RUBENS DE LARINA NETO

**Estudo do envolvimento da neuraminidase 1 no processo de
autofagia na musculatura esquelética**

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

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

**São Paulo
2019**

RUBENS DE LARINA NETO

**Estudo do envolvimento da neuraminidase 1 no processo de
autofagia na musculatura esquelética**

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

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão
original está disponível na Biblioteca da FMUSP).

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Larina Neto, Rubens de
Estudo do envolvimento da neuraminidase 1 no
processo de autofagia na musculatura esquelética /
Rubens de Larina Neto. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Neuraminidase 2.Sialidase
3.Mucopolídeos 4.Autofagia 5.Privação de alimentos
6.Colchicina 7.Sirolimo 8.Atrofia muscular
9.Exocitose lisossomal

USP/FM/DBD-204/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, Walmir e Marylaine, ao meu irmão João Pedro e a Vanessa por toda compreensão, auxílio e carinho principalmente nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Dr. Edmar Zanoteli, por a imensa oportunidade de realizar o mestrado na FMUSP, pelos conhecimentos transmitidos, pelo acompanhamento e ajuda em todas as etapas de realização do trabalho, além da amizade e apoio dado em todas as fases difíceis e toda paciência cedida nesta jornada. Obrigado por esta chance e por acreditar neste crescimento profissional e de vida.

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

Ao Professor Dr. Gerson Chadi na cooperação e acolhida no LIM 45.

Ao Dr. André Macedo Serafim, Dr. Rodrigo de Holanda Mendonça, Dr. Eduardo de Paula Estephan, Dra. Clara Gontijo Camelo, Dr. Osorio Abath Neto e Dra. Umbertina Cont Reed na amizade, ensinamentos e direcionamentos neste trabalho.

À pesquisadora Dra. Jessica Ruivo Maximino, nas sugestões acolhidas e amizade.

Aos colegas e colaboradores do LIM 45 Dr. Alan Fappi, Dra. Juliana de Carvalho Neves, Leandro Nunes Sanches, Francisco Marcos Alencar, Felipe Pereira da Silva, Thayane Corrêa Pereira Brandão e Renne Figueiredo por esta parceria, além da contribuição teórica e prática.

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

Aos amigos Dra. Chary Ely Martin Márquez Batista e Erick D. Mariano, Matheus Miranda, Eliene Campos e Luiz Roberto Silva por momentos de descontração e incentivo.

Aos amigos e funcionários do LIM 15, Rosa, Fernanda, Stella, Isabela, Dra. Roseli, Paula e Carlos Eduardo por todo apoio profissional e pessoal durante essa jornada.

Ao programa de Pós-Graduação, por me dar oportunidade e aprovação para realizar esse projeto.

Aos meus pais Walmir e Marylaine que são meus heróis, que em toda dificuldade me moldaram e ensinaram. Sem vocês nada disso teria acontecido.

Aos meus avós, vó Josephina, vô Antônio, vó Ascencion e vô Rubens que sempre estiveram cuidando de mim e me protegendo lá de cima.

Aos meus padrinhos Paulo e Mery que sempre me amaram e se propuseram a dar o melhor a mim.

Ao meu irmão João Pedro meu melhor amigo e meu maior apoio para todos os momentos, este trabalho também é seu.

À Vanessa que desde o começo sempre esteve ao meu lado, me apoiando nos momentos que estava perdido, sendo a luz de toda escuridão.

À FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro e aos honráveis membros desta banca.

Meus sinceros e profundos agradecimentos a todos.

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

Referências: Elsevier – (Vancouver – author date)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ANEXO

RESUMO

SUMMARY

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Neuraminidase 1	4
1.2 Degeneração e atrofia do tecido muscular na deficiência de Neu1	10
1.3 Autofagia	12
2- OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3- MÉTODOS	22
3.1 Animais de Estudo	22
3.2 Genotipagem	22
3.3 Grupos Experimentais	24
3.4 Histologia Geral	26
3.5 Coloração	26
3.6 Imunofluorescência	27
3.7 Análise Ultra-estrutural	29
3.8 Cultura primária de fibroblastos	30
3.9 Extração de proteínas para experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	31
3.10 Eletroforese SDS-PAGE (<i>Western Blottin</i>)	32
3.11 Análise estatística	34
4- RESULTADOS	35
4.1 Histologia	35
4.2 Análise Ultra-Estrutural	39
4.3 Imunofluorescência e <i>Western Blotting in vivo</i>	41
4.4 Expressão de LC3 em fibroblasto	46
5-DISCUSSÃO	47
6- CONCLUSÃO	51

LISTA DE ABREVIATURA

CC	Colchicina
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EBSS	Do inglês, <i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
FBS	Do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>
GA	Gastrocnêmio
HE	Hematoxilina e Eosina
KDa	KiloDawntons
KO	Do inglês, <i>knock-out</i>
Lamp-1	Do inglês, <i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
Lamp-2	Do inglês, <i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>
LC3-I	Forma citosólica da proteína-1 de cadeia leve-3
LC3-II	Forma citosólica da proteína-2 de cadeia leve-3
LIM 45	Laboratório de Investigação Médica 45
ME	Microscopia Eletrônica
MEC	Matriz Extra Celular
Mg/kg/dia	Miligramas por kilo ao dia
Mg/ml	Miligramas por miliLitro
MMPs	Metaloproteinases
mTOR	Do inglês, <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
N	Número
Neu1	Neuraminidase 1
Neu2	Neuraminidase 2
Neu3	Neuraminidase 3
Neu4	Neuraminidase 4
<i>Neu1</i> ^{-/-}	Animais nocaute de neuraminidase
<i>Neu1</i> ^{+/+}	Animais normais
PPCA	Do inglês, <i>serine carboxypeptidase protectiveprotein/cathepsin A</i>
TA	Tibial Anterior
WT	Do inglês, <i>Wild Type</i>
β-gal	β-galactosidase
p62	Do inglês <i>protein complex Nucleoporin p62</i>
<i>In vivo</i>	Do latim “em vivo”
<i>Ex vivo</i>	Do latim “fora dos vivos”
b-gal	b-galactosidase
FVB (mouse)	Do inglês camundongos “Friend leukemia virus B”
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
PDGF-R	Do inglês <i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
IGF-R	Do inglês <i>Insulin-like growth factor receptor</i>
AKT	Do inglês <i>Protein kinase B</i>
AMBRA1	Do inglês <i>Autophagy And Beclin 1 Regulator 1</i>

