lamp1; 4) deposição de colágeno e infiltração de tecido conjuntivo no tecido muscular; 5) níveis das proteínas Akt e GSK3 β ; 6) expressão dos atrogenes *MuRF1* e *Atrogina-1*; 7) níveis da proteína MyoD, relacionada à diferenciação muscular; e 8) expressão dos genes *Neu1*, *Neu2*, *Neu3* e *Neu4*. Os animais *Neu1^{-/-}* apresentaram menor peso corporal e muscular comparando-se com animais *Neu1^{+/+}*. Houve redução progressiva da área das fibras dos músculos desnervados em relação aos músculos contralaterais. Os animais *Neu1^{-/-}* apresentaram atrofia muscular basal, com aumento acentuado dos espaços endomisiais e perimisiais. Ocorreu formação de vacúolos autofágicos a partir de 14 dias de desnervação tanto em animais *Neu1^{+/+}* quanto em *Neu1^{-/-}*. Os níveis de expressão proteica de catepsina L e de lamp1 aumentaram a partir de 14 dias de desnervação, mais notadamente em músculos desnervados de camundongos *Neu1^{-/-}*. A expressão proteica de colágeno III mostrou-se aumentada em animais *Neu1^{-/-}*, principalmente após desnervação. A expressão proteica da forma fosforilada do Akt (forma ativada) diminuiu após 21 dias de desnervação principalmente em músculos desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Os níveis de P-GSK3 β , forma inativa de GSK3 β , diminuíram após a desnervação, em animais *Neu1^{+/+}* e animais *Neu1^{-/-}*. Houve aumento na expressão gênica de *Atrogina-1* e *MuRF1* após 3 e 7 dias de desnervação, respectivamente; a expressão gênica de *Atrogina-1* nos camundongos *Neu1^{-/-}* teve um aumento atrasado, mostrando diferença significativa após 7 dias de desnervação. Não houve diferença significativa entre níveis proteicos de MyoD. A expressão gênica de *Neu1* mostrou-se elevada em músculos desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Conclui-se, portanto, que a Neu1 parece atuar na regulação da massa muscular principalmente controlando o processo de ativação do sistema lisossomal, porém aparentemente sem afetar a autofagia.

Descritores: neuraminidase, sialidose, atrofia muscular, denervação muscular, camundongos knockout, autofagia, glicoproteínas de membrana associadas ao lisossomo, quinase da glicogênio sintase, complexos ubiquitina-proteína ligase, tecido conjuntivo/patologia, colágeno tipo III.

Rizzato, VR. *The role of neuraminidase-1 in muscle atrophy* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Abstract

Sialidosis, a severe neurosomatic disease, results from congenital neuraminidase-1 (Neu1) deficiency. This enzyme regulates the catabolism of sialoglycoconjugates in the lysosomes. Systemic and neurologic manifestations occur due to the sialoglycoconjugates accumulation. In the mouse model for Neu1 deficiency, the muscle histologic findings include extracellular matrix (ECM) expansion, due to abnormal fibroblast proliferation, muscle fibers invasion by ECM components, cytoplasm fragmentation, vacuolar formation and muscle atrophy. Nevertheless the mechanisms of muscle atrophy in Neu1 deficiency are not completely known. This study was designed to investigate Neu1 involvement in muscle atrophy process. Denervation of gastrocnemius muscle was performed by sectioning sciatic nerve from Neu1 deficient mice (*Neu1*^{-/-}) and from normal control *Neu1*^{+/+}; the animals were euthanized 0, 3, 7, 14 and 21 days after denervation. Denervated and control muscles were collected and submitted to several analysis: 1) histological; 2) autophagic vacuoles formation, performed by ultrastructural analysis and LC3 protein expression; 3) acid phosphatase reaction, lamp1 and cathepsin L protein expression, to analyze lysosomal activation; 4) collagen deposition and fibrous formation; 5) proteins involved with muscle trophism, Akt and GSK3 β ; 6) *MuRF1* and *Atrogin-1* gene expression; 7) MyoD protein expression; 8) *Neu1*, *Neu2*, *Neu3* and *Neu4* genes expression. *Neu1*^{-/-} mice presented decreased body and muscle weight comparing to *Neu1*^{+/+} animals. Muscle fiber cross-sectional area was reduced in denervated muscles comparing to contralateral muscles. *Neu1*^{-/-} mice muscles presented basal atrophy and increase of endomysial and perimysial spaces, which became more evident after denervation. After 14 days of denervation, autophagosome formation was noticed on *Neu1*^{+/+} and *Neu1*^{-/-} animals. Cathepsin L protein levels were increased after 14 and 21 days of denervation, especially in denervated muscles from *Neu1*^{-/-} mice. Lamp1 protein expression was increased in *Neu1*^{-/-} animals. Type III collagen protein levels were increased in *Neu1*^{-/-} animals. There were no significant differences between MyoD protein levels. P-Akt, active form of Akt protein levels, decreased after 21 days of denervation, especially in denervated muscles from control group animals, indicating that protein synthesis is decreased. P-GSK3 β , inactive form of GSK3 β decreased in denervated muscles from *Neu1*^{-/-} and *Neu1*^{+/+} animals, which indicates that this protein remained activated during muscle atrophy process. There were significant differences in *Atrogin-1* and *MuRF1* gene expression levels after 3 and 7 days of denervation. *Neu1*^{-/-} animals muscles presented a delayed *Atrogin-1* response. *Neu1* gene expression was increased in denervated muscles from *Neu1*^{+/+} mice. These findings suggest that Neu1 seems to act in the regulation of muscle mass mainly by controlling the process of lysosomal system activation, but apparently without affecting autophagy.

Descriptors: neuraminidase, sialidosis, muscular atrophy, muscle denervation, knockout mice, autophagy, lysosome-associated membrane glycoproteins, glycogen synthase kinase, ubiquitin-protein ligase complexes, connective tissue/pathology, collagen type III.

1. Introdução

Sialidose é uma doença rara, de herança autossômica recessiva, pertencente ao grupo de doenças de armazenamento lisossomal que ocorre devido à deficiência da neuraminidase-1, enzima da classe das sialidases. As sialidases são enzimas que clivam e controlam a quantidade de ácido siálico das porções terminais de grupos carboidratos, glicolipídeos e glicoproteínas. O ácido siálico se relaciona com importantes processos biológicos, tais como as mudanças conformacionais das glicoproteínas (**Varki & Schauer, 2009**). Dentre os aspectos clínicos da sialidose, pacientes afetados apresentam atrofia muscular (**Thomas, 2001, Zanoteli; et al., 2010**). Um modelo animal que simula a sialidose em camundongos foi criado por **de Geest et al. (2002)** com intuito de estudar os processos patológicos envolvidos no desenvolvimento da doença e melhor compreender a função da neuraminidase-1, sendo estes camundongos denominados *Neu1^{-/-}* por possuírem o gene da Neu1 nocauteado. O modelo animal foi objeto de estudo que detectou alterações musculares na deficiência de Neu1 (**Zanoteli et al., 2010**). O processo de degeneração muscular observado na musculatura esquelética desses camundongos apresentou, principalmente, invasão do tecido muscular por fibroblastos e redução do tamanho da área transversa das fibras musculares. A atividade lisossomal, que neste modelo animal é alterada, é considerada um importante meio de degradação muscular em diversos modelos de atrofia, tais como pela ação de glicocorticoides (**Schiaffino et al., 2013**) e na atrofia muscular induzida pela desnervação (**Mizushima et al. 2004**). Desta forma, surgiu o interesse em avaliar os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da atrofia muscular que ocorre na deficiência da Neu1, o que poderia trazer informações adicionais quanto à importância da regulação da sialilação de diversas proteínas, bem como da função lisossomal, na regulação da massa muscular.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Função das Neuraminidases

As sialidases são enzimas que em cooperação com as sialiltransferases, clivam e

controlam a quantidade de ácido siálico das porções terminais de grupos carboidratos, glicolipídeos e glicoproteínas. A presença de ácido siálico nesses compostos está relacionada com importantes processos biológicos, tais como mudanças conformacionais das glicoproteínas e o reconhecimento e marcação de sítios biológicos de moléculas, além de seus sítios de ligação nas células (**Varki & Schauer, 2009**). Quatro tipos geneticamente distintos de sialidasas foram identificados em células animais, estando localizadas nos lisossomos (neuraminidase-1 ou Neu1), no citoplasma (Neu2), na membrana plasmática (Neu3) e nas mitocôndrias e lúmen lisossomal (Neu4) (revisto por **Miyagi e Yamaguchi, 2012**). A N-acetil- α -neuraminidase1 (Neu1) adquire conformação ativa e estável nos lisossomos através da associação com a PPCA (*serine carboxypeptidase protective protein/cathepsin A*) e faz parte de um complexo multi protéico de alto peso molecular contendo PPCA, β -galactosidase (β -gal) e a sulfatase N-acetilgalactosamina-6-sulfato (**Bonten et al., 1996**). A formação deste complexo protege a Neu1 contra rápida proteólise e mantém sua conformação ativa cataliticamente.

2.2 Doenças envolvidas com a deficiência da enzima Neu1

A deficiência da Neu1 em humanos está associada a duas doenças lisossomais de depósito de herança autossômica recessiva, geneticamente distintas: a sialidose, resultante de mutações no gene *NEU1*, localizado no *locus* 6p21 (**Thomas, 2001**), e a galactosialidose (GS), que é causada pela deficiência primária na PPCA, acarretando instabilidade do complexo protéico e deficiência secundária da Neu1 e da β -gal (**d'Azzo et al., 2001**).

A galactosialidose decorre de mutações no *locus* 20q13 e causa três fenótipos distintos. A forma congênita ou da primeira infância é caracterizada por edema, ascite, hepatoesplenomegalia, comprometimento neurológico, insuficiência renal, dismorfismo facial e comprometimento visual com degeneração macular (*cherry-red spots*) que pode levar à cegueira. A forma de galactosialidose infantil é caracterizada por desenvolvimento mental normal ou pouco prejudicado. A forma juvenil e adulta é caracterizada por comprometimento neurológico progressivo, dismorfismo facial, disostose múltipla, comprometimento visual (*cherry-red spots* e opacidade da córnea) e

angioqueratomas. O diagnóstico da doença é feito através de análise cromatográfica de oligossacarídeos presentes na urina e o tratamento é apenas sintomático (INSERM, atualizado em 22 Jun 2014).

2.3 Sialidoses I e II

A sialidose é caracterizada pelo acúmulo tecidual e excreção urinária de oligossacarídeos e glicoproteínas sialilados (**Thomas, 2001**). Pacientes com sialidose desenvolvem um amplo espectro de manifestações clínicas, variando com a época do início e com a gravidade dos sinais e sintomas, correlacionando-se com os níveis de atividade enzimática residual da Neu1 (**Bonten et al., 2000**).

O diagnóstico da sialidose é dado através da detecção de sialoglicoconjugados na urina e o tratamento é apenas sintomático. A sialidose possui prevalência menor do que 1:1.000.000 e incidência menor do que 1:4.200.000 nascidos vivos (INSERM, atualizado em 22 Jun 2014) e divide-se em dois tipos. O tipo 1, forma mais branda da doença ocorre na segunda década de vida e resulta em perda progressiva de visão associada com degeneração macular (*cherry-red spots*), nistagmo, ataxia e síndrome mioclônica, sem alterações dismórficas significativas (**Thomas, 2001**) e tipo 2, forma mais grave da doença, que apresenta manifestações já no período perinatal, sendo caracterizada por hidropsia fetal, ascite neonatal, alterações dismórficas aspecto *Hurler-like*, disostose múltipla, hepatoesplenomegalia e grave comprometimento neurológico. Um subgrupo de pacientes com sialidose desenvolve sintomas de envolvimento muscular, incluindo hipotonia, atrofia e deformidades osteoesqueléticas (**Bonten et al., 2000**). Entretanto, os mecanismos envolvidos na atrofia muscular causada por deficiência de Neu1 ainda não foram totalmente desvendados.

2.4 Mecanismos fisiopatogênicos da sialidose

Os mecanismos pelos quais a deficiência da Neu1 acarreta comprometimento de vários tecidos têm sido investigados e ainda não foram totalmente esclarecidos. A principal alteração histológica observada, tanto em pacientes quanto em modelos animais com deficiência de Neu1, inclui vacuolização do citoplasma de vários tipos

celulares tais como fibroblastos, linfócitos, células de Kupffer, hepatócitos, células renais, neurônios, músculo cardíaco e esquelético. (Lowden & O'Brien, 1979; de Geest *et al.*, 2002). Yogalingam e colaboradores (2008) demonstraram que a Neu1 participa do processo de exocitose lisossomal através da regulação da quantidade de ácido siálico da proteína lamp1, um de seus substratos. Haveria uma correlação direta entre a gravidade da doença e os níveis de lamp1 na superfície celular e dos níveis de exocitose lisossomal. Estes achados indicam que a indução anormal de exocitose lisossomal pode estar diretamente implicada na patogênese das manifestações sistêmicas características da sialidose (Yogalingam *et al.*, 2008).

2.5 Atrofia muscular

A atrofia muscular corresponde à perda da massa muscular decorrente de redução da área das fibras musculares e/ou redução no número das fibras. Várias condições podem estar associadas à atrofia muscular, entre elas adaptações a condições fisiológicas, tais como jejum prolongado, inatividade, desnervação e envelhecimento, bem como em associação com condições patológicas, tais como septicemia, diabetes mellitus, caquexia, AIDS, doenças neuromusculares e câncer (Glass, 2003). Os mecanismos que levam à atrofia muscular incluem aumento da degradação proteica e/ou redução na expressão gênica com redução na síntese proteica, sendo que pelo menos cinco sistemas diferentes estão envolvidos no processo de atrofia muscular: sistema lisossomal/autofágico (**Figura 1**, parte superior); sistema da calpaína; sistema das caspases e apoptose; sistema ubiquitina-proteassomo (SUP) (**Figura 1**, parte inferior), no qual estão envolvidas as enzimas MuRF1 e Atrogina1, que têm função de sinalizar a degradação de proteínas musculares; e as metaloproteinases (Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003). Embora os mecanismos envolvidos sejam similares nos diferentes modelos de atrofia muscular, ainda não está claro o quanto cada sistema participa neste processo. O conhecimento do papel relativo de cada via proteolítica na atrofia muscular é de fundamental importância para direcionar ensaios terapêuticos específicos para doenças relacionadas a cada sistema proteolítico.