ATG	Do inglês <i>autophagy-related genes and proteins</i>
TFEB	Do inglês <i>Transcription factor EB</i>
ATP	Do inglês <i>Adenosine triphosphate</i>
AMPK	Do inglês <i>adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase</i>
TSC	Do inglês <i>tuberous sclerosis complex</i>
MTORC1	Do inglês <i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
AMP	Do inglês <i>Adenosine monophosphate</i>
PRKA	Do inglês <i>putative serine protein kinase</i>
UNC51	Do inglês <i>Serine/threonine-protein kinase UNC51</i>
RB1CC1	Do inglês <i>RB1-inducible coiled-coil protein 1</i>
FIP200	Do inglês <i>focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD</i>
ULK 1\2	Do inglês <i>two similar isoforms autophagy activating kinase</i>
RE	Retículo Endoplasmático
PI3K	Do inglês <i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
BECLIN 1	Do inglês <i>Beclin 1 protein</i>
BECLIN 2	Do inglês <i>Beclin 2 protein</i>
PI50 (VPS 15)	Do inglês <i>Serine/threonine-protein kinase VPS15</i>
VPS34	Do inglês <i>PI3KC3-C1 catalytic subunit VPS34</i>
UVRAG (VPS 38)	Do inglês <i>UV resistance-associated gene</i>
PI3P	Do inglês <i>Phosphatidylinositol-3-phosphate</i>
FYVE (DFCP1)	Do inglês <i>FYVE-domain-containing protein</i>
WIPI	Do inglês <i>WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides</i>
ATG16L2	Do inglês <i>autophagy related 16-like 2</i>
PE	Do inglês <i>Phosphatidylethanolamines</i>
PG2	Do inglês <i>polygalacturonase isozyme 2</i>
RAB 7	Do inglês <i>GTP-binding protein 7</i>
RAB 5	Do inglês <i>GTP-binding protein 5</i>
PCR	Do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>
PCR Multiplex	Do inglês <i>Multiple Polymerase Chain Reaction</i>
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
TRIS	Do inglês <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
NACL	Do inglês <i>Sodium chloride</i>
PH	Potencial Hidrogeniônico
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
SDS	Do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
PK	Do inglês <i>Proteinase K</i>
H ₂ O _{QA}	Água ultra pura
rpm	Do inglês <i>rotations per minute</i>
TE	Do inglês <i>Tris-EDTA</i>
Lac2	Do inglês <i>galactosidase gene</i>
pb	Pares de base
°C	Graus Celsius
ng	nanogramas

Kg	Kilogramas
mL	Mililitros
PEG 400	Do inglês <i>polyethylene glycol 400</i>
TWEEN 20	Do inglês <i>Polyethylene glycol sorbitan monolaurate</i>
hs	horas
GA	Gastrocnêmio Anterior
TA	Tibial Anterior
Triton-X 100	Do inglês <i>t-Octylphenoxypolyethoxyethanol</i>
PBS	Do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
um	Micromêtros
BSA	Do inglês <i>Bovine serum albumin</i>
FITC	Do inglês <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
DAP	Do inglês <i>Diamidophosphate</i>
mm	milimêtros
M	Molar
P/S	Do inglês <i>Penicillin/Streptomycin Solution</i>
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
D20	DMEM acrescido de 10
D10	DMEM acrescido de 20
EBSS	Do inglês <i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
RIPA	Do inglês <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
EGTA	Do inglês <i>egtazic acid</i>
ng	nanogramas
TBS-T	Do inglês <i>mixture of tris-buffered saline (TBS)</i>
ECL	Do inglês <i>enhanced chemiluminescence</i>
HRP	Do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
PVAF	Do inglês <i>Prion-Virology Animal Facility</i>
TRIS-HCL	Do inglês <i>Tris hydrochloride</i>
TERGITOL NP40	Do inglês <i>nonyl phenoxypolyethoxylethano</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modo de inserção de cassete para obtenção de camundongos nocaute para Neu1.	7
Figura 2: Camundongos utilizados no estudo.	8
Figura 3: Possíveis mecanismos moleculares envolvidos na degeneração muscular observada na musculatura esquelética de camundongos com deficiência de Neu1.	12
Figura 4: Modelo esquemático representativo da via autofágica em mamíferos.	20
Figura 5: Representação dos resultados da genotipagem de um camundongo heterozigoto (<i>Neu1</i> ^{+/-}), um nocaute (<i>Neu1</i> ^{-/-}) e um normal (<i>Neu1</i> ^{+/+}) para o gene Neu1.	24
Figura 6: Histologia H&E.	37
Figura 7: Histologia Fosfatase Ácida.	38
Figura 8: Análise ultra-estrutural.	40
Figura 9: Marcação de LC3 por imunofluorescência indireta.	42
Figura 10: Expressão de LAMP-1/P62/SQSTM1/LC3-I/II através de <i>Western Blotting</i> .	44
Figura 11: Expressão de LC3 em fibroblasto em cultura.	45
Figura 12: Análise da expressão de Lamp-1, P61/SQSTM1 e LC3 através de <i>Western Blotting</i> .	46

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na genotipagem dos animais do estudo.	24
Tabela 2: Tabela de anticorpos utilizados no estudo	28

ANEXO

Anexo 1: Parecer do comitê de ética no uso de animais (CEUA)