Figura 1. Imagem esquemática de sistemas intracelulares de degradação proteica. Processo de macrofagia (acima), em que uma pequena porção do citoplasma é englobada por uma membrana de isolamento que resulta na formação do autofagossomo. A membrana externa do autofagossomo se funde ao lisossomo, formando o autolisossomo, onde o material citoplasmático é degradado. Abaixo está representado o sistema ubiquitina-proteassomo, no qual proteínas poliubiquitinadas são degradadas pelo proteassomo em um processo seletivo (modificado de Mizushima Lab. website).

2.6 Atrofia muscular relacionada ao sistema lisossomal/autofágico

A autofagia é um importante processo de degradação lisossomal, envolvido em certas condições fisiológicas e patológicas de atrofia muscular. Esse processo resulta da formação de vesículas capazes de englobar organelas envelhecidas formando o chamado autofagossomo, com o auxílio do retículo endoplasmático (Mizushima *et al.* 2004). O autofagossomo funde-se a endossomos e lisossomos, recebendo enzimas hidrolíticas, entre elas, a fosfatase ácida, ativa em pH ácido (Essner & Novikoff, 1961), culminando na degradação enzimática dos seus constituintes. Este processo é especialmente importante para o suprimento das células em situações de privação alimentar. Durante a ativação da autofagia, o LC3-I (forma citosólica da proteína-1 de cadeia leve-3 associada aos microtúbulos) é conjugado com fosfatidiletanolamina para formar LC3-II, o qual é recrutado para as membranas dos autofagossomos (Kabeya *et al.*, 2000), como representado na Figura 2. Esta conversão do LC3 pode ser usada para monitorar atividade autofágica e a formação de autofagossomos. Durante a fusão dos autofagossomos com os lisossomos, o LC3-II é degradado por hidrolases (Klionsky *et al.*, 2008, Kabeya *et al.*, 2000). A realização de *immunoblotting* do LC3 revela duas

bandas: LC3-I (18 kDa) e LC3-II (16 kDa).

Figura 2. Esquema representativo da formação de autofagossomos em células de mamíferos. O conjugado Atg12-Atg5 e Apg16L se unem à membrana no processo de alongamento. O LC3 é recrutado para a membrana de modo dependente de Apg5. O conjugado Apg12-Apg5 e Apg16L se dissocia da membrana ao se formar o autofagossomo e o LC3II permanece na membrana do autofagossomo. O LC3I se dissocia da membrana autolisossomal (modificado de Mizushima Lab. website).

A importância do lisossomo na regulação da autofagia pode ser constatada pelo fato de que a deficiência isolada de diversas proteínas lisossomais resulta em doenças musculares associadas a distúrbios autofágicos em humanos. As miopatias autofágicas vacuolares compõem um grupo de miopatias raras de origem lisossomal caracterizadas pela formação de vacúolos autofágicos no tecido muscular, sendo as mais comuns, as deficiências da α -glucosidase (doença de Pompe), de lamp2 (doença de Danon) e as formas ligadas ao cromossomo X (Nishino, 2006). Estudos em culturas de células musculares têm demonstrado que o sistema lisossomal/autofágico é a principal via proteolítica ativada implicada na privação alimentar (Sandri, 2008), entretanto, sendo também ativado na atrofia muscular induzida por desnervação (Furuno *et al.* 1990), portanto, mostra-se importante avaliar o papel regulatório da Neu1 *in vivo*, na formação de autofagossomos desencadeada por desnervação.

2.7 Atrofia muscular relacionada ao sistema da ubiquitina-proteassomo

O SUP é um sistema de degradação que se caracteriza pela habilidade de reconhecer e marcar como alvo, por ubiquitinação, proteínas específicas para

degradação, atuando em resposta a mudanças na atividade muscular (**Verhees *et al.*, 2011; Schiaffino *et al.*, 2013**). Proteínas degradadas por esse sistema são primariamente ligadas de forma covalente a cadeias de moléculas de ubiquitina, as quais marcam as proteínas e as direcionam a uma rápida degradação nos proteassomas 26S (**Hershko & Ciechanover, 1998**).

A formação do complexo ubiquitina-proteína envolve essencialmente a participação de três componentes: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e enzima ligadora de ubiquitina (E3). A especificidade do substrato é mediada por três principais grupos de enzimas ligadoras E3: *RING finger*, homóloga ao domínio terminal carboxisil E6AP (domínio HECT), e complexo de proteínas Skp1–Cul1–F-box (complexo SCF) (**Powell, 2006**).

No músculo, o SUP é necessário na remoção de proteínas sarcoméricas em resposta a mudanças na atividade muscular. Durante o processo de atrofia muscular, vários componentes do SUP são expressos mais intensamente, incluindo as E1, E2, E3s, 26S e ubiquitina (**Medina *et al.*, 1995**). Em eucariotos, uma família de três genes (*UbA*, *UbB* e *UbC*) codificam produtos de proteína que são processados para formar ubiquitinas livres (**Jentsch *et al.*, 1991**). Em um estado catabólico muscular, o mRNA *UbC* é mais expresso em relação a mRNAs de outras ubiquitinas, sendo seus níveis aumentados em cerca de 2x em ensaios de lesão muscular por desnervação (**Wing & Goldberg 1993**).

Grande avanço no conhecimento do envolvimento do SUP no processo de atrofia muscular ocorreu com a identificação de dois genes de ligadoras E3 que se expressam significativamente em diferentes formas de atrofia muscular, sendo estas a *MuRF1* (*muscle ring finger 1*) e o *MAFbx* (*muscle atrophy F-box*) também conhecido como *Atrogina-1* (**Bodine *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001**).

Vários estudos têm demonstrado a importância de ligadoras E3 na fisiologia, remodelamento e estabilização do sarcômero (**McElhinny *et al.*, 2002**). Camundongos com deficiência de ambas isoformas de enzimas E3 (MuRF1 e MuRF3) desenvolvem miopatia e cardiomiopatia hipertrófica caracterizadas pelo acúmulo de MyHC, fragmentação das fibras e diminuição do desempenho muscular (**Fielitz *et al.*, 2007b**). Tal achado reforça o envolvimento de enzimas ligadoras E3 na renovação de proteínas sarcoméricas, e ajuda a esclarecer aspectos patogênicos de miopatias com acúmulo de miosina.

A transcrição das E3 ligases Atrogina-1 e MuRF-1 depende diretamente da translocação dos FoxOs do sarcoplasma para o núcleo da célula muscular, iniciando assim o processo de atrofia muscular, estando sua modulação de atividade relacionada com o Akt, também denominado PBK (Proteína quinase B) proteína central da via IGF-1/PI-3k/Akt/mTOR (**Schakman et al., 2008**).

Os FoxOs constituem uma família de fatores de transcrição que quando ativos, localizam-se predominantemente no compartimento nuclear, ligados ao DNA. Componentes dos FoxOs, como o FoxO1, FoxO3a e FoxO4, regulam genes da via proteolítica do SUP, em particular os genes codificadores das enzimas E3 (*MuRF-1 e Atrogina-1*), bem como genes relacionados com a autofagia, reguladores do crescimento (*Miostatina*) e de degradação celular (*Catepsinas*) (**Sandri et al., 2004; Sandri, 2010; Mammucari et al., 2007; Hasselgren et al., 2010**). A inativação dos FoxOs pelo Akt ocorre através da associação com as proteínas 14-3-3, as quais sequestram e translocam os FoxOs para o citoplasma onde são mantidos fosforilados e transcripcionalmente inativos (**Birkenkamp & Coffey, 2003; Sandri et al., 2004**).

A ativação do Akt, por fosforilação, está condicionada, em grande parte, à ativação da via de IGF-1, que o ativa por meio de processo regulatório translacional. O IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) é um fator de crescimento que estimula o aumento da síntese proteica muscular e consequentemente de sua massa, além de diminuir os níveis de proteólise e apoptose neste tecido. Quando a ação do IGF-1 sobre o músculo é inibida, por exemplo, com o uso de glicocorticoides, ocorre uma elevação nos níveis de degradação proteica, e diminuição na síntese proteica com consequente atrofia muscular (**Schakman et al., 2009; Qin et al., 2012**).

A ativação do Akt, além de influenciar a atividade dos FoxOs, modula a atividade de diversas outras proteínas relacionadas com a síntese e degradação proteica, e com captação de glicose celular. A proteína quinase Akt quando fosforilada acarreta ativação do mTOR (*mammalian target of rapamycin*), relacionado com aumento da síntese proteica, e inibe proteínas relacionadas com a degradação ou diminuição da síntese proteica, como a glicogênio sintetase 3 β (GSK3 β), o que acarreta aumento da massa muscular e hipertrofia (**Jefferson et al., 1999; Bodine, 2001b; Léger et al., 2006; Gundersen, 2011**).

O GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*) é um supressor do fator de iniciação eucariótico 2B (eIF-2B), que diminui a translação de RNAm e a capacidade de reciclagem dos ribossomos afetando a síntese de proteínas musculares em fases iniciais (Dufner *et al.*, 1999; Verhees *et al.*, 2011; Clemmons, 2009). A presença do GSK3 β , tal como demonstrado por Verhees e colaboradores (2011) em modelo de atrofia com glicocorticoides, é fundamental para a expressão de genes das enzimas E3 do SUP, *MuRF-1* e *Atrogina-1*. O GSK3 β também se relaciona com a síntese de glicogênio, tendo sido relacionada sua alta expressão com a intolerância à glicose e prejuízo sobre a ação da insulina (Dokken *et al.*, 2005).

2.8 Modelo animal para estudo da sialidose

Para melhor compreensão da fisiopatogenia da sialidose, um modelo animal de camundongos *Neu1*^{-/-}, que simula a doença do tipo 2, foi desenvolvido por de Geest e colaboradores (2002), de acordo com a metodologia representada na **Figura 3**. Para estabelecer tal modelo animal, foi inserido um "cassete" de lacZ-PGK-neo^R no éxon 1 do gene *Neu1*, tornando o transcrito da proteína neuraminidase-1 inativo.

Figura 3. Imagem representativa do nocauteamento do gene *Neu1* realizado no modelo animal *Neu1*^{-/-}, pela inserção da sequência LacZ/PGK/neo^R no éxon 1; modificado de de Geest *et al.*, 2002.

Uma das mais significativas alterações encontradas na musculatura esquelética no camundongo *Neu1*^{-/-} é a atrofia muscular, a perda de peso muscular em relação à massa corporal desses animais evolui progressivamente (Zanoteli *et al.*, 2007; Zanoteli *et al.*, 2010).

No tecido muscular dos animais *Neu1*^{-/-} entre os mecanismos que podem estar envolvidos em seu estado atrófico característico estão o aumento da expressão e da

atividade da catepsina B, bem como da MMP-2 e MMP-9 (Yogalingam *et al.*, 2008; Zanoteli *et al.*, 2010). No entanto, o envolvimento de outras vias proteolíticas precisa ser melhor avaliado. A análise de atrogenes, genes envolvidos no sistema ubiquitina-proteassomo, e do sistema lisossomal/autofágico, auxiliaria na identificação de outras vias proteolíticas possivelmente ativadas durante o processo de atrofia muscular nestes animais.

2.9 Neu1 e músculo esquelético

Há evidências de que a Neu1 seria responsável pela regulação da quantidade de ácido siálico nas porções terminais das moléculas de catepsinas. Assim, na deficiência da Neu1, o aumento da atividade enzimática das catepsinas ocorreria devido ao aumento da quantidade de ácido siálico nas suas moléculas (Yogalingam *et al.*, 2008).

Considerando que pacientes com sialidose apresentam sintomatologia de envolvimento neuromuscular, e que a deficiência de várias proteínas lisossomais acarreta em afecção muscular, foi iniciado um estudo por Zanoteli e colaboradores (2010) para avaliar a musculatura esquelética de camundongos com deficiência de Neu1. Em tal estudo foi possível constatar que em camundongos *Neu1^{-/-}* a musculatura esquelética apresenta, além de atrofia muscular, áreas de degeneração progressiva em associação com profunda alteração dos componentes da matriz extracelular (MEC). As principais alterações observadas foram um excessivo acúmulo de colágeno e a proliferação de fibroblastos com expansão do espaço epimisial e perimisial associados à presença de intensa atividade gelatinolítica na MEC. A presença de grande número de fibroblastos metabolicamente ativos na MEC ocasiona um excessivo aumento na síntese e acúmulo de colágeno e, conseqüentemente, aumento da expressão de metaloproteinases (MMP). Fibras musculares perifasciculares desenvolvem uma forma atípica de degeneração caracterizada por invasão por fibroblastos, fragmentação do citoplasma e formação vacuolar. As alterações histológicas descritas não haviam sido relatadas previamente em outras formas de doenças musculares, sugerindo tratarem-se de alterações características, relacionadas com a deficiência primária de Neu1 (Zanoteli *et al.*, 2010). No entanto, até o momento, não foi possível determinar se tais alterações ocorreriam também em pacientes com sialidose, especialmente naqueles com a forma

severa (sialidose tipo 2), pois não há descrições de biópsias musculares nestes casos.

2.10 Neu1 e a capacidade invasiva de tecidos

Estudos têm demonstrado uma relação inversa entre a expressão da Neu1 e a malignidade de células cancerosas (Miyagi *et al.*, 2008). O aumento induzido da expressão da Neu1 reduziria o potencial metastático de melanomas e também da capacidade invasiva e metastática de tumores intestinais (Sawada *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2001). Tais achados mostram claramente o envolvimento da Neu1 no controle do potencial invasivo celular. A principal característica do processo de degeneração muscular observada na musculatura esquelética de camundongos *Neu1^{-/-}* foi a invasão de fibras musculares por fibroblastos. É possível que o aumento da atividade gelatinolítica observada na MEC (por aumento da expressão de MMPs) ocorra no sentido de degradar seus componentes acumulados, tais como o colágeno e seria um dos principais mecanismos responsáveis pela facilitação da migração e invasão de fibroblastos (Zanoteli *et al.*, 2010).