49

RESUMO

Larina Neto R. *Estudo do envolvimento da neuraminidase 1 no processo de autofagia na musculatura esquelética* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A neuraminidase 1 (chamada a seguir por Neu1) regula o catabolismo de sialoglicoconjugados nos lisossomos. A deficiência congênita da Neu1 é a base da sialidose, doença neurossomática grave associada a deformidades osteoesqueléticas, hipotonia e fraqueza muscular. Camundongos com deficiência de Neu1 desenvolvem uma forma atípica de degeneração muscular caracterizada por proliferação anormal de fibroblastos levando a invasão nas fibras musculares, expansão da matriz extracelular (MEC), fragmentação do citoplasma, formação vacuolar e atrofia muscular. A ocorrência de atrofia muscular indica que a deficiência da Neu1 pode estar relacionada com o controle da massa muscular, a qual é dependente do equilíbrio entre síntese e degradação proteica. Uma característica principal na Macroautofagia (denominada a seguir por autofagia) é a principal via de degradação intracelular sendo expressamente essencial para a homeostase celular e remoção de materiais citoplasmáticos. **Objetivos:** Avaliar se os efeitos da deficiência da Neuraminidase 1 afetam a indução de autofagia e a formação de autofagossomos e determinar os efeitos do bloqueio da função lisossomal sobre o fenótipo muscular na deficiência da Neuraminidase 1. **Metodologia:** Camundongos *Neu1*^{+/-} foram cruzados e os filhotes genotipados, onde camundongos *Neu1*^{-/-} (nocaute) e *Neu1*^{+/+} (normal), foram utilizados no estudo n total=90, sendo 10 em padronizações, 20 para coleta de fibroblastos e 60 para procedimentos *in vivo*, os grupos experimentais foram divididos em privação alimentar por 2 dias que, por meio da inibição do mTOR, induz a autofagia; grupo de tratamento com Colchicina por 4 dias onde irá impedir a junção autofagossomo/lisossomo não havendo a degradação lisossomal e adicionado nos dois últimos dias de privação alimentar e o grupo de tratamento com Rapamicina por 7 dias, droga com função de inibir seletivamente o mTOR. Após os tratamentos, os animais foram eutanasiados para coleta dos músculos gastrocnêmios e tibiais anterior. Os músculos foram analisados após as colorações histológicas por Hematoxilina & Eosina e Fosfatase Ácida; Imunofluorescência de LC3-I/II; *Western Blotting* das proteínas LC3-I/II, Lamp-1 e p62/SQSTM e a análise Ultra-estrutural. Além disso, foi realizada cultura de fibroblastos, os quais foram submetidos à privação de nutrientes e ao tratamento com Rapamicina, seguidos das mesmas metodologias de análise *in vivo*. **Resultados:** As análises histológicas

através de H&E e Fosfatase Ácida não revelaram alterações consistentes na musculatura esquelética de animais submetidos aos tratamentos, mostrando em animais com deficiência de Neu1 um aumento anormal do espaço endomisial, e aumento da atividade lisossomal intracitoplasmáticos. Na análise ultra-estrutural observou-se em todos os grupos, a presença de diversas estruturas com aspecto autofágico, de diferentes tamanhos, formas e constituintes. Na análise da expressão do LC3 através de *Western Blotting* mostrou importante ativação do LC3-II na privação alimentar (com e sem administração de Colchicina) tanto em animais controles quanto em animais com deficiência de Neu1 e uma importante ativação do LC3-I em Rapamicina em ambos os grupos mostrando assim que houve um aumento da via da autofagia através do bloqueio do mTOR. Já na análise de Imunofluorescência não foi possível observar diferença consistente entre os grupos. A análise *in vitro* de *Western Blotting* mostrou que tal ativação foi similar entre fibroblastos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}. **Conclusão:** Os experimentos relacionados com a ativação ou inibição da autofagia, não resultaram em diferenças consideráveis entre músculos normais e músculos com deficiência de Neu1. Desta forma, podemos concluir com estes experimentos que aparentemente a Neu1, apesar de ser uma importante enzima lisossomal, não interfere com o processo de autofagia.

Descritores: neuraminidase; sialidase; mucopolídeos; autofagia; privação de alimentos; colchicina; sirolimo; atrofia muscular; exocitose lisossomal.

SUMMARY

Larina Neto R. Neuraminidase 1 involvement in the autophagy process in the skeletal muscles [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Neuraminidase 1 (hereinafter Neu1) regulates the catabolism of sialoglycoconjugates in lysosomes. The congenital deficiency of Neu1 is the basis of sialidosis, a severe neurosomatic disease associated with osteo-skeletal deformities, hypotonia, and muscle weakness. Mice with Neu1 deficient develop an atypical form of muscle degeneration characterized by abnormal fibroblast proliferation leading to muscle fiber invasion, extracellular matrix expansion (ECM), cytoplasm fragmentation, vacuolar formation, and muscle atrophy. The occurrence of muscle atrophy indicates that deficiency of Neu1 may be related to the control of muscle mass, which is dependent on the balance between synthesis and protein degradation. A major feature in Macroautophagy (hereinafter referred to as autophagy) is the main pathway of intracellular degradation being expressly essential for cellular homeostasis and removal of cytoplasmic materials. **Objectives:** To evaluate whether the effects of neuraminidase 1 deficiency affect autophagy induction and autophagosome formation and to determine the effects of lysosomal function block on muscle phenotype in neuraminidase 1 deficiency. **Methodos:** Mice Neu1^{+/-} were crossbred and the genotyped pups, where mice Neu1^{-/-} (knockout) and Neu1^{+/+} (normal), were used in the study n total = 90, 10 for standardization, 20 for fibroblast collection and 60 for in vivo procedures, experimental groups were divided into food deprivation for 2 days that, through mTOR inhibition, induces autophagy; Colchicine treatment group for 4 days where it will prevent autophagosome/lysosome junction without lysosomal degradation and added in the last two days of food deprivation and Rapamycin treatment group for 7 days, drug with function to selectively inhibit mTOR. After the treatments, the animals were euthanized to collect the anterior gastrocnemius and tibial muscles. The muscles were analyzed after histological staining by Hematoxylin & Eosin and Acid Phosphatase; LC3-I/II immunofluorescence; *Western Blotting* of LC3-I/II, Lamp-1 and p62/SQSTM proteins and Ultra-structural analysis. In addition, fibroblasts were cultured and subjected to nutrient deprivation and Rapamycin treatment, followed by the same in vivo analysis methodologies. **Results:** Histological analyzes by H&E and Acid Phosphatase did not reveal consistent changes in skeletal muscle of animals submitted to treatments, showing in animals with Neu1 deficiency an abnormal increase in endomysial space and increased intracytoplasmic lysosomal activity. In

ultrastructural analysis, it was observed in all groups, the presence of several structures with autophagic aspect, of different sizes, shapes and constituents. The analysis of LC3 expression by *Western Blotting* showed important activation of LC3-II in food deprivation (with and without Colchicine administration) in both control and Neu1 deficient animals and an important activation of LC3-I in Rapamycin in both groups, thus showing an increase in the autophagy pathway through mTOR blockade. In the immunofluorescence analysis, it was not possible to observe consistent difference between the groups. In vitro *Western Blotting* analysis showed that such activation was similar between Neu1^{+/+} and Neu1^{-/-} fibroblasts. **Conclusion:** Experiments related to activation or inhibition of autophagy did not result in considerable differences between normal muscles and Neu1 deficient muscles. Thus, we can conclude from these experiments that apparently Neu1, despite being an important lysosomal enzyme, does not interfere with the autophagy process.