Hinek *et al.* (2008) demonstraram *in vitro* que fibroblastos de pacientes com sialidose apresentam maior capacidade proliferativa, e isto ocorreria devido a uma maior resposta ao PDGF-BB (*Platelet-derived growth factor*) e ao IGF-2 (*Insulin-like growth factor 2*). Estudando células musculares lisas arteriais, os autores mostraram que a Neu1 seria responsável pela dessialilação dos receptores da PDGF e IGF-1, alterando assim a resposta aos hormônios PDGF-BB e IGF-2, e consequentemente reduzindo o efeito mitogênico. Estes dois estudos demonstraram claramente que a falha no controle da quantidade de ácido siálico em diversas moléculas é um dos fatores básicos da fisiopatogenia na sialidose (Yogalingam *et al.*, 2008; Hinek *et al.*, 2008).

2.11 Atrofia muscular induzida por desnervação

Para estudarmos a influência da Neu1 no processo de atrofia da musculatura esquelética, realizamos desnervação do músculo gastrocnêmio para induzir o processo de atrofia muscular. Esse método de indução de atrofia causa alterações transcricionais similares às verificadas no jejum prolongado e em doenças sistêmicas (Sachek *et al.*,

2007).

Estudos prévios (**Goldberg et al., 1969; Furuno et al., 1990**) relataram que a degradação proteica, especialmente das proteínas musculares, aumenta durante a atrofia induzida pela desnervação o que causa perda de massa, sendo que a via de degradação mais ativada nessas situações é a da ubiquitina-proteassomo (**Solomon e Goldberg, 1996**).

Aproximadamente 120 genes, chamados de atrogenes, são inibidos ou ativados em estados catabólicos (**Jagoe et al., 2002; Lecker et al., 2004**). Entre os genes mais transcritos nessas situações, estão os componentes do sistema ubiquitina-proteassomo, especialmente as ligases da ubiquitina, *Atrogina-1* e *MuRF1* (**Gomes et al., 2001; Bodine et al., 2001**). Esses atrogenes são mais transcritos durante o início do processo de atrofia (**Gomes et al., 2001**), sendo que a expressão de *Atrogina-1* aumenta durante os primeiros quatro dias pós desnervação (**Haddad et al., 2003**).

No processo de atrofia induzida por desnervação, além dos mecanismos citados, ocorrem mudanças nas membranas das fibras musculares devido à perda de fatores neurotróficos liberados pelos neurônios motores (**Merlie et al., 1984**), além de mudanças na expressão de fatores de diferenciação muscular, como o MyoD (**Legerlotz & Smith, 2008**).

O MyoD sofre alterações quando há aumento ou diminuição de estímulos mecânicos e neurais, aumentando no exercício e na desnervação, como uma tentativa de deter a atrofia muscular (**Ishido et al., 2004; Voytik et al., 1993; Walters et al., 2000**). O MyoD é mais expresso em fibras de contração rápida (**Ekmark et al., 2007; Hughes et al., 1993; Hughes et al., 1997**), sendo que o músculo gastrocnêmio analisado nesse estudo, é composto de fibras de contração rápida e fibras de contração lenta (**Hodgson et al., 1991; Rome et al., 1988**).

3. Justificativa

Pouco se sabe sobre o processo de atrofia muscular relacionado à deficiência da Neu1, principalmente no que diz respeito aos sistemas regulatórios envolvidos. Estudos mostram um importante envolvimento do sistema ubiquitina-proteassomo e do sistema lisossomal/autofágico durante a atrofia muscular induzida por desnervação e, como a

Neu1 é uma enzima com importante regulação nesse último sistema degradatório, seria de grande importância avaliar o processo de atrofia muscular por desnervação em camundongos com deficiência desta enzima.

4. Objetivos

Objetivo Geral

Analisar os mecanismos envolvidos na atrofia muscular esquelética induzida por desnervação em camundongos com deficiência de neuraminidase-1.

Objetivos Específicos

- Verificar as alterações estruturais nas fibras musculares causadas pela desnervação em animais com deficiência de Neu1 (*Neu1^{-/-}*) e em camundongos controles normais (*Neu1^{+/+}*), através de análise histológica.
- Avaliar a formação de vacúolos autofágicos após desnervação, através de estudo ultraestrutural e da análise da expressão proteica das isoformas I e II de LC3 (proteína envolvida na formação de vacúolos autofágicos) em animais *Neu1^{-/-}* e animais *Neu1^{+/+}*, através de estudo imunoistoquímico e *Western blot*.
- Verificar a ativação lisossomal através da reação de fosfatase ácida e da análise da expressão proteica de lamp1 e catepsina L em animais *Neu1^{-/-}* e animais *Neu1^{+/+}* após desnervação, por meio de estudo imunoistoquímico e de *Western blot*.
- Avaliar a infiltração de tecido conjuntivo nas fibras musculares de animais *Neu1^{-/-}* e animais *Neu1^{+/+}* após desnervação, por meio de estudo imunoistoquímico da expressão proteica de colágeno III.
- Verificar variações nos níveis das formas fosforiladas e totais de Akt e GSK3 β , proteínas relacionadas com a via de trofismo muscular IGF-1/PI-3k/Akt, após desnervação em animais *Neu1^{-/-}* e animais *Neu1^{+/+}*, por meio de *Western blot*.
- Verificar a ativação do sistema ubiquitina-proteassomo após desnervação, por meio da análise da expressão dos atrogenes *Atrogina-1* e *MuRF1* na musculatura esquelética de animais *Neu1^{-/-}* e de animais *Neu1^{+/+}*, através de PCR em tempo real.
- Verificar variações nos níveis da proteína MyoD, relacionada à diferenciação muscular, em músculos de animais *Neu1^{-/-}* e animais *Neu1^{+/+}* após desnervação, por meio de *Western blot*.
- Verificar através de PCR em tempo real, a expressão relativa do gene *Neu1* na

musculatura esquelética de camundongos *Neu1^{+/-}* após desnervação.

- Verificar através de PCR em tempo real, a expressão relativa dos genes *Neu2*, *Neu3* e *Neu4*, na musculatura esquelética de camundongos *Neu1^{-/-}* e *Neu1^{+/-}* após desnervação.

5. Métodos

Os experimentos foram realizados na Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), no Laboratório de Investigação Médica 45 (LIM45), de acordo com as normas que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais de experimentação no país (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008). Este estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP (0346/09), em 08/05/2009, conforme o **Anexo A**.

5.1 Animais

Os camundongos *Neu1^{-/-}* (de Geest *et al.*, 2002) da linhagem FVB, foram fornecidos pela Dr^a Alessandra d'Azzo do Instituto *St Jude Children's Research Hospital* (Memphis, USA). Os animais (**Figura 4**) foram mantidos no Centro de Bioterismo da FMUSP em temperatura e umidade controladas e ciclos de 12 horas alternados de luz e escuro, com comida e água *ad libitum*. A identificação do genótipo dos animais durante a expansão da linhagem foi realizada através do método de PCR. Os critérios de inclusão no estudo foram animais fêmeas de 8 semanas de vida (período no qual as alterações histológicas musculares são inicialmente notadas nos animais com deficiência da Neu1), pesando entre 15 e 26 gramas. Os critérios de exclusão foram animais com baixo peso (<15g) ou alto peso (>26 g) e com sinais de letargia, agressividade excessiva e ferimentos. As gestações de fêmeas homozigotas *Neu1^{-/-}* não chegam ao final, desta forma, os cruzamentos foram feitos entre animais heterozigotos, o que limitou em parte a ampliação do número de amostras. Neste estudo foram usadas as fêmeas já que os machos foram usados em outro estudo do nosso grupo relacionado com os efeitos da deficiência da Neu1 na regeneração muscular.

Figura 4. Imagem comparativa entre animal *NeuI^{+/+}* (A) e animal *NeuI^{-/-}* (B), que apresenta menor tamanho devido à atrofia muscular (Zanoteli *et al.*, 2010).

5.2 Genotipagem e expansão da colônia

Para realizar a genotipagem, foi seguido o seguinte protocolo: a extração de DNA dos animais foi feita após a coleta de um fragmento da cauda e incubação em meio de lise (Tris 1M pH 7,5, NaCl 5M, EDTA 0,5M, SDS 20% e proteinase K). Após a extração do DNA, procedeu-se a reação de PCR para cada amostra: 7,4μL de água DEPC, 5μL de tampão 10X, 6μL de MgCl₂, 3μL de dNTPs, 0,6μL de oligonucleotídeos sense e antisense, 1,2μL de oligonucleotídeo lacZ, 0,2μL de Taq polimerase e 1μL de DNA, em um total de 25μL.

Para as reações de PCR foi utilizada a seguinte ciclagem: desnaturação a 98°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos a 98°C por 30 segundos, anelamento a 70°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos, com um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel com 2% de agarose contendo brometo de etídio para visualização das bandas em luz ultravioleta (UV). Os oligonucleotídeos usados na reação de genotipagem (de Geest *et al.*, 2002) estão listados no **Quadro 1**.

Quadro 1: Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para genotipagem (pb: pares de bases).

Oligonucleotídeo	Sense	Anti-sense	Fragmento
MNTG1	GACAGGGATCGCCGGGAGCTATGG	CACCAGGCTGAAGTCATCCTCTGC	160pb
LacZ- Lac3(<i>Neu1</i> ^{-/-})		GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCG	450pb

Após a confirmação, através de genotipagem, de que os animais doados eram heterozigotos para o alelo *Neu1*^{-/-} (**Figura 5**), iniciou-se a expansão da colônia.

Figura 5. Genotipagem de camundongos. Banda do alelo normal (160 pb) e banda do alelo *Neu1*^{-/-} (450 pb). Animais controle normais (+/+), heterozigotos (+/-), homozigotos afetados (-/-), controle negativo sem DNA (C), marcador de peso molecular de 50pb (M).

5.3 Indução de atrofia muscular *in vivo* através de desnervação

A desnervação foi realizada em camundongos fêmea *Neu1*^{-/-} e em controles *Neu1*^{+/+} de 8 semanas de idade, através da seccionamento de aproximadamente 5 mm do nervo ciático direito, junto ao tendão do músculo obturador, exatamente acima da divisão do nervo ciático em nervo tibial e fibular comum. Depois de realizada tricotomia do local seguida de incisão na pele de aproximadamente 4mm na região médio-posterior da coxa, foi feita uma abertura entre as fibras do músculo glúteo maior com o objetivo de visualizar o nervo ciático e seccioná-lo (**Figura 6**). O procedimento foi realizado após prévia anestesia com Thionembutal (0,4mg/10g; intraperitoneal). Os animais foram examinados em busca de sinais que demonstrassem ausência de reinervação do músculo gastrocnêmio (GA), tais como ausência de resposta flexora plantar e alteração na marcha. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical após 0, 3, 7, 14 e 21 dias

do procedimento cirúrgico. Após a eutanásia, os músculos GAs foram coletados e pesados e o GA esquerdo foi usado como controle interno de cada animal. Um fragmento dos músculos coletados foi montado em cortiça usando *tissue tek* e congelado imediatamente em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido, para que com eles fossem realizadas as análises histológicas. Um fragmento dos mesmos músculos foi congelado diretamente em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para posterior extração de proteínas e de RNA. Um fragmento do músculo foi imerso em glutaraldeído a 2% e encaminhado ao Serviço de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da FMUSP para estudo ultraestrutural.

Figura 6. A) Procedimento de secção do nervo ciático em animal *Neu1*^{-/-}. B) Músculos gastrocnêmios de camundongo *Neu1*^{+/+}. C) Músculos gastrocnêmios de camundongo *Neu1*^{-/-}.

5.4 Análise histológica

Os fragmentos de GA direito e esquerdo de cinco animais *Neu1*^{-/-} e cinco *Neu1*^{+/+} para cada período pós-desnervação (0, 3, 7, 14 e 21 dias) foram submetidos a cortes coronais sequenciais de espessura de $6\mu\text{m}$ em criostato a uma temperatura de -25°C e montados em lâminas histológicas. As lâminas com os fragmentos musculares foram submetidas à coloração histológica de hematoxilina & eosina (H&E) para avaliação do aspecto global da morfologia muscular e presença de infiltrado conjuntivo-gorduroso.

Para a medição da área de secção transversa das fibras musculares, lâminas coradas com H&E foram fotografadas com aumento de 200X em microscópio óptico. Utilizando o programa *ImageJ* (NIH), previamente ajustado para mensuração de área em μm^2 , as fibras foram tracejadas e as suas áreas transversas foram calculadas pelo

programa (**Figura 7**). Posteriormente, calculou-se a média das áreas de secção transversa obtidas (mínimo de 200 fibras por músculo) em pelo menos três campos diferentes de cada músculo analisado.

Figura 7. Mensuração da área de secção transversa de fibra muscular no programa *ImageJ*. Janela (acima) e *software* (abaixo) em uso para mensuração de área. Linha pontilhada que circunda fibra central indica a área de secção transversa a ser calculada em μm^2 .

5.5 Reação de fosfatase ácida

Para verificar ativação lisossomal, as lâminas de cortes musculares de cinco animais *Neu1^{-/-}* e cinco animais *Neu1^{+/+}*, foram pré-incubadas por 10 minutos em uma solução de pH 5 composta por acetato veronal (10mL), acetona (0,5mL) e água destilada (15mL). Foi realizada lavagem das lâminas em água por 4 minutos. As lâminas foram posteriormente incubadas em solução de pH 5 composta por acetato veronal (10mL), acetona (0,5mL), nitrato de sódio 4% (400 μL) e pararosalina 1% (400 μL) por 1 hora a 37°C. Foi realizada breve lavagem das lâminas em água. Posteriormente, as lâminas foram montadas com lamínula e meio de montagem aquoso.