Descriptors: neuraminidase; sialidosis; mucolipidases; autophagy; food deprivation; Colchicine; sirolimus; muscular atrophy; lysosomal exocytosis.

1. Introdução

A Neuraminidase1 ou N-acetil- α -neuraminidase é uma enzima importante para a regulação de diversos processos biológicos (Klionsky et al., 2016; Neves et al., 2015). Mutações no gene *Neu1* são a causa da sialidose, doença neurossomática grave de depósito lisossomal, com herança autossômica recessiva. A sialidose compreende diversas manifestações sistêmicas, e é classificada como sialidose do tipo 1 (mais branda e tardia) e sialidose do tipo 2 (mais severa e precoce) (Sittampalam et al., 2004; Winter et al., 1980; Thomas, 2001; Lowden e O'Brien, 1979).

No ano de 2002, pesquisadores do *Department of Genetics and Tumor Cell Biology do St. Jude Children's Research Hospital* (Memphis, EUA) chefiados por Profa. Dra. Alessandra d'Azzo produziram uma linhagem de camundongos com o gene *Neu1* nocauteado (*Neu1*^{-/-}) que apresenta fenótipo intermediário ao de pacientes com sialidose dos tipos 1 e 2 (de Geest et al., 2002).

Como há sintomatologia de envolvimento muscular em um subgrupo de pacientes com sialidose, e a deficiência de várias proteínas lisossomais acarreta afecções musculares, surgiu a ideia de avaliar a musculatura desses camundongos. Essa pesquisa, publicada por (Zanoteli et al., 2010), indicou que a musculatura esquelética dos camundongos *Neu1*^{-/-} apresentava profundas alterações dos componentes da matriz extracelular (MEC), caracterizadas por aumento das regiões endomisiais e perimisiais, e invasão das fibras musculares por fibroblastos altamente proliferativos, ao lado de importante atrofia muscular. As alterações histológicas descritas nunca haviam sido relatadas previamente em outras formas de doenças musculares, sugerindo tratar-se de alterações características da deficiência primária de Neu1 (Zanoteli et al., 2010)

Considerando que a deficiência de Neu1 acarreta em significativa atrofia muscular, seria interessante avaliar o papel regulatório da Neu1, *in vitro* e *in vivo*, na formação de autofagossomos através da utilização de medicamentos ativadores e inibidores da autofagia, desta forma analisando se seu papel na função lisossomal tem relação com a via autofágica. Sabe-se que o sistema lisossomal e autofagia estão ativados durante o processo de atrofia muscular (Mizushima et al., 2004).

Em um estudo prévio realizado por Zanoteli et al., 2010 mostrou que a Neu1 é uma importante enzima lisossomal que controla a quantidade de ácido siálico de diversas glicoproteínas. Várias de suas funções já estão bem definidas, no entanto, não se conhecia sua relação com a autofagia.

Por outro lado, em outro estudo do nosso grupo, Rizzato, 2014 foi descrito que na desnervação, método usado para induzir a autofagia, no músculo gastrocnêmio direito de animais Neu1 deficientes e controle, não foi capaz de induzir formação de autofagossomos nem mesmo em animais normais, não sendo possível concluir se a deficiência de Neu1 afetaria a formação de autofagossomos. Desta forma, neste estudo utilizamos outras metodologias para verificar se a deficiência da Neu1 poderia afetar a ativação de autofagia e a formação de autofagossomos.

Sendo que neste trabalho optamos por outra metodologia no sentido de testar a hipótese de que a deficiência da Neu1 poderia afetar a ativação de autofagia e a formação de autofagossomos, experimentalmente induzimos a autofagia através da privação de nutrientes, e da Rapamicina; outra hipótese testada foi a de que os efeitos deletérios da deficiência de Neu1 poderiam ser aliviados ou exacerbados ao bloquearmos a função lisossomal com a Colchicina em associação com privação de nutrientes. Estas técnicas foram aplicadas em animais *in vivo* (camundongos normais e com deficiência de Neu1), e para o experimento *in vitro* (fibroblastos em

cultura) foi usada a droga Rapamicina e privação de nutrientes (meio de cultura EBSS).

A Rapamicina é um potenciador de autofagia amplamente utilizado, que induz a autofagia por meio da inibição do alvo de Rapamicina em mamíferos (mTOR). (Guo et al., 2013; Zhang et al., 2011). O mecanismo de ação da Rapamicina envolve a inibição seletiva da atividade de mTORC1 que atua por associação com a proteína intracelular FKBP12, estes se ligam ao domínio de ligação de FKBP12-rapamicina (FRB) de TOR, formando um complexo trimolecular com mTOR e FKBP12, que desestabiliza ou limita o acesso ao seu sítio ativo de quinase de mTORC1 (Dodds et al., 2016; Fan et al., 2015; Saliba).

O mecanismo de autofagia por privação de nutrientes leva a uma diminuição da síntese de ATP através da glicólise, a carga energética diminui junto ao acúmulo de AMP, assim ativando a proteína quinase (PRKA, mais conhecida como proteína quinase ativada por 5' AMP, AMPK) estimulando a autofagia (Hardie et al., 2012).

A Colchicina foi utilizada para inibir a polarização dos microtúbulos e, assim, bloquear a fusão autofagossomo/lisossomo e a degradação do conteúdo autofagossômico, incluindo a LC3-II (Ching et al., 2013; Lin et al., 2015).