5.6 Análise ultraestrutural

Foram avaliados os músculos GA direito (desnervado) e esquerdo (controle) de três animais *NeuI*^{+/+} e três animais *NeuI*^{-/-} após 14 dias da desnervação (total de 12 amostras). Após eutanásia dos animais, fragmentos musculares foram fixados em glutaraldeído a 2% e encaminhados para o Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da FMUSP (Serviço Multiusuário) para preparo das telas. A análise foi realizada em Microscópio Eletrônico Zeiss localizado no Instituto do Coração da FMUSP, também pertencente ao Serviço Multiusuário do Departamento de Biologia Celular.

5.7 Reações imunoistoquímicas

As amostras de músculos coletados foram submetidas a estudo imunoistoquímico com os anticorpos primários anti-LC3 e anti-lamp1 pela técnica de imunofluorescência indireta e com o anticorpo anti-colágeno III através da técnica de imunoistoquímica ABC (*avidin-biotin complex*) seguido de coloração de DAB (diaminobenzidina).

Na técnica de imunofluorescência indireta, os fragmentos musculares foram mantidos por 10 minutos em temperatura ambiente, incubados com acetona gelada por 20 minutos, lavados em PBS por 5 minutos, em seguida incubados em tampão de bloqueio (2% BSA em PBS, soro normal e 0,2% triton-X 100) por 30 minutos em temperatura ambiente e incubados em *Affinipure fab fragment goat anti-mouse IgG* (Jackson immuno research^{TM}) por 1 hora.

Para marcação específica, os fragmentos foram incubados com anticorpo primário a 4°C diluído em tampão de bloqueio durante a noite (diluições descritas no **Quadro 2**). Após a incubação, as lâminas foram lavadas em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada e bloqueadas novamente com tampão de bloqueio por 30 minutos. Em seguida, os fragmentos foram incubados com anticorpo secundário fluorescente (FITC) diluído em tampão de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente, em local privado de luminosidade, posteriormente, lavados em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada e montados com *Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, CA^{TM}). As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência AX70 (Olympus^{TM}) e as imagens

capturadas utilizando-se o sistema DP72 de foto-documentação (Olympus^{TM}).

Para realizar a técnica de imunoistoquímica com coloração de DAB, as lâminas com secções musculares foram mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos e incubadas em tampão de bloqueio (0,1% BSA, 0,5% tween, 10% *normal horse serum*, em PBS) por 30 minutos. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio, durante a noite, a 4°C (diluição descrita no **Quadro 2**). As lâminas foram lavadas em PBS-T por 3 vezes de 5 minutos cada, incubadas em H₂O₂ diluída em PBS e lavadas em PBS-T por 2 vezes de 3 minutos.

Os cortes foram então incubados em avidina e biotina por 45 minutos, lavados novamente em PBS-T por 2 vezes de 5 minutos e incubados em trisma pH 7,4 por 10 minutos. Posteriormente, as secções foram incubadas em DAB por cerca de 2 minutos e foi gotejada hematoxilina para marcação dos núcleos celulares. Foi realizada desidratação das secções muculares em bateria com concentração crescente de etanol e fixação em xilol. Como controle negativo das reações, cortes de tecido foram incubados apenas com o respectivo anticorpo secundário. O **Quadro 2** mostra os anticorpos usados no estudo e suas respectivas diluições.

5.8 Eletroforese SDS-PAGE (*Western blotting*)

Fragmentos musculares foram homogeneizados em uma diluição de 1:5 em tampão de lise RIPA (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e Nonidet P40 1%) com coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich; P5726 e A-1153, respectivamente). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 13.000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante reservado para uso. A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina como curva de diluição padrão. Quantidades iguais de proteínas (30µg), acrescidas de tampão de eletroforese e β-mercaptoetanol 0,1M, foram aquecidas a 100°C por 5 minutos, mantidas em gelo por 5 minutos, aplicadas ao gel SDS-PAGE (8-12%) e submetidas à eletroforese com voltagem de 90 a 140V por 2 a 4 horas, em cuba de eletroforese (BioRad^{TM}). As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF ou nitrocelulose, de acordo com os pesos moleculares das proteínas-alvo, submetidas à voltagem de 90V por 1 a 3 horas e, posteriormente, incubadas em tampão de bloqueio

TBS-T (50 mM Tris, pH 7,5, NaCl 150 mM e Tween20 0,1%) contendo 10% de leite, por 30 minutos em temperatura ambiente, para bloquear sítios inespecíficos.

As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio contendo o anticorpo primário por 1 hora em temperatura ambiente ou durante a noite, a 4°C, de acordo com as recomendações do fornecedor de cada anticorpo. Após a incubação, procedeu-se com a lavagem das membranas utilizando tampão de lavagem (TBS-T) por 30 minutos (3 trocas de 10 minutos cada). As membranas foram então incubadas com tampão de bloqueio contendo anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*horseradish peroxidase conjugated* anti-mouse ou anti-rabbit IgG) por 1 hora em temperatura ambiente.

Após lavagem com TBS-T por 2 vezes de 10 minutos e lavagem em TBS por 10 minutos, as membranas foram tratadas com reagentes quimioluminescentes (*Western Enhancing Chemiluminescence Reagent Plus*, ECL kit, Perkinelmer, EUA) por 1 minuto em agitação manual e em seguida foi realizada, durante 30 segundos a 2 minutos, a exposição da membrana em aparelho foto-documentador para visualização das bandas de proteínas marcadas pelo complexo anticorpo primário:secundário.

Para verificar a homogeneidade das amostras transferidas, as membranas foram coradas com vermelho Ponceau. Com o objetivo de normatizar a quantidade de proteínas aplicadas ao gel e determinar os valores de análise proteica, foi estabelecido como normatizadora, a marcação da proteína α tubulina. Os anticorpos utilizados e suas respectivas diluições estão descritos no **Quadro 2**.

Quadro 2: Anticorpos utilizados no estudo.

Anticorpo	Host	Empresa/Código	Diluição	Uso
Primários				
Anti-collagen III	<i>Rat</i>	Acris/ BM4018	1:50	Imuno
Anti- lamp1	<i>Mouse</i>	Hybridoma/1D4B	1:200/1:1000	Imuno/WB
Anti- α tubulina	<i>Mouse</i>	Hybridoma/ AA4.3	1:30000	WB
Anti-LC3	<i>Rabbit</i>	Sigma/ L7543	1:200/1:1000	Imuno/WB
Anti-catepsina L	<i>Mouse</i>	Sigma/ C2970	1:500	WB
Anti-MyoD	<i>Mouse</i>	BD/554130	1:3000	WB
Anti-Akt	<i>Rabbit</i>	Cell signaling/4691	1:2000	WB
Anti-PAkt	<i>Rabbit</i>	Cell signaling/4060	1:2000	WB
Anti-GSK3 β	<i>Rabbit</i>	Cell signaling/9315	1:2000	WB
Anti-PGSK3 β	<i>Rabbit</i>	Cell signaling/9322	1:2000	WB
Secundários				
FITC-conjugated Anti-Rabbit (H+L)	Donkey	Jackson ImmunoResearch/ 771-095-152	1:200	Imuno
FITC-conjugated Anti-Mouse (H+L)	Goat	Jackson ImmunoResearch/ 115-095-003	1:200	Imuno
Rat IgG (H+L)	Goat	Vector Laboratories	1:50	Imuno
Mouse IgG, HRP-linked Whole Ab	Sheep	GE/ NA931	1:6000	WB
Rabbit IgG, HRP-linked Whole Ab	Donkey	GE/ NA934	1:10000	WB

Imuno = Imunoistoquímica, WB = *Western blot*

A análise das bandas de proteínas foi realizada de forma semi-quantitativa por densitometria óptica a partir das membranas reveladas em foto-documentador de quimioluminescência localizado no Laboratório de Investigação Médica 24 – FMUSP, através do software *ImageJ*. Foi calculada a razão entre os valores de intensidade das bandas obtidas na reação com os anticorpos das proteínas-alvo e da reação com anticorpo anti- α tubulina.

O número de amostras musculares utilizadas em cada experimento de expressão proteica, através de *Western blot*, está descrito no **Anexo B**. Os níveis de expressão proteica dos tecidos musculares não desnervados de animais *NeuI*^{+/+} foram considerados os níveis de expressão basal em cada análise. Foi realizada a razão entre os níveis de expressão de cada grupo e os níveis de expressão basal.

5.9 Extração de RNA e síntese de DNA complementar

Os fragmentos de músculos GA foram homogeneizados dentro de tubos de 1,5mL em reagente TRIzol (Life Technologies 15596-018) usando pistilo e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 100µl de clorofórmio, o tubo foi agitado manualmente por 15 segundos e deixado por 5 minutos em temperatura ambiente. O homogenato foi centrifugado a 14000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 250µL de isopropanol. O tubo foi agitado delicadamente e armazenado a -80°C durante a noite. No dia seguinte, os tubos foram deixados por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugados por 30 minutos a 14000rpm. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet*, foram adicionados 500µL de etanol 80% e o tubo foi agitado para ressuspender o *pellet*. Procedeu-se com centrifugação a 12500rpm por 15 minutos a 4°C. Esse passo foi repetido, o álcool foi evaporado e o *pellet* foi ressuspensionado em água DEPC.

A integridade e a quantidade de RNA de cada amostra foram avaliadas por medida espectrofotométrica através de absorbância A_λ dos comprimentos de onda de luz 260 e 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop1000^{TM} (Thermo Scientific). As amostras que revelaram uma razão A_{260}/A_{280} menor que 1,8 foram descartadas. O RNA foi tratado com DNase I (Life Technologies AM2238) de acordo com as informações do fabricante.

Para a síntese de DNA complementar foi realizada a reação da transcriptase reversa com o seguinte protocolo: 1µg de RNA total foi adicionado a 5µL de Rt buffer 10X, 11µL de MgCl₂ 25mM, 10µL de dNTP 10mM, 2,5µL de *Random primer*, 1µL de RNase in, 1,25µL de *Multiscribe* (MultiScribe^{TM} Reverse Transcriptase). Resultando em um *mix* com volume de 30,75µL e total de RNA e água DEPC de 19,25µL, em um volume final de 50µL, posteriormente, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C, por 30 minutos a 48°C e por 5 minutos a 95°C.

5.10 PCR em tempo real (RT-PCR)

O DNA complementar (cDNA) foi usado em reação de PCR semi-quantitativa para testar os oligonucleotídeos que foram usados na PCR em tempo real. A reação de PCR

semi-quantitativa foi realizada em 25 µL de volume total incluindo oligonucleotídeos, dNTPs, MgCl₂ e Taq polimerase e cDNA, com a seguinte ciclagem: desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos, com um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos no **Quadro 3**. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel com 2% de agarose contendo brometo de etídio para visualização em luz de ultravioleta.

Quadro 3: Oligonucleotídeos utilizados no estudo da expressão gênica por RT-PCR.

Gene	Oligonucleotídeo Sense	Oligonucleotídeo Anti-sense	Referência
<i>Neu1</i>	AGAGATGTTTGCCCTGGAC	CGTGGTCATCACTGAGGAGA	Kijimoto-Ochiai <i>et al</i> , 2008
<i>Neu2</i>	GCTACAACGAAGCCACCAAC	CAGGGACAGCGATGAAGAA	Papini <i>et al</i> , 2012
<i>Neu3</i>	CTCAGTCAGAGATGAGGATGCT	GTGAGACATAGTAGGCATAGGC	Shiozaki <i>et al</i> , 2009
<i>Neu4</i>	GCCTGCTTGTTCTGCTTAC	CAGAGGGCTTCGAGCATTAC	Papini <i>et al</i> , 2012
<i>Atrogina-1</i>	GTGCTTACAACGAACATCATGCA	TGGCCCAGGCTGACCA	Crepaldi <i>et al</i> , 2007
<i>MuRF1</i>	TGTCTGGAGGTCGTTTCCG	TGCCGGTCCATGATCACTT	Dehoux <i>et al</i> , 2004
<i>GAPDH</i>	CCAAGGTCATCCATGACAAC	GCTTCACCACCTTCTTGATG	Lyons <i>et al</i> , 1997

Após padronização das reações de PCR semi-quantitativas, foram realizadas reações de PCR em tempo real com os oligonucleotídeos previamente listados no **Quadro 3**, em termociclador StepOnePlus^{TM} (Applied Biosystems). Foi realizado o seguinte protocolo: em uma reação com volume final de 25µL, foram utilizados 5µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR *Master Mix* (Fermentas^{TM}), 15,9 µL de água DEPC, 0,8 µL de oligonucleotídeos sense e anti-sense e 2,5µL de cDNA. Todas as reações foram realizadas em duplicata e amostras com desvio padrão entre curvas de amplificação acima de 0,6 foram desconsideradas. A ciclagem usada nas reações foi a seguinte: 95°C por 10 minutos e 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, curva de dissociação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, rampa: coleta de dados a cada 0,3°C; e 95°C por 15 segundos. Foram analisadas as curvas de dissociação de todas as reações para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos.

O número de amostras musculares utilizadas em cada experimento de expressão gênica está descrito no **Anexo B**. Os níveis de expressão gênica nos tecidos musculares não desnervados de animais *Neu1^{+/+}* foram considerados os níveis de expressão basal em cada análise. Foi realizada a razão entre os níveis de expressão de cada grupo e os níveis de expressão basal.

5.11 Análise estatística

Todos os dados obtidos passaram inicialmente por teste de distribuição de dado amostral e, de acordo com o tipo de distribuição de dados, foram realizados testes de análise de variância (ANOVA) de uma (*one-way*) ou duas vias (*two-way*) seguido, caso necessário, de pós testes correspondentes. Para comparação entre médias dos grupos foi utilizado o teste T de Student não pareado, sendo cada teste utilizado descrito no momento da apresentação dos dados. Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um *P* menor do que 0,05. Os resultados estão apresentados em média aritmética com barra de erro padrão da média. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* Graph Pad Prism, versão 5.00 de 2007, para *Windows* (Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

6. Resultados

6.1 Peso dos animais e dos músculos gastrocnêmios

Os animais de cada grupo foram pesados no início e no fim dos experimentos. O peso corporal dos animais *Neu1^{-/-}* se mostrou significativamente menor em relação aos animais *Neu1^{+/+}* já ao início do estudo ($P<0,01$) (**Figura 8**) e houve diferenças significantes entre os pesos dos animais *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}* desnervados por 14 e 21 dias ($P<0,05$).

Figura 8. Peso corporal de animais *Neu1^{-/-}* e *Neu1^{+/+}* em diferentes momentos pós desnervação. Teste estatístico realizado: ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. *= $P<0,05$; **= $P<0,01$. Período: 0, n=5; período 3 dias, n=7; período 7 e 14 dias, n=14; período 21 dias, n=16.

O peso muscular dos gastrocnêmios coletados dos animais em diferentes momentos pós desnervação está apresentado na **Figura 9**. Comparando-se o lado não desnervado com o desnervado, em ambos os grupos (*Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}*), foi observada diminuição de peso estatisticamente significativa do músculo GA pós desnervação a partir do 7º dia nos animais *Neu1^{+/+}* e nos animais *Neu1^{-/-}*. Observa-se também diferença estatisticamente significativa na comparação entre os músculos não desnervados dos animais *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}* a partir do período de 7 dias de desnervação.

Figura 9. Pesos dos músculos gastrocnêmios (GA) direito e esquerdo de animais *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}* após 0, 3, 7, 14 e 21 dias de desnervação. Teste estatístico realizado: ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, GAD: músculo gastrocnêmio direito, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo. Período: 0, n=5; período 3 dias, n=7; período 7 e 14 dias, n=14; período 21 dias, n=16.

6.2 Análise histológica

A análise histológica, após desnervação com coloração de H&E, mostrou que nos animais *Neu1^{-/-}*, além de atrofia muscular, houve aumento anormal do espaço endomisial e epimisial, em comparação com animais *Neu1^{+/+}* (**Figura 10 -13**).

Observou-se que os músculos de ambos os grupos animais (*Neu1^{-/-}* e *Neu1^{+/+}*) sofreram alterações morfológicas relacionadas aos espaços endomisial e perimisial e ao tamanho das fibras a partir do 3º dia pós desnervação, entretanto, nesse período, houve menor resposta atrofica nos músculos de animais *Neu1^{-/-}* em comparação a animais controle. Com o decorrer do 14º dia, o acometimento muscular do lado desnervado tornou-se evidente para ambos os animais, entretanto, com aumento mais acentuado dos espaços endomisial e perimisial nos animais *Neu1^{-/-}*, que se comprova ao fim do 21º dia pelo aumentado acúmulo de tecido conjuntivo pós-experimento comparado ao momento zero, sendo que nos animais controle, estes espaços foram similares comparando-se momento zero e 21º dia após desnervação.

Figura 10: Análise histológica do processo de atrofia muscular após 0 e 3 dias de desnervação do músculo gastrocnêmio (GA) de camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} (plano coronal, H&E, 200X). A) Músculo GAD não desnervado de camundongo *Neu1*^{+/+}. **B)** Músculo GAD não desnervado de camundongo *Neu1*^{-/-} no qual nota-se aumentado de espaço endomisial. **C)** Músculo GAE não desnervado de camundongo *Neu1*^{+/+}. **D)** Músculo GAD após desnervação de 3 dias de camundongo *Neu1*^{+/+} no qual notam-se poucos aspectos relacionados à atrofia muscular. **E)** Músculo GAE não desnervado de camundongo *Neu1*^{-/-} no qual se evidenciam um aumento dos espaços endomisiais e perimisiais além da atrofia das fibras musculares. **F)** Músculo GAD após desnervação de 3 dias em camundongo *Neu1*^{-/-}; D: músculo gastrocnêmio direito, E: músculo gastrocnêmio esquerdo. Barra de escala: 50µm, n=5.

Figura 11: Análise histológica do processo de atrofia muscular após 7 dias de desnervação do músculo gastrocnêmio (GA) de camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} (plano coronal, H&E, 200X). A) Músculo GAE não desnervado de camundongo *Neu1*^{+/+}. B) Músculo GAD após 7 dias de desnervação de camundongo *Neu1*^{+/+} no qual nota-se um ligeiro aumento dos espaços endomisiais. C) Músculo GAE não desnervado de camundongo *Neu1*^{-/-} no qual se evidencia um aumento dos espaços endomisiais e perimisiais. D) Músculo GAD após 7 dias de desnervação em camundongo *Neu1*^{-/-}, no qual nota-se uma diminuição das fibras musculares e aumento dos espaços endomisiais e perimisiais, além de proliferação de tecido conjuntivo; D: músculo gastrocnêmio direito, E: músculo gastrocnêmio esquerdo. Barra de escala: 50μm, n=5.

Figura 12. Análise histológica do processo de atrofia muscular após 14 dias de desnervação do músculo gastrocnêmio (GA) de camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} (plano coronal, H&E, 200X). A) Músculo GAE não desnervado de camundongo *Neu1*^{+/+}. **B)** Músculo GAD de camundongo *Neu1*^{+/+} após 14 dias de desnervação no qual nota-se um aumento dos espaços endomisiais e perimisiais, além de atrofia das fibras musculares. **C)** Músculo GAE não desnervado de camundongo *Neu1*^{-/-} no qual se evidencia um aumento dos espaços endomisiais e perimisiais, além de proliferação de tecido conjuntivo, indicada pela seta. **D)** Músculo GAD de camundongo *Neu1*^{-/-} após desnervação de 14 dias no qual nota-se uma diminuição das fibras musculares e aumento dos espaços endomisiais e perimisiais, além de grande proliferação de tecido conjuntivo indicada pelas setas; D: músculo gastrocnêmio direito, E: músculo gastrocnêmio esquerdo. Barra de escala: 50μm, n=5.

Figura 13. Análise histológica do processo de atrofia muscular após 21 dias de desnervação do músculo gastrocnêmio (GA) de camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} (plano coronal, H&E, 200X). **A)** Músculo GA esquerdo não desnervado de camundongo *Neu1*^{+/+}. **B)** Atrofia das fibras musculares com aumento dos espaços endomisiais e perimisiais e proliferação de tecido conjuntivo indicado pela seta, em GAD desnervado de camundongo *Neu1*^{+/+}. **C)** Músculo GAE não desnervado de camundongo *Neu1*^{-/-} no qual é possível notar áreas com infiltração de tecido conjuntivo endomysial e perimysial indicada pela seta, além de atrofia muscular. **D)** Evidente aumento dos espaços endomisiais e perimisiais e infiltração de tecido conjuntivo, indicada pela seta, além da acentuada atrofia das fibras musculares em GAD desnervado de camundongo *Neu1*^{-/-}; GAD: músculo gastrocnêmio direito, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo. Barra de escala: 50µm, n=5.

6.3 Mensuração da atrofia muscular

A mensuração da área transversa das fibras musculares mostrou redução significativa da área das fibras dos músculos desnervados tanto dos animais *Neu1*^{+/+} quanto dos animais *Neu1*^{-/-}, a partir de 7 dias de desnervação (**Figura 14**). Já no período zero (pré-desnervação) foi possível notar redução significativa da área de secção transversa de GAD nos animais *Neu1*^{-/-} em comparação com *Neu1*^{+/+}. Com 3 dias após a desnervação, tanto em animais *Neu1*^{-/-} quanto em animais *Neu1*^{+/+}, não foi observada atrofia significativa de GAD.

Área de secção transversa muscular

Figura 14. Área de secção transversa das fibras musculares de GA esquerdo e direito de animais *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} em diferentes momentos após desnervação. Teste estatístico utilizado: ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. GAD: músculo gastrocnêmio direito, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo, n=5. *=*P*<0,05; **=*P*<0,01; ***=*P*<0,001.

6.4 Análise ultraestrutural

Os músculos desnervados de animais *Neu1*^{-/-} e *Neu1*^{+/+} apresentaram após 14 dias de desnervação, de forma similar, alterações ultraestruturais características de atrofia muscular induzida por desnervação, tais como redução volumétrica dos sarcômeros, aumento do espaço entre as miofibrilas, áreas de desarranjos da organização do sarcômero com desagregação da linha Z (**Figura 15**). Foi observado um ligeiro aumento na presença de vacúolos autofágicos após a desnervação em ambos os grupos. Em um *n* de 3 músculos não desnervados de animais *Neu1*^{-/-} não foram observados vacúolos autofágicos, sugerindo que a deficiência de Neu1 não causaria espontaneamente a formação de vacúolos autofágicos.

Figura 15. Ultraestrutura do músculo GA de camundongos *NeuI*^{+/+} e *NeuI*^{-/-} não desnervado e após 14 dias de desnervação. A) Organização sarcomérica normal em músculo não desnervado de camundongo *NeuI*^{+/+}. B) Intensa redução do volume sarcomérico com alargamento dos espaços entre as miofibrilas, alterações típicas de atrofia muscular, em músculo desnervado de camundongo *NeuI*^{+/+}. C) Presença de áreas com desorganização dos sarcômeros e desagregação da linha Z, achados frequentemente observados na atrofia muscular, em músculo desnervado de camundongo *NeuI*^{+/+}. D e E) Intensa redução do volume sarcomérico com alargamento dos espaços entre as miofibrilas e presença de áreas com desorganização dos sarcômeros e desagregação da linha Z em músculo desnervado de camundongo *NeuI*^{-/-}. F) Presença de vacúolo autofágico (ao centro da foto) em músculo desnervado de camundongo *NeuI*^{-/-}; n=3.

6.5 Análise da ativação do sistema lisossomal/autofágico

6.5.1 Expressão proteica de LC3

Através da técnica de imunoistoquímica, foi observado a partir de 14 dias de desnervação, aumento da expressão intracitoplasmática de LC3 nos músculos desnervados de camundongos *NeuI^{+/+}* e *NeuI^{-/-}*, sendo que a marcação da proteína não foi observada nos músculos contralaterais (**Figura 16**). Não houve diferenças significativas, verificadas pela técnica de imunofluorescência, entre a marcação expressa de LC3 em músculos desnervados de camundongos *NeuI^{+/+}* (**Figura 16B e B1**) em relação aos animais *NeuI^{-/-}* (**Figura 16D e D1**).

Figura 16. Reação de imunofluorescência indireta com anticorpo anti-LC3 em músculos gastrocnêmios (GA) após 14 dias de desnervação. **A)** Músculo GA esquerdo de camundongo *Neu1^{+/+}*. **A1)** Ampliação da área demarcada em **A**. **B)** Músculo GA direito (desnervado) de camundongo *Neu1^{+/+}*. **B1)** Ampliação da área demarcada em **B**; a seta indica a marcação intracitoplásmica de LC3. **C)** Músculo GA esquerdo de camundongo *Neu1^{-/-}*. **C1)** Ampliação da área demarcada em **C**. **D)** Músculo GA direito (desnervado) de camundongo *Neu1^{-/-}*. **D1)** Ampliação da área demarcada em **D**, as setas indicam a marcação intracitoplásmica de LC3. Barra de escala: 20μm; n=5.

Através da técnica de *Western blot* para análise de expressão proteica de LC3, não foram observadas alterações nos níveis da isoforma LC3I em ambos os grupos, entre o período de 0 e 7 dias de desnervação, entretanto, houve um aumento significativo da expressão em animais *NeuI^{-/-}* a partir de 14 dias de desnervação nos músculos desnervados, próximo de 300% ($P<0,01$) em relação a medida inicial controle (**Figura 17**). O músculo contralateral desses animais também mostrou aumento similar nos níveis de LC3I, entretanto, com significância apenas após 21 de desnervação ($P<0,01$). De forma similar, os músculos dos animais *NeuI^{+/+}*, mostraram aumento significativo de LC3I em relação aos níveis basais nos mesmos períodos em que houve aumento no grupo *NeuI^{-/-}*, entretanto, com mais expressividade em ambos os músculos ao 14º dia de desnervação (GAE ~ 400% e GAD ~ 450%) seguida de queda ao 21º dia de desnervação, diminuindo para ~ 220% e ~ 350% respectivamente (**Figura 17A**). As comparações foram feitas em relação à média de expressão basal de músculos não desnervados de animais *NeuI^{+/+}*.

A expressão da isoforma LC3II, entretanto, aumentou significativamente em músculos desnervados de animais *NeuI^{-/-}* a partir do 7º dia pós desnervação ($P<0,05$) e seguiu com aumento até o 21º dia de desnervação ($P<0,01$) (**Figura 17B**). O músculo contralateral dos mesmos animais mostrou aumento de LC3II apenas após 21 dias de desnervação ($P<0,05$). O grupo controle mostrou aumento nos níveis de LC3II apenas em músculos desnervados por 21 dias ($P<0,01$).

Figura 17. Análise da expressão proteica de LC3 em músculos gastrocnêmios desnervados e não desnervados de camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}. Expressão de LC3I (A) e LC3II (B) nos períodos de 0 - 21 dias após desnervação em relação à média de expressão basal de músculos sem lesão de animais *Neu1*^{+/+} (linhas pontilhadas). Abaixo, *blot* representativo de LC3I, LC3II e α tubulina. Teste estatístico utilizado: Mann Whitney. GAD: músculo gastrocnêmio direito, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo.

6.5.2 Fosfatase ácida

Através da técnica de fosfatase ácida, foi observado aumento da atividade lisossomal nos músculos desnervados em relação aos músculos contralaterais em ambos os grupos de animais, entretanto, de forma mais acentuada nos músculos de animais *Neu1*^{-/-} (Figura 18).