A ativação da autofagia foi avaliada por meio da análise histológica e através da expressão por *Western Blotting* com marcação de LC3-I/II, Lamp1 e P62/SQTM1, e análise ultra-estrutural para verificar a formação de autofagossomos.

1.1 Neuraminidase 1

A neuraminidase 1 é uma sialidase lisossomal que representa uma família de exoglicosidases. Sendo uma enzima essencial necessária para iniciar a degradação de sialoglicoconjugados, nos lisossomos onde clivam e controlam a remoção de ácido siálico em nível proteico e celular, em cooperação com as sialiltransferases (Maurice et al., 2016; Miyagi and Yamaguchi, 2012; Monti et al., 2010; Neves et al., 2015).

Ácidos siálicos são substâncias encontradas nas porções terminais da extremidade não redutora de uma grande variedade de grupos carboidratos de glicolipídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, oligossacarídeos sialilados e gangliosídeos, moléculas com importantes processos biológicos, tais como mudanças conformacionais, reconhecimento e marcação de sítios biológicos (Maurice et al., 2016; Miyagi and Yamaguchi, 2012; Monti et al., 2010; Neves et al., 2015).

Assim o processo de catabolismo destes sialoglicoconjugados, principalmente nos oligossacarídeos e glicoproteínas são extremamente importantes, onde serão expostos principalmente na superfície celular ou são secretados na matriz extracelular (MEC) (Maurice et al., 2016; Miyagi and Yamaguchi, 2012; Monti et al., 2010; Neves et al., 2015).

A sialidase atualmente tem levado pesquisadores a estudá-la exaustivamente devido a sua grande função em vírus e bactérias. Microorganismos que a expressam podem clivar os receptores de membrana contendo ácido siálico, e assim podem tanto entrar nas células do hospedeiro para mobilizar nutrientes, como podem utilizar da capacidade de sair desta célula para infectar outras células facilmente (Khan et al., 2018).

Em células animais, foram identificados quatro tipos geneticamente distintos de sialidases, cada uma apresentando expressão tecidual, especificidade de substrato e localização intracelular diferente. (Maurice et al., 2016)

Sendo eles a neuraminidase 1 que é encontrada nos lisossomos (Neu1), sendo o foco do nosso estudo, confeccionada no cromossomo 6 um locus do complexo principal de histocompatibilidade (6p21.3), a neuraminidase 2 encontrada livre no citoplasma, a neuraminidase 3 presente nos microdomínios de cavéola de membrana plasmática e a neuraminidase 4 existente nas mitocôndrias sendo processado de duas formas diferentes, resultando desta forma no aparecimento de duas isoformas (Miyagi and Yamaguchi, 2012; Monti et al., 2010).

A recém-sintetizada Neu1 é transportada para os lisossomos e adquire conformação ativa e estável através de sua interação com a proteína protetora auxiliar PPCA (*serina carboxypeptidase protective protein/cathepsin A*). Este evento leva a uma associação muito importante para sua proteção, a qual impede a oligomerização prematura, necessária para o endereçamento adequado ao lisossomo, e, para que seja corretamente compartimentalizada, mantendo conformação cataliticamente ativa e da sua proteólise nos lisossomos. Forma-se então um complexo proteico de alto peso molecular, da Neu1 ligada a PPCA e β -galactosidase (β -gal) (Bonten et al., 1996; Khan et al., 2018; Monti et al., 2010; Neves et al., 2015).

A alteração da expressão destas enzimas pode levar a três distúrbios de armazenamento lisossomal (LSDs) distintos. A deficiência da β -galactosidase induz a GM1-gangliosidose (GM1) ou deficiência de β -GAL, Já a deficiência da Neu1 pode estar associada a duas doenças de depósito lisossomal geneticamente distintas, a sialidose, causada por mutação diretamente no cromossomo 6p21.3 do gene da *Neu1*, e a deficiência de

PPCA, levando a uma deficiência secundária combinada de Neu1 e β -GAL devido a instabilidade do complexo proteico formado por Neu1/PPCA/ β -GAL. (Khan et al., 2018; Maurice et al., 2016)

A característica bioquímica principal de ambos destes distúrbios é o armazenamento lisossomal. Em pacientes com sialidose em um aspecto bioquímico, dependendo dos níveis de atividade enzimática residual, devido aos distúrbios de armazenamento lisossomal, levam ao acúmulo progressivo de glicopeptídeos, gangliosídeos, glicoproteínas e oligossacarídeos sialilados em vários tipos de células, desenvolvendo um amplo espectro de manifestações clínicas, variando de acordo com a época do início, gravidade dos sinais e sintomas da Neu1. (Bonten et al., 2000; Fanzani et al., 2012; Maurice et al., 2016)

A sialidose do tipo 1 é a forma mais branda da doença. Os pacientes geralmente exibem sintomas na segunda ou terceira década de vida. Dentre os sintomas estão anormalidades da marcha, perda progressiva da visão associada à degeneração macular (*cherry-red spots*), nistagmo, ataxia e a síndrome mioclônica, que é uma característica essencial da sialidose I, onde com o tempo tende a tornar incapacitante o paciente, no entanto, a hipotonia pode ser vista desde o começo, porém sem alterações dismórficas significativas. Seu nível de inteligência pode variar de normal a pouco comprometido (Khan et al., 2018; Thomas, 2001).

Já a sialidose tipo 2 é a forma grave da doença, com base na idade de início dos sintomas, é subdividida em três subtipos sendo eles a forma mais precoce a congênita, que se manifesta no útero com sintomas como hidropisia fetal, ascite, edema facial e visceromegalia, levando ao óbito precoce. A forma infantil se manifesta dentre 0 a 12 meses de vida, com sintomas característicos, como, clara dismorfia facial, visceromegalia, retardo mental, tronco curto levando a baixa estatura, o ponto vermelho-

cereja na retina e a mioclônia ocorrem mais tardiamente e eventualmente podem ter atrofia e hipotonia muscular e deformidades ósseas. E a forma juvenil se manifestando dentre 2 e 20 anos, com sintomas de envolvimento muscular, incluindo hipotonia, atrofia, deformidades osteoesqueléticas, ponto vermelho-cereja na retina e face pouco dismórfica (Bonten et al., 2000; Khan et al., 2018).