Figura 18. Atividade lisossomal após 14 dias de desnervação do músculo gastrocnêmio (GA) em animais *Neu1*^{-/-} e *Neu1*^{+/+} (fosfatase ácida, 400X). A) Músculo GAE, não desnervado, de camundongo *Neu1*^{+/+}. B) Atrofia muscular com leve aumento dos espaços endomisiais após desnervação, e leve aumento da atividade lisossomal intracitoplasmática em músculo GA desnervado de animais *Neu1*^{+/+}. C) Aumento basal moderado na atividade lisossomal intracitoplasmática e endomisial no músculo GA esquerdo de camundongo *Neu1*^{-/-}. D) Aumento do espaço endomisial, ao lado da intensa atrofia muscular, e grande aumento da atividade lisossomal intracitoplasmática e endomisial no músculo GA desnervado de animais *Neu1*^{-/-}; pontilhados intracitoplasmáticos avermelhados indicados pelas setas: áreas de atividade intensa de fosfatase ácida, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo, GAD: músculo gastrocnêmio direito, n=5. Barra de escala: 20μm.

6.5.3 Análise da expressão proteica de catepsina L

A análise da expressão proteica de catepsina L por *Western Blot* mostrou aumento nos níveis de expressão após 14 e 21 dias de desnervação (**Figura 19**). Houve um aumento significativo na expressão de catepsina L nos músculos desnervados e contralaterais após 14 dias de desnervação nos dois grupos de animais em relação ao nível basal ($P < 0,01$), entretanto, esse aumento se reduziu para próximo da normalidade ao 21º dia pós desnervação. Nos músculos desnervados foi observado aumento significativo nos níveis de catepsina L a partir de 14 dias de desnervação apenas no

grupo *Neu1*^{-/-}.

Figura 19: Análise da expressão proteica de catepsina L em músculos desnervados e não desnervados de animais *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}. Parte inferior da figura: *blot* representativo de catepsina L e α tubulina. GAD: músculo gastrocnêmio direito, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo. A linha pontilhada representa o nível basal de expressão da proteína em músculos não desnervados de animais *Neu1*^{+/+}. Teste estatístico realizado: Mann Whitney.

6.5.4 Análise da expressão proteica de lamp1

A análise de expressão proteica de lamp1 através da técnica de imunofluorescência indireta (**Figura 20**) mostrou aumento da expressão intracitoplasmática de lamp1 em músculos desnervados de ambos os grupos de animais (**Figura 20A e B**), sendo tal aumento mais acentuado nos animais *Neu1*^{-/-}. Nesses animais, notou-se marcações adicionais nos espaços endomisiais de músculos desnervados (**Figura 20D**) e contralaterais (**Figura 20C**).

Figura 20. Expressão de lamp1 por imunofluorescência indireta em cortes transversais de músculos gastrocnêmios de camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} desnervados por 14 dias e não desnervados. A) Músculo GA esquerdo de animal *Neu1*^{+/+}. **A1)** Ampliação da área demarcada em A. **B)** Músculo GA direito desnervado de animal *Neu1*^{+/+}. **B1)** Ampliação da área demarcada em B. **C)** Músculo GA esquerdo de animal *Neu1*^{-/-}. **C1)** Ampliação da área demarcada em C. **D)** Músculo GA direito (desnervado) de animal *Neu1*^{-/-}. **D1)** Ampliação da área demarcada em D. As setas apontam expressão local de lamp1. n=5. Barra de escala 20μm.

A análise da expressão proteica de lamp1 através da técnica de *Western blot* (**Figura 21**) mostrou que, em comparação com os níveis de lamp1 de músculos não desnervados de animais *Neu1^{+/+}*, houve aumento significativo dos níveis da proteína em músculos desnervados por 7 e 14 dias de animais *Neu1^{-/-}* ($P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente) e após 14 dias nos animais *Neu1^{+/+}* ($P<0,05$). Ao 21º dia pós desnervação os níveis de lamp1 mostraram-se similares aos níveis basais, o que mostra que a atividade dessa proteína ocorre por volta do 14º dia pós desnervação, voltando aos seus níveis basais por volta do 21º dia.

Figura 21. Análise da expressão proteica de lamp1 em músculos gastrocnêmios de animais *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}* após 7, 14 e 21 dias de desnervação através de *Western blot*. Abaixo: imagem de *blot* representativo de lamp1 e α tubulina. GAD: músculo gastrocnêmio direito, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo. A linha pontilhada representa o nível basal de expressão proteica de lamp1 de músculos não desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Teste estatístico realizado: Mann Whitney.

6.6 Análise da expressão proteica de colágeno III

A análise da expressão proteica de colágeno III, através de imunoistoquímica, mostrou aumento na expressão da proteína em músculos de animais *Neu1*^{-/-} comparando-se com a expressão de músculos de animais *Neu1*^{+/+}. Houve aumento progressivo da expressão de colágeno III nos músculos desnervados, mais notadamente em animais *Neu1*^{-/-} (**Figura 22**).

Figura 22. Expressão de colágeno III através da técnica de imunoistoquímica em cortes transversais de músculos gastrocnêmios não desnervados e desnervados por 14 dias de camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}. A) Músculo GA esquerdo de animal *Neu1*^{+/+}. B) Músculo GA direito (desnervado) de animal *Neu1*^{+/+}. C) Músculo GA esquerdo de animal *Neu1*^{-/-}. D) Músculo GA direito (desnervado) de animal *Neu1*^{-/-}. Setas indicam intensa marcação de colágeno III. E: músculo gastrocnêmio esquerdo, D: músculo gastrocnêmio direito. Barra de escala: 20μm; n=5.

6.7 Análise da via IGF-1/PI-3k/Akt

A análise da via do IGF-1/PI-3k/Akt foi realizada pela análise da expressão proteica de Akt, proteína chave da via, relacionada com a ativação e inibição de demais

proteínas celulares, resultando no aumento do trofismo muscular. Uma das principais inibições diretas é a da proteína GSK3 β , relacionada com a inibição parcial da síntese proteica, sendo esta proteína também avaliada (**Figura 23**).

A expressão de P-Akt (forma ativa da proteína Akt) nos músculos desnervados mostrou-se significativamente diminuída ao 3º e 21º dia de desnervação nos animais *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}* (**Figura 23C**) em relação ao nível basal. A expressão de P-GSK3 β (forma inativa da proteína) mostrou-se significativamente diminuída no grupo controle ao 3º, 14º, e 21º dia pós desnervação em relação ao nível basal, sendo que no músculo desnervado dos animais *Neu1^{-/-}* seus níveis de mantiveram significativamente baixos ao 3º e 21º dia pós desnervação (**Figura 23D**).

A expressão de Akt total (**Figura 23A**) mostrou-se aumentada no grupo controle ao 7º dia ($P<0,05$) e no grupo *Neu1^{-/-}* ao 21º dia pós desnervação ($P<0,01$), sem diferenças entre os grupos. Não houve alterações na expressão de GSK3 β total (**Figura 23B**).

A razão da expressão de P-Akt/Akt total (**Figura 23E**) mostra que houve diminuição significativa na quantidade de P-Akt/Akt total nos músculos desnervados no 3º e 21º dia pós desnervação nos animais *Neu1^{+/+}* ($P<0,05$) e ao 21º dia no grupo *Neu1^{-/-}* ($P<0,01$). A razão P-GSK3 β /GSK3 β total (**Figura 23F**) mostrou que houve diminuição significativa nos períodos pós desnervação de 3, 14 e 21 dias nos músculos desnervados de ambos os grupos de animais. O músculo contralateral, da mesma forma que a razão do Akt, mostra uma diminuição significativa ao 3º e ao 21º dia de desnervação no grupo *Neu1^{+/+}* e ao 21º dia no grupo *Neu1^{-/-}* em comparação ao nível basal.

Figura 23. Análise da expressão proteica de A) Akt total. B) GSK3β total. C) P-Akt. D) P-GSK3β. E) Razão entre os níveis proteicos de P-Akt e Akt total. F) Razão entre os níveis proteicos de P-GSK3β e GSK3β total. Abaixo: blot representativo das proteínas supracitadas e de α tubulina. Nos gráficos com apenas níveis de expressão de animais *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}* (apenas duas barras) os níveis de expressão dos músculos esquerdos, não desnervados, não foram representados por não ter havido diferenças estatísticas entre esses níveis e os níveis basais de expressão. GAD: músculo gastrocnêmio direito, GAE: músculo gastrocnêmio esquerdo. A linha pontilhada representa os níveis basais de expressão proteica de músculos não desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Teste estatístico utilizado: Mann Whitney.

6.8 Análise da ativação do sistema ubiquitina-proteassomo

A análise da ativação do sistema ubiquitina-proteassomo (SUP) foi realizada através da expressão relativa dos atrogenes *Atrogina-1* e *MuRF1* pelo método de PCR em tempo real (**Figura 24**). O *GAPDH* foi o normatizador das reações. A expressão de *Atrogina-1* se mostrou elevada significativamente nos animais *Neu1^{+/+}* em músculos desnervados por 3 dias em relação aos seu níveis basais, em ~ 500% ($P<0,05$), enquanto que animais *Neu1^{-/-}* mostraram um retardo em tal elevação, que ocorreu após o 7º dia de desnervação ($P<0,05$), entretanto, com um aumento de ~ 1300%, indicando um retardo associado a sua potencialização na expressão de *Atrogina-1*. Após esse período, os níveis de *Atrogina-1* de ambos os grupos retornaram aos níveis basais.

A elevação da expressão de *MuRF-1* em relação aos níveis basais, em ambos os grupos animais, ocorreu ao 7º dia pós desnervação ($P<0,05$ para ambos), seguido de queda significativa de sua expressão no grupo *Neu1^{-/-}* ao 14º dia de desnervação ($P<0,05$), e no grupo *Neu1^{+/+}* ao 21º dia. Tais dados sugerem que a atividade degradatória pelo SUP ocorre essencialmente, nos primeiros dias pós desnervação sendo reduzida sua participação, no que diz respeito aos atrogenes, em algum momento entre o 7º e 14º dia.

Figura 24. Expressão relativa dos atrogenes *Atrogina-1* (A) e *MuRF1* (B) em músculos gastrocnêmios desnervados de camundongos *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}*, em diferentes momentos após desnervação. A linha pontilhada representa os níveis basais dos atrogenes em músculos não desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Teste estatístico realizado: Mann-Whitney com pós-teste de Dunn.

6.9 Análise da expressão proteica de MyoD

Os níveis de expressão proteica de MyoD, avaliados por *Western blot* não mostraram diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos grupos musculares quando comparados com a expressão basal dessa proteína (**Figura 25**).

Figura 25. Análise da expressão proteica de MyoD em músculos gastrocnêmios em diferentes períodos de desnervação. Linha pontilhada representa nível basal de expressão proteica de MyoD. Abaixo: *blot* representativo de MyoD e α tubulina. Apenas os níveis de expressão proteica de músculos desnervados estão representados, já que em músculos não desnervados não houve diferenças na comparação com os níveis basais de expressão. Teste estatístico realizado: Mann Whitney.

6.10 Análise da expressão gênica de neuraminidases

Os níveis de expressão gênica da neuraminidase-1 (**Figura 26**), neuraminidase-2 (**Figura 27**), neuraminidase-3 (**Figura 28**), neuraminidase-4 (**Figura 29**) foram avaliados, sendo que em animais *Neu1^{+/+}*, houve diferenças significativas apenas nos níveis de *Neu1*, com aumento após 7 e 14 dias de desnervação e ao 21º dia, voltando a níveis basais. Entretanto, os níveis de *Neu3* se mostraram significativamente aumentados, em até ~ 1000% nos animais *Neu1^{-/-}* nos períodos entre 3 e 21 dias de desnervação em relação aos níveis basais (**Figura 28B**, $P < 0,01$). De forma oposta, os níveis de *Neu4* nesse grupo se mostraram significativamente diminuídos em relação ao

nível basal de expressão desde o início do estudo (dia 0) até seu término ao 21º dia pós desnervação, com diminuições em torno de 60% (**Figura 29 B**).

Figura 26. Análise da expressão relativa de *Neu1* em diferentes momentos pós desnervação em músculos gastrocnêmios desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Linha pontilhada indica nível basal de *Neu1* de músculos não desnervados. Teste estatístico realizado: Mann Whitney * $P < 0,05$.

Figura 27. Análise da expressão relativa de *Neu2* em diferentes momentos pós desnervação em músculos gastrocnêmios desnervados de animais *Neu1^{+/+}* (A) e *Neu1^{-/-}* (B). Linha pontilhada indica a expressão basal de *Neu2* de músculos não desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Teste estatístico realizado: Mann Whitney.

Figura 28. Análise da expressão relativa de *Neu3* em diferentes momentos pós desnervação em músculos gastrocnêmios desnervados de animais *Neu1^{+/+}* (A) e *Neu1^{-/-}* (B). Linha pontilhada indica a expressão basal de *Neu3* de músculos não desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Teste estatístico realizado: Mann Whitney.

Figura 29. Análise da expressão relativa de *Neu4* em diferentes momentos pós desnervação em músculos gastrocnêmios desnervados de animais *Neu1^{+/+}* (A) e *Neu1^{-/-}* (B). Linha pontilhada indica a expressão basal de *Neu4* de músculos não desnervados de animais *Neu1^{+/+}*. Teste estatístico realizado: Mann Whitney.

7. Discussão

Este estudo objetivou avaliar o envolvimento da enzima neuraminidase-1 no processo de atrofia muscular induzida por desnervação. Devido à apresentação atrofica dos músculos esqueléticos de portadores da sialidose, objetivamos descrever alterações musculares em modelo animal, afim de melhor compreender seu envolvimento no processo de degradação muscular.

A análise da musculatura esquelética de camundongos com deficiência de Neu1 mostrou em um estudo prévio uma importante atrofia muscular e consequente perda de peso muscular e corporal (Zanoteli *et al.*, 2010). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na indução desta atrofia não são totalmente conhecidos e sua identificação é importante no sentido de determinar o envolvimento lisossomal no controle da massa muscular.

Neste estudo, observamos que tanto em animais normais quanto naqueles com deficiência de Neu1, a desnervação produziu significativa atrofia muscular esquelética, sendo que, como em estudos anteriores (Sacheck *et al.*, 2007) a maior taxa de redução de peso dos músculos desnervados ocorreu nos primeiros 14 dias pós desnervação. Desta forma, aparentemente, a deficiência da Neu1 não interferiu no grau da atrofia muscular induzida pela desnervação. No entanto, a redução da área de secção transversa das fibras foi superior nos animais *Neu1^{+/-}*, provavelmente porque os animais *Neu1^{-/-}* já apresentavam certo grau de atrofia muscular basal em decorrência da deficiência da Neu1.

A atrofia muscular basal que se observa nos animais *Neu1^{-/-}* pode ser decorrente em parte da ativação de proteínas lisossomais; e isto ocorreria, pois a quantidade de ácido siálico da porção terminal dessas proteínas não é regulada adequadamente na ausência da Neu1. A sialilação excessiva (oversialilação) de certas proteínas lisossomais, tais como a catepsina B, faz com que elas permaneçam no estado ativado, potencializando a degradação celular (Yogalingam *et al.*, 2008, Zanoteli *et al.*, 2010), visto que a maioria das proteínas lisossomais contém ácido siálico como parte de suas cadeias e sua modificação pode estender as suas meia-vidas (Pshezhetsky & Ashmarina, 2013).

A atrofia muscular ocorre com a ativação de diferentes sistemas, como por exemplo, o lisossomal/autofágico e sistema ubiquitina-proteassomo, ambos avaliados nesse

estudo (Voisin *et al.*, 1996; Glass, 2003).

A ativação lisossomal ocorre na atrofia muscular por diversas causas, entre elas, a atrofia induzida por desnervação (Furuno *et al.* 1990). Furuno e colaboradores (1990) demonstraram que a desnervação é um método eficiente para induzir a formação de vacúolos autofágicos no tecido muscular, porém, em nosso experimento, apesar da evidente indução de atrofia muscular, não observamos através de análise ultraestrutural aumento significativo da presença de vacúolos autofágicos em nenhum dos dois grupos experimentais. Assim, não foi possível concluir se a deficiência de Neu1 seria capaz de interferir na formação dos vacúolos autofágicos. Mas podemos suspeitar que a deficiência de Neu1 não induziria a formação de autofagossomos espontaneamente, como ocorre na deficiência de outras proteínas lisossomais, tais como a alfa-glucosidase (doença de Pompe) e lamp2 (doença de Danon) (Nishino, 2006). De forma similar, não houve diferença significativa na expressão de LC3 nos músculos desnervados de animais controle em relação aos animais *Neu1^{-/-}*, reforçando a idéia de que a deficiência da Neu1 não parece interferir com o processo de ativação da autofagia. No entanto, ainda persiste a dúvida de que a desnervação não seja um método adequado para estudar autofagia no músculo esquelético. Estudos futuros usando medicamentos capazes de ativar e de inibir o processo de autofagia poderão ser úteis para esclarecer a real participação da Neu1 neste processo.

A análise da reação para fosfatase ácida e de expressão do lamp1 e da catepsina L revelou que o sistema lisossomal se mostrou ativo durante o processo de atrofia muscular em diferentes momentos após desnervação, tanto em animais com deficiência da Neu1 quanto nos animais normais, sendo, entretanto, sua ativação maior na deficiência da Neu1. Isto indica que, de alguma forma, a presença da Neu1 é importante para controlar a intensidade da ativação lisossomal que ocorre nos processos atroficos.

Os níveis de lamp1, proteína envolvida no processo de exocitose lisossomal mostraram-se aumentados nos músculos de animais desnervados, porém os maiores níveis de expressão foram detectados nos músculos desnervados de animais *Neu1^{-/-}*. Considerando que na deficiência de Neu1 ocorre hipersialilação do lamp1, a qual acarreta aumento da exocitose lisossomal (Yogalingam *et al.*, 2008); assim como aumento nos níveis da fosfatase ácida, enzima que atua na hidrólise lisossomal (Essner, E. & Novikoff, 1961); a ocorrência de elevação nos níveis de exocitose lisossomal e de

atividade hidrolítica nos músculos de animais *Neu1^{-/-}* poderia explicar em parte, a ocorrência de atrofia muscular. Assim como já descrito para a catepsina B, os níveis proteicos de catepsina L, proteína lisossomal reguladora de degradação celular (**Sandri et al., 2004; Mammucari et al., 2007; Hasselgren et al., 2010**), aumentaram após a desnervação, especialmente em músculos desnervados de animais *Neu1^{-/-}*. No entanto, neste estudo não avaliamos se a catepsina L também sofre processo de hipersialilação na deficiência de Neu1.

Assim, podemos especular que a redução da expressão da Neu1 seria um potencial indutor de atrofia muscular. O aumento da atividade lisossomal induzido pela deficiência de Neu1 poderia levar a aumento da quantidade e da atividade de enzimas, tais como catepsinas, que participam do processo de degradação de proteínas e de constituintes intracitoplasmáticos na fibra muscular (**Sandri, 2008**).

A principal diferença que observamos nos músculos desnervados dos animais com deficiência de Neu1 em relação aos controles normais foi o aumento dos espaços extracelulares (endomísio e perimísio). Já é sabido que na musculatura esquelética de camundongos com deficiência de Neu1 são observadas, ao lado de atrofia muscular, áreas de degeneração progressiva em associação com profunda alteração dos componentes da MEC. As principais alterações observadas incluem excessivo acúmulo de colágeno e proliferação de fibroblastos com expansão do espaço epimisial e perimisial associados à presença de intensa atividade gelatinolítica na MEC (**Zanoteli et al., 2010**). A presença da proliferação excessiva de fibroblastos na musculatura esquelética de camundongos com deficiência de Neu1 vai de encontro aos achados de **Hinek** e colaboradores (**2008**), e sugere fortemente uma relação da Neu1 no controle do potencial proliferativo celular. Desta forma, acreditamos que o aumento progressivo dos espaços extracelulares após a desnervação observado nos animais com deficiência de Neu1 através de análises histológicas e da expressão de colágeno III, seja decorrente de um agravamento das alterações já descritas na MEC nestes animais.

A análise dos níveis de expressão da proteína Akt fosforilada (P-Akt), forma ativa de Akt, proteína envolvida na síntese proteica (**Jefferson et al., 1999; Bodine, 2001b; Léger et al., 2006; Gundersen, 2011**), mostrou diminuição após a desnervação de forma progressiva após o 7º dia de desnervação.

Os níveis de GSK3 β mostraram-se aumentados, sem diferença significativa,

durante todo o período de atrofia muscular após desnervação, relacionado à menor expressão de P-Akt, principalmente ao 3º, 14º e 21º dia pós desnervação. A deficiência da neuraminidase-1 neste caso parece não influenciar a ativação da atividade de Akt ou GSK3 β , tendo os músculos de ambos os grupos sido acometidos de forma similar, com menor expressão do constituinte inativo de GSK3 β (P- GSK3 β), que indica inibição parcial da síntese proteica e, pela menor atividade de Akt, maior ativação de FoxOs, acarretando ativação do SUP.

Diversos estudos têm demonstrado o aumento da expressão de atrogenes (*Atrogina-1* e *MuRF1*) na atrofia muscular induzida por situações diversas, incluindo desnervação (**Bodine et al., 2001**). As enzimas ligadoras E3, MuRF1 e Atrogina-1, são ativadas em situações diversas relacionadas com a atrofia muscular, atuando diretamente na cascata de ativação do sistema ubiquitina-proteassomo (**Bodine, et al., 2001; Gomes et al., 2001**). Desta forma, modelos animais com deficiência destas ligadoras E3 apresentam caracteristicamente resistência à atrofia muscular (**Bodine et al., 2001**).

Segundo **Gomes** e colaboradores (**2001**), um grande aumento da expressão de *Atrogina-1* é observado nos períodos iniciais da indução de atrofia por jejum, até aproximadamente 30 horas, estabilizando-se após esse período. Isso poderia estar ocorrendo também em nosso experimento com a indução de atrofia por desnervação, em que observamos um aumento na expressão dos atrogenes *Atrogina-1* e *MuRF1*, com um pico de expressão gênica após 3 dias de desnervação para a *Atrogina-1* e 7 dias para o *MuRF1*, no entanto, houve um atraso no pico de expressão de *Atrogina-1* em músculos de animais *Neu1*^{-/-}, que ocorreu após 7 dias de desnervação, porém com um aumento maior do que nos animais *Neu1*^{+/+}. Esse achado indica que o sistema ubiquitina-proteassomo é mais ativado em animais *Neu1*^{-/-} após a desnervação.

Nosso estudo mostrou que, diferentemente do que ocorre para as ligadoras E3, a deficiência da Neu1 não protegeu a fibra muscular dos efeitos da desnervação. Paralelamente, a desnervação produziu na musculatura esquelética dos animais com deficiência de Neu1, uma maior ativação lisossomal, medida pela reação de fosfatase ácida e pela maior expressão de lamp1 e catepsina L.

O MyoD, proteína envolvida na diferenciação muscular, é um substrato da atrogina-1, que sinaliza a sua degradação, (**Sandri et al., 2008**). Nesse estudo não ocorreram alterações nos níveis proteicos de MyoD, apesar de estudos anteriores

(Ishido *et al.*, 2004; Voytik *et al.*, 1993; Walters *et al.*, 2000) terem descrito um aumento na expressão de MyoD pós desnervação. Como o MyoD é mais expresso em fibras de contração rápida (Ekmark *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 1997), a análise feita no gastrocnêmio, um músculo de composição mista de tipos de fibras, pode ter afetado nossos resultados (Hodgson *et al.*, 1991; Rome *et al.*, 1988), assim como a degradação de MyoD pelo sistema ubiquitina-proteassomo, que foi bastante ativado em nosso estudo. Um fator que também influencia a expressão gênica e proteica muscular após a desnervação é o estímulo hormonal, diferente entre machos e fêmeas, que pode acarretar alterações mais pronunciadas em tipos específicos de fibras musculares (Aravamudan *et al.*, 2006). Outro ponto, é que nosso estudo avaliou a apenas a expressão proteica de MyoD total, portanto não é possível saber se ocorreu ativação ou inativação da proteína, que em sua forma fosforilada se torna inativa (Ekmark *et al.*, 2007).

A análise da expressão gênica de *Neu1*, sialidase lisossomal (Miyagi e Tsuiki 1984, 1985; Miyagi *et al.* 1990), em músculos de animais *Neu1*^{+/+} mostrou um aumento na expressão após a desnervação, chegando a níveis basais ao 21º dia pós desnervação. Esse achado indica que há mais transcrição de *Neu1* na atrofia muscular induzida, ressaltando que a *Neu1* é uma proteína ativada durante a atrofia induzida por desnervação. Analisamos também a expressão de outras sialidases no sentido de verificar um padrão diferencial de expressão entre elas durante a atrofia muscular, e por outro lado, pesquisar se haveria ativação de outras sialidases para compensar a deficiência da *Neu1*. A análise da expressão gênica de *Neu2*, sialidase presente no citoplasma (Miyagi e Tsuiki 1984, 1985; Miyagi *et al.* 1990), relacionada à diferenciação celular, mostrou que não houve alterações significantes nos níveis de expressão após desnervação em músculos de animais *Neu1*^{-/-} e animais *Neu1*^{+/+}. Porém os músculos de animais *Neu1*^{-/-} apresentaram menores níveis de *Neu2*, no entanto, sem diferença estatística significativa.

A análise da expressão gênica de *Neu3*, sialidase presente na membrana plasmática (Miyagi e Tsuiki 1984, 1985; Miyagi *et al.* 1990), mostrou que não houve alterações significantes nos níveis de expressão após desnervação em músculos de animais *Neu1*^{+/+}. Porém, em músculos de animais *Neu1*^{-/-}, houve um aumento da expressão relativa de *Neu3* após desnervação, talvez como um mecanismo compensatório.

A análise da expressão gênica de *Neu4*, sialidase que apresenta duas isoformas e está presente nas mitocôndrias e no lúmen lisossomal (Miyagi e Tsuiki 1984, 1985; Miyagi *et al.* 1990), mostrou que não houve alterações significantes nos níveis de expressão após desnervação em músculos de animais *Neu1^{+/+}*. Porém, em músculos de animais *Neu1^{-/-}*, observou-se uma redução da expressão relativa de *Neu4*. Estes achados em conjunto, deixam claro que, a atuação das outras formas de sialidases em processos que regulam a massa muscular parece ser distinta, refletindo as suas diferentes localizações e substratos celulares.

8. Conclusões

- A desnervação induz atrofia de fibras musculares mesmo na deficiência de Neu1, causando neste grupo significativa alteração histológica, caracterizada por aumento dos espaços endomisiais e perimisiais.
- A deficiência da Neu1 não parece afetar a ativação de LC3 (ativação da autofagia) e não induz espontaneamente a ocorrência de autofagossomos na musculatura esquelética após desnervação.
- A desnervação induz significativa ativação do sistema lisossomal, efeito este que é potencializado na deficiência da Neu1.
- A deficiência de Neu1 acarreta maior deposição de colágeno III no tecido muscular após desnervação.
- A deficiência de Neu1 parece não interferir na ativação da via IGF-1/PI-3k/Akt que ocorre na atrofia induzida por desnervação. No entanto, parece elevar a ativação de atrogenes nesta condição.
- A deficiência de Neu1 aparentemente não interfere com a expressão de MyoD durante a atrofia muscular induzida por desnervação.
- O gene da Neu1 é ativado no tecido muscular após desnervação.
- Dentre as diferentes formas de sialidades, apenas a Neu3 parece compensar a deficiência da Neu1. Os tipos Neu2 e Neu4, aparentemente, não participam significativamente do processo de atrofia muscular induzida por desnervação.

9. Anexos

Anexo A: Aprovação da inclusão do projeto de mestrado pela Cappelq.

CIÊNCIA

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 18/01/2011, **TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) referente ao Protocolo de Pesquisa nº **0346/09**, intitulado: "**ENVOLVIMENTO DA NEURAMINIDASE 1 NA ATROFIA E REGENERAÇÃO MUSCULAR**", apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**.