Os modelos animais experimentais para este estudo da sialidose são os camundongos *Neu1*^{-/-}, que possuem o gene *Neu1* nocauteado por meio da inserção de um cassete β-geo (*lacZ-PGK-neo^R*) no éxon 1 (figura 1). Como resultado, uma forma truncada não funcional de Neu1 é traduzida (de Geest et al., 2002).

Figura 1. Modo de inserção de cassete para obtenção de camundongos nocaute para Neu1. A estrutura do gene *Neu1*, a construção de segmentação e a estrutura prevista do locus *Neu1* interrompido após recombinação homóloga são representadas esquematicamente (modificado de Geest et al., 2002).

O modelo experimental de camundongos *Neu1*^{-/-} apresentam anormalidades fenotípicas intermediárias entre a sialidose tipo I e II, com característica presença de hiperqueratose ocular, menor massa corporal e muscular, resumindo precisamente as alterações bioquímicas e morfológicas da sialidose humana, com degeneração muscular anormal causado pelo aumento do tecido conjuntivo com consequências como

infiltração na fibra muscular, levando a degeneração progressiva e atrofia das fibras. (de Geest et al., 2002; Neves et al., 2015; Zanoteli et al., 2010)

Os animais deficientes de Neu1 possuem a estrutura menor que seus controles normais *Neu1*^{+/+} desde o período perinatal. No primeiro mês de vida já excretam oligossacarídeos sialilados, quando também surgem os primeiros sinais da doença, como o edema subcutâneo. Em estágios mais avançados, os animais estão debilitados apresentando tremores e dificuldade na locomoção. Com idade dentre 6 a 9 meses a musculatura se encontra intensamente comprometida e devido a hiperqueratose causada no aparelho digestivo, apresentam anorexia e acabam morrendo. (de Geest et al., 2002; Neves et al., 2015)

Figura 2: Camundongos utilizados no estudo. À esquerda apresenta-se o fenótipo correspondente a camundongos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} com 60 dias de idade, nota-se que os animais nocautes são menores e apresentam hiperqueratose ao redor dos olhos. À direita expõe-se a diferença entre o tamanho dos músculos gastrocnêmio.

Os mecanismos pelos quais a deficiência da Neu1 acarreta comprometimento de vários tecidos têm sido investigados há vários anos e ainda não estão totalmente esclarecidos. Diversas análises *in vitro* e *in vivo* nos fizeram compreender que a Neu1 atua em processos biológicos

fundamentais que vão além de sua função degradativa definida; estes incluem resposta imune, inflamação, proliferação celular, migração e metástase de células tumorais e que na sua inibição leva principalmente a alterações histológicas incluindo vacuolização do citoplasma de vários tipos celulares, tais como fibroblastos, linfócitos, células de Kupffer, hepatócitos, células renais, neurônios, músculo cardíaco e esquelético, tanto em pacientes com sialidose quanto em camundongos *Neu1*^{-/-} (Lowden e O'Brien, 1979; de Geest et al., 2002; Neves et al., 2015).

Um papel primário da Neu1 é sua participação na regulação negativa da exocitose lisossomal. Mecanismo regulado pelo influxo de cálcio, presente em praticamente todos os tipos de células, onde implica o recrutamento de lisossomos selecionados para a rede do citoesqueleto, possibilitando a fusão de lisossomos especializados na membrana plasmática e a liberação de seu conteúdo para o meio extracelular (Fanzani et al., 2012; Hinek et al., 2008; Khan et al., 2018; Kima et al., 2000; Yogalingam et al., 2008).

Desta forma a Neu1 determina o número de lisossomos que atracam na membrana plasmática, processando os ácidos siálicos por meio de sua participação no processamento da proteína de membrana 1 associada ao lisossomo (LAMP-1), sendo LAMP-1 um constituinte estrutural importante dos lisossomos, localizado abundantemente na membrana limitante da organela, com um papel útil na ancoragem dos lisossomos na membrana plasmática (Fanzani et al., 2012; Hinek et al., 2008; Khan et al., 2018; Kima et al., 2000; Yogalingam et al., 2008).

Nas células e tecidos deficientes de Neu1, a clivagem defeituosa dos ácidos siálico leva a organela a um estado super-sialilado com uma meia-vida prolongada, este excesso de sinalização, leva a um aumento da exocitose dos conteúdos lisossômicos na matriz extracelular, com

consequências na integridade da matriz extracelular, como a sua expansão anormal do tecido conjuntivo, que está associada ao aumento da síntese e deposição de colágeno e de outros componentes, devido à hiperproliferação de fibroblastos que irão infiltrar nas fibras musculares adjacentes, que gradualmente se tornam fragmentadas, vacuoladas e, finalmente, degeneradas, levando à atrofia progressiva (Fanzani et al., 2012; Hinek et al., 2008; Khan et al., 2018; Kima et al., 2000; Yogalingam et al., 2008).

Havendo assim uma relação entre a gravidade da doença, os níveis de Lamp-1 na superfície celular e de exocitose lisossomal. Portanto, a indução anormal de exocitose lisossomal poderia estar diretamente implicada na patogênese das manifestações sistêmicas características da doença (Fanzani et al., 2012; Hinek et al., 2008; Khan et al., 2018; Kima et al., 2000; Yogalingam et al., 2008).

1.2 Degeneração e atrofia do tecido muscular na deficiência de Neu1

Ao contrário dos músculos distróficos, comumente caracterizados por lesão sarcolêmica, intensa resposta inflamatória, necrose celular e ciclos repetidos de regeneração muscular, a patologia muscular dos camundongos *Neu1*^{-/-} na musculatura esquelética, tem alterações importantes como aumento no espaço perimisial e endomisial devido a proliferação aumentada no tecido conjuntivo com consequências como infiltração por fibroblastos na fibra muscular, levando a uma forma atípica degeneração progressiva, fragmentação do citoplasma, formação vacuolar e atrofia das fibras (Yogalingam et al. 2008; Zanoteli et al., 2010; Neves et al., 2015).

Desta forma dois mecanismos podem estar envolvidos neste processo de degeneração progressiva e atrofia. O aumento da expressão e da atividade da catepsina B e das MMPs 2 e 9, condizendo com observações de Yogalingam et al. (2008) e Zanoteli et al. (2010). Estas alterações observadas incluem um excessivo acúmulo de colágeno e proliferação de fibroblastos, levando à expansão do espaço epimisial e perimisial, associados à presença de intensa atividade gelatinolítica na matriz extracelular.

Estas alterações em células e tecidos deficientes de Neu1 são derivadas de uma excessiva exocitose lisossomal na matriz extracelular, produzindo uma super-sialilação dos glicoconjugados, que leva ao aumento da secreção de catepsinas lisossômicas proteolíticas resultando em atrofia muscular (Yogalingam et al. 2008; Zanoteli et al., 2010; Neves et al., 2015).

Além disto, com a super-sialilação, é observado um aumento da atividade de receptores PDGF e IGF que estão relacionados com vias de proliferação celular, desta forma, leva-se a um aumento na proliferação de fibroblastos. A presença de grande número de fibroblastos metabolicamente ativos na MEC ocasiona um excessivo aumento na síntese e acúmulo de colágeno no epimísio e no endomísio levando a uma fibrose. Consequentemente, havendo um aumento da expressão de metaloproteinases 2 e 9 (MMPs), que tem a função de degradar colágeno (Costa Pereira et al., 2006) (Figura 3), as fibras musculares perifasciculares desenvolvem uma forma atípica de degeneração, ocorrendo, fragmentação do citoplasma, formação vacuolar e invasão por fibroblastos (Zanoteli et al., 2010). No entanto, até o presente momento não foi possível determinar se essas alterações também ocorrem em pacientes com sialidose, pois não há descrições de biópsia muscular nesses casos.

Figura 3. Possíveis mecanismos moleculares envolvidos na degeneração muscular observada na musculatura esquelética de camundongos com deficiência de Neu1. Na imagem acima foi esquematizado a possível via que leva a atrofia e degeneração das fibras musculares nos animais deficientes da Neu1. As imagens A, B e C mostram diferentes estágios da invasão das fibras musculares por constituintes da matriz extracelular com subsequente desintegração citoplasmática (azul de toluidina, 60x). MEC, matriz extracelular; MMPs, metaloproteinases (Zanoteli, 2013).

1.3 Autofagia

A autofagia é a principal via de degradação intracelular essencial para a homeostase celular e energética, sendo um processo auto-

degradativo e citoprotetor conservado filogeneticamente, por células e tecidos eucarióticos (Au et al., 2010; Barth et al., 2010; Bujak et al., 2015; Galluzzi et al., 2014; Gao et al., 2016; Johansen and Lamark, 2011; Ju et al., 2010; Lin et al., 2015; Masiero et al., 2009; Mizushima et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Ocorre em nível basal como um “controle de qualidade” utilizado como mecanismo de defesa ou uma via de reciclagem evolutivamente conservada, podendo ser induzida por muitos sinais celulares, tais como a inflamação, o stress oxidativo, o stress do retículo endoplasmático, a ausência de insulina, deficiências nutricionais, hipóxia e indiretamente na ativação dos fatores de crescimento (Au et al., 2010; Barth et al., 2010; Bujak et al., 2015; Galluzzi et al., 2014; Gao et al., 2016; Johansen and Lamark, 2011; Ju et al., 2010; Lin et al., 2015; Masiero et al., 2009; Mizushima et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Desempenhando um papel crítico na remoção de materiais citoplasmáticos como proteína dobrada, agregada ou de vida longa, reciclagem de organelas danificadas ou não desejadas ou até envelhecidas, agregados proteicos tóxicos e patógenos intracelulares aos lisossomos (Au et al., 2010; Barth et al., 2010; Bujak et al., 2015; Galluzzi et al., 2014; Gao et al., 2016; Johansen and Lamark, 2011; Ju et al., 2010; Lin et al., 2015; Masiero et al., 2009; Mizushima et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Esta via também está envolvida na manutenção da homeostase da energia durante a privação alimentar, reciclagem de componentes citosólicos para compensar a privação de nutrientes, mantendo a homeostase celular por reciclagem e reutilização, desempenhando um papel vital na sobrevivência celular (Au et al., 2010; Barth et al., 2010; Bujak et al., 2015; Galluzzi et al., 2014; Gao et al., 2016; Johansen and Lamark, 2011; Ju et al., 2010; Lin et al., 2015; Masiero et al., 2009; Mizushima et

al., 2004; Zhang et al., 2011).

A massa muscular esquelética é um importante local de atividade metabólica, sendo o maior reservatório de proteínas, regulado pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação proteica, equilibrando fontes de energia em momentos críticos no desenvolvimento e/ou em resposta ao estresse nutricional, e levando a atrofia muscular quando a homeostase é interrompida. Exercendo assim um papel fundamental como fonte de aminoácidos, que serão utilizados na produção de energia por vários órgãos na carência energética, desta forma os aminoácidos gerados por meio da degradação da proteína são usados no fígado sintetizando glicose (Gao et al., 2016; Ju et al., 2010; Lin et al., 2015; Masiero et al., 2009).

O termo “fluxo de autofagia” utilizado para representar todo o processo autofágico dinâmico, que engloba a iniciação (formação de membranas crescentes denominadas fagósporo), alongamento e fechamento (aumento do tamanho do fagósporo e sua transformação em um autofagossomo completo contendo a carga sequestrada), e maturação (conversão de autofagossomos em organelas degradativas denominadas autolisossomos por meio da fusão com organelas de endossomo (formando anfissomo) e depois com lisossomos e sua subsequente digestão macromolecular e reciclagem das macromoléculas resultantes de volta ao citosol, o qual pode ser chamado de autofagia produtiva ou completa (Klionsky et al., 2016; Lin et al., 2015b; Mizushima and Komatsu, 2011; Zhang et al., 2013; Legakis & Klionsky 2006).