- Carta datada de 04.11.10 - Solicitação da inclusão da aluna Vanessa Rodrigues Rizzato para ingresso no programa de pós-graduação nível mestrado junto ao Departamento de Neurologia

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. GERSON CHADI**

DR. EDMAR ZANOTELI

CAPPesq, 18 de Janeiro de 2011

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Anexo B: Descrição do número de amostras dos experimentos de expressão proteica e gênica.

LC3I (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	4
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5

LC3II (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	2
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	4
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

catepsina L (Western blot)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

lamp1 (Western blot)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	4
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

Akt total (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	2
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	5
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

P-Akt (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	2
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	5
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

GSK3 β total (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

P-GSK3 β (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	5
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

P-Akt/Akt total (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	2
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	5
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5

P-GSK β /GSK3 β total (<i>Western blot</i>)			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

<i>Atrogina-1 (real time)</i>			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	4
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	4
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5

<i>MuRF-1 (real time)</i>			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5

<i>MyoD (Western blot)</i>			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAE	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	6
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAE	6

<i>Neu1 (real time)</i>			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	9

<i>Neu2 (real time)</i>			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	4
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	7
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	7
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	8
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	8
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	8
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	8

<i>Neu3 (real time)</i>			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	4
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	3
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	9
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	6
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	5
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	9
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	7
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	7

<i>Neu4 (real time)</i>			
Desnervação (dias)	Genótipo	Músculo	n
0	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	4
3	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	5
7	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	10
14	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	10
21	<i>Neu1^{+/+}</i>	GAD	8
0	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
3	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	4
7	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	9
14	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	9
21	<i>Neu1^{-/-}</i>	GAD	9

10. Referências Bibliográficas

- Aravamudan B, Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. **J. Appl. Physiol.** 100:1617-1622, 2006.
- d'Azzo, Andria G, Strisciuglio P, Galjaard H. Galactosialidosis. **Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. (New York: McGraw Hill, Inc.), 3811-26, 2001.
- Birkenkamp KU, Coffey PJ. Regulation of cell survival and proliferation by the FoxO(Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. **Biochem. Soc. Trans.** 31(Pt 1), 292-297, 2003.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science.** Nov 23; 294(5547):1704-8, 2001.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat. Cell Biol.** 3(11), 1014-1019, 2001b.
- Bonten E, Spoel A, Fornerod M, Grosveld G, d'Azzo A. Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. **Genes Dev.** 10: 3156-69, 1996.
- Bonten E, Arts WF, Beck M, Covanis A, Donati MA, Parini R, Zammarchi E, d'Azzo, A. Novel mutations in lysosomal neuraminidase identify functional domains and determine clinical severity in sialidosis. **Hum. Mol. Genet.** 9: 2715-25, 2000.
- Clemmons, DR. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. **Trends Endocrinol. Metab.** Sep;20(7):349-56, 2009.
- Crepaldi T, Bersani F, Scuoppo C, Accornero P, Prunotto C, Taulli R, Forni P E, Leo C, Chiarle R, Griffiths J, Glass D J, Ponzetto C. Conditional Activation of *MET* in Differentiated Skeletal Muscle Induces Atrophy. **J. Biol. Chem.** 282 - 9: 6812-6822, 2007.
- Dehoux M, Van Beneden R, Pasko N, Lause P, Verniers J, Underwood L, Ketelslegers JM, Thissen JP. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogin-1/MAFbx during fasting and diabetes. **Endocrinology.** 145: 4806-4812, 2004.
- Dokken BB, Sloniger JA, Henriksen EJ. Acute selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances insulin signaling in prediabetic insulin-resistant rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** Jun;288(6), 2005.
- Dufner A, Andjelkovic M, Burgering BM, Hemmings BA, Thomas G. Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic

translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. **Mol. Cell Biol.** 19(6), 4525-4534, 1999.

Ekmark M, Rana ZA, Stewart G, Hardie DG, Gundersen K. De-phosphorylation of MyoD is linking nerve-evoked activity to fast myosin heavy chain expression in rodent adult skeletal muscle. **J. Physiol.** 584: 637-650, 2007.

Essner, E. & Novikoff, A. B. Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** 9, 773-784, 1961.

Fielitz J, Kim M, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. **J. Clin. Invest.** 117(9):2486-2495, 2007b.

Furuno K, Goodman MN, Goldberg AL. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. **J. Biol. Chem.** 265: 8550-7, 1990.

Furuno, K., Goodman, M. N., and Goldberg, A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. **J. Biol. Chem.** 265, 8550-8557, 1990.

Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends Mol. Med.** 9, 344-50, 2003.

de Geest N, Bonten E, Mann L, Sousa-Hitzler J, Hahn C, d'Azzo A. Systemic and neurologic abnormalities distinguish the lysosomal disorders sialidosis and galactosialidosis in mice. **Hum. Mol. Genet.** 11:1455-64, 2002.

Goldberg, A. L. Protein turnover in skeletal muscle. II. Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle. **J. Biol. Chem.** 244, 3223-3229, 1969.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Dec 4; 98(25):14440-5, 2001.

Gundersen, K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** Aug;86(3):564-600, 2011.

Haddad, F., Roy, R., Zhong, H., Edgerton, V., and Baldwin, K. Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. **J. Appl. Physiol.** 95, 791-802, 2003.

Hasselgren PO, Alamdari N, Aversa Z, Gonnella P, Smith IJ, Tizio S. Corticosteroids and muscle wasting: role of transcription factors, nuclear cofactors, and hyperacetylation. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** Jul;13(4):423-8, 2010.

- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. **Annu. Rev. Biochem.** 67:425-79, 1998.
- Hinek A, Bodnaruk TD, Bunda S, Wang Y, Liu K. Neuraminidase-1, a subunit of the cell surface elastin receptor, desialylates and functionally inactivates adjacent receptors interacting with the mitogenic growth factors PDGF-BB and IGF-2. **Am. J. Pathol.** 173:1042-56, 2008.
- Hodgson JA, Bodine-Fowler SC, Roy RR, de Leon RD, de Guzman CP, Koslovskaya I, Sirota M, Edgerton VR. Changes in recruitment of rhesus soleus and gastrocnemius muscles following a 14 day spaceflight. **Physiologist.** 34:S102-S103, 1991.
- Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNA in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. **Development.** 118:1137-1147, 1993.
- Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs Am. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. **Mech. Dev.** 61:151-163, 1997.
- INSERM. Orphanet: The portal for rare diseases and orphan drugs [base de dados na internet]. Institut national de la santé et de la recherche médicale. atualizado em 22 Jun 2014 [Acessado em 23 Jun 2014]. Disponível em: <http://www.orpha.net>
- Ishido M, Kami K, Masuhara M. In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 287: C484-493, 2004.
- Jagoe, R. T., Lecker, S. H., Gomes, M., and Goldberg, A. L. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. **FASEB J.** 16, 1697-1712, 2002.
- Jefferson LS, Fabian JR, Kimball SR. Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 31(1), 191-200, 1999.
- Jentsch S, Seufert W, Hauser HP. Genetic analysis of the ubiquitin system. **Biochim Biophys. Acta.** Jun 13;1089(2):127-39. 1991.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J.** 19: 5720-8, 2000.
- Kato T, Wang Y, Yamaguchi K, Milner CM *et al.* Overexpression of lysosomal-type sialidase leads to suppression of metastasis associated with reversion of malignant phenotype in murine B16 melanoma cells. **Int. J. Cancer.** 92: 797-804, 2001.
- Kijimoto-Ochiai S, Koda T, Suwama T, Matsukawa H, Fujii M, Tomobe K, Nishimura M. Low expression of Neu2 sialidase in the thymus of SM/J mice existence of

neuraminidase positive cells “Neu-medulloocyte” in the murine thymus. **Glycoconjugate J.** 25 - 8: 787-796, 2008.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy.** Feb; 4(2):151-75, 2008.

Lecker S, Jagoe R, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price S, Mitch W, Goldberg A. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB J.** 18, 39-51, 2004.

Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, Russell AP. Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and FoxO1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J. Physiol.** Nov 1;576(Pt 3):923-33, 2006.

Legerlotz K and Smith HK. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. **Muscle Nerve.** 38: 1087-1100, 2008.

Lowden JA, O'Brien JS. Sialidosis: a review of human neuraminidase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.** 31:1-18, 1979.

Lyons LA, Laughlin TF, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, O'Brien SJ. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. **Nat. Genet.** Jan; 15(1):47-56, 1997.

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. **Cell Metab.** Dec;6(6):458-71, 2007.

McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. **J. Cell Biol.** 157:125-136, 2002.

Medina R, Wing SS, Goldberg AL. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. **Biochem. J.** May 1, 307 (Pt 3):631-7, 1995.

Merlie, J., Isenberg, K., Russell, S., and Sanes, J. Denervation supersensitivity in skeletal muscle: analysis with a cloned cDNA probe. **J. Cell Biol.** 99, 332-335, 1984.

Miyagi T, Sagawa J, Konno K, Handa S, Tsuiki S. Biochemical and immunological studies on two distinct ganglioside-hydrolyzing sialidases from the particulate fraction of rat brain. **J Biochem** (Tokyo). 107:787-793, 1990.

- Miyagi T, Tsuiki S. Rat-liver lysosomal sialidase. Solubilization, substrate specificity and comparison with the cytosolic sialidase. **Eur. J. Biochem.** 141:75-81, 1984.
- Miyagi T, Tsuiki S. Purification and characterization of cytosolic sialidase from rat liver. **J. Biol. Chem.** 260:6710-6716, 1985.
- Miyagi T, Yamaguchi, K. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. **Glycobiology.** Feb; 22(7):880-896, 2012.
- Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, Shiozaki K, Sato I, Kakugawa Y. Human sialidase as a cancer marker. **Proteomics.** 8: 3303-11, 2008.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. **Mol. Biol. Cell.** 15:1101-11, 2004.
- Mizushima Laboratory Department of Biochemistry and Molecular Biology website. [acessado em 05 Jun de 2014]. Disponível em <http://www.cellcycle.m.u-tokyo.ac.jp/english/research/index.html>
- Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. **Semin. Pediatr. Neurol.** 13:90-5, 2006.
- Papini N, Anastasia L, Tringali C, Dileo L, Caburelli I, Sampaolesi M, Monti E, Tettamanti G, Venerando B. MmNEU3 Sialidase Over-Expression in C2C12 Myoblasts Delays Differentiation and Induces Hypertrophic Myotube Formation. **J. Cell. Biochem.** 113:2967-2978, 2012.
- Pshezhetsky, AV, Ashmarina, LI. Desialylation of Surface Receptors as a New Dimension in Cell Signaling. **Biochemistry (Mosc).** Jul; 78(7):736-45, 2013.
- Powell, SR. The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 291:H1-H19, 2006.
- Qin J, Du R, Yang YQ, Zhang HQ, Li Q, Liu L, Guan H, Hou J, An XR. Dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy was associated with upregulation of myostatin promoter activity. **Res. Vet. Sci.** Aug 29, 2012.
- Rome LC, Funke RP, Alexander RM, Lutz G, Aldridge H, Scott F, Freadman M. Why animals have different muscle fibre types. **Nature.** 335:824-827, 1988.
- Sacheck JM, Hyatt JPK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **FASEB J.** 21, 140-155, 2007.
- Sandri M. Autophagy in skeletal muscle. **FEBS Lett.** 584: 1411-1416, 2010.
- Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology Rev.** 23:160-70,

2008.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, *et al.* FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**. 117(3), 399-412, 2004.

Sawada M, Moriya S, Saito S, Shineha R. *et al.* Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. **Int. J. Cancer**. 97: 180-5, 2000.

Schakman O, Gilson H, Thissen JP. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. **J. Endocrinol**. 197:1-10, 2008.

Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP. Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. **Horm. Res.** Nov; 72 Suppl 1:36-41, 2009.

Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS J.** Sep; 280(17):4294-314, 2013.

Shiozaki K, Koseki K, Yamaguchi K, Shiozaki M, Narimatsu H, Miyagi T. Developmental change of sialidase Neu4 expression in murine brain and its involvement in the regulation of neuronal cell differentiation. **J. Biol. Chem**. 284(32): 21157-21164, 2009.

Solomon, V., and Goldberg, A. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. **J. Biol. Chem**. 271, 26690-26697, 1996.

Thomas GH. Disorders of glycoprotein degradation and structure: amannosidosis, b-mannosidosis, fucosidosis, and sialidosis, In **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. (New York: McGraw Hill, Inc.), pp. 3507-34, 2001.

Varki A, Schauer R. Sialic Acids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, editors. **Essentials of Glycobiology**. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 14; 2009.

Verhees KJ, Schols AM, Kelders MC, Op den Kamp CM, van der Velden JL, Langen RC. Glycogen synthase kinase-3 β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**. C995-C1007, 2011.

Voisin L, Breuille D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Aurousseau E, *et al.* Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. **J. Clin. Invest**. 97:1610-7, 1996.

Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF, Konieczny SF. Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. **Dev. Dyn**.

198:214-224, 1993.

Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. **J. Muscle Res. Cell Motil.** 21:647-653, 2000.

Wing SS, Goldberg AL. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. **Am. J. Physiol.** Apr;264(4 Pt 1):E668-76. 1993.

Yogalingam G, Bonten EJ, van de Vlekkert D, Hu H, Moshiah S, Connell SA, d'Azzo A. Neuraminidase 1 Is a Negative Regulator of Lysosomal Exocytosis. **Dev. Cell.** 15:74-86, 2008.

Zanoteli E, Bonten E, van de Vlekkert D, Mann L, d'Azzo A. The role of neuraminidase 1 in muscle atrophy. **Neuromuscul. Disord.** 17(9 – 10):896-6, 2007.

Zanoteli E, Bonten E, van der Vlekkert D, Hu H, Mann L, Harris AJ, Ghersi G, d'Azzo A. Muscle fiber degeneration following invasion of connective tissue in neuraminidase 1 deficiency. **Biochim. Biophys. Acta.** 1802(7-8):659-72, 2010.