Este processo é regulado por vias dependentes de mTOR (alvo da Rapamicina em mamíferos) que tem uma predisposição a regular negativamente a autofagia. A proteína mTOR está presente em funções vitais celulares, como síntese proteica e crescimento celular, mediada por

fatores de crescimento via Akt (proteína cinase B) (Kim et al., 2011; Mizushima and Komatsu, 2011; Settembre et al., 2013).

A mTOR em seu estado ativado suprime a autofagia ao fosforilar o complexo formado por ULK1 (Kim et al., 2011), AMBRA1 e ATG14 (dois interadores estimuladores da autofagia de BECN1) (Nazio and Cecconi, 2013; Yuan et al., 2013) e o fator de transcrição EB (TFEB) (Mizushima and Komatsu, 2011; Settembre et al., 2013).

Quando o organismo encontra-se em privação prolongada de nutrientes, ou quando o ATP não é ativamente sintetizado através da glicólise levam a uma diminuição no estado de energia ou durante na fosforilação oxidativa ou até mesmo por sinais de estresse, fazendo com que a carga energética diminua paralelamente ao acúmulo de AMP, esta condição estimula a autofagia por meio da produção da proteína quinase ativada AMP (PRKA, mais conhecida como proteína quinase ativada por 5' AMP, AMPK) que por sua vez tem a capacidade de inibir mTORC1 indiretamente na fosforilação e ativação da proteína TSC1/2 (esclerose tuberosa 1/2) que sucessivamente controla a ativação do mTORC1. (Silva B., 2012; Hardie et al., 2012).

Na indução da autofagia, a biogênese do autofagossomo é controlada por um maquinário que opera de maneira bem coordenada e inclui um complexo multiproteico organizado em torno da quinase de ativação por autofagia tipo 1 unc-51 (ULK1), *Coiled-coil* 1 indutível por RB1 (RB1CC1, mais conhecida como FIP200), ATG13 e ATG101, que é regulado pelo sensor de energia celular como a proteína quinase ativada (AMPK) e o sensor de nutrientes, quando o alvo mecanicista do complexo 1 da Rapamicina 1 (mTORC1) é inibido, induzindo a autofagia, iniciando a etapa de nucleação e formação do autofagossomo através do complexo

ULK, que é ativado e translocado para um determinado domínio do retículo endoplasmático (RE) (Au et al., 2010; Silva B., 2012).

Uma vez no RE, o complexo ULK recruta o complexo PI3K de classe III (PI3KC) (Beclina-1 (Atg6), Atg14, p150 (VPS15), VPS34, autofagia/ beclina-1 regulador (AMBRA1), UVRAG (VPS38), Rubicon) para o RE (o recrutamento de Beclina-1 é necessário para a ativação deste complexo) (Galluzzi et al., 2014; Silva B., 2012). Que em condições de nutrientes permanece associada em um complexo com Beclina 2 associado ao RE, sendo liberado pós a fosforilação de Bcl-2 por JNK1 (Mizushima et al., 2004). Que sintetiza o fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) que recruta moléculas efetoras como proteína 1 contendo duplo FYVE (DFCP1) e domínio de repetição WD-interação a fosfoinosítídeo (WIPs), promovendo a formação do omegassoma no RE (Au et al., 2010).

As WIPs são cruciais para a maturação/desenvolvimento do omegassoma em fagósporos, assim como elas, as proteínas VMP1 (proteína de membrana de vacúolo 1) e Atg9 também estão presentes na membrana externa do fagósporo e parecem participar do estágio inicial de formação do autofagossomo. Começa então a etapa de alongamento e fechamento do fagósporo, que engloba a carga citoplasmática para formar vesículas de membranas duplas chamadas autofagossomos (Silva B., 2012).

A autofagia é um processo altamente regulado que requer dois sistemas de conjugação, semelhantes à ubiquitina que funciona no início da autofagia, a enzima semelhante à E1 da ubiquitina envolve numerosas proteínas Atg (proteínas associadas à autofagia abreviadas “Atg”), que atuam no alongamento dos fagósporos, na fosforilação de membranas pré-autofagossomais e na formação de complexos (Silva B., 2012; Kruppa et al., 2016).

O complexo Atg12 - Atg5 - Atg16L1 e o conjugado LC3 (Atg8 homólogo) desempenham papéis importantes no alongamento e fechamento da membrana de isolamento. O complexo Atg12-At5-Atg16L1 também é necessário para a formação da ligação covalente entre o LC3 e o PE (fosfatidiletanolamina) (Johansen and Lamark, 2011; Kabeya et al., 2000; Kruppa et al., 2016; Mizushima et al., 2004; Sarkar, 2013).

A primeira reação envolve a conjugação Atg5 - Atg12, na qual Atg7 (E1 semelhante à enzima ativadora da ubiquitina) ativa a proteína semelhante à ubiquitina Atg12, que é então transferida para Atg10 (enzima conjugada com E2-ubiquitina), e é basicamente ligada covalentemente para Atg5. O conjugado Atg12 - Atg5 forma um complexo oligomérico com Atg16L1 (Atg12 - Atg5 - Atg16L1), presente na membrana externa do fagósporo (Au et al., 2010; Silva B., 2012; Kruppa et al., 2016; Sarkar, 2013).

O segundo sistema envolve a conjugação de LC3 de proteína 1 associada a microtúbulos (cadeia leve 3) (homólogo da levedura Atg8) a PE (lipídio fosfatidiletanolamina). A pró-LC3 (cadeia leve 3 complexada com as proteínas associadas aos microtúbulos 1A e 1B) sofre clivagem C-terminal pós-translacional por meio da protease Atg4, resultando na forma LC3-I citosólica, que é então ativada por Atg7 (semelhante a E1) e assim sendo conjugada ao PE na enzima ATG3 (semelhante a E2) com o auxílio do complexo Atg12 - Atg5 - Atg16L1 (semelhante a E3) formando sua forma lipidada LC3-PE (LC3-II). Esta se transloca do citoplasma principalmente para as pontas das membranas interna e externa do fagósporo (Au et al., 2010; Silva B., 2012; Johansen and Lamark, 2011; Klionsky et al., 2016; Kruppa et al., 2016; Masiero et al., 2009; Sarkar, 2013).

O LC3-II é um marcador específico de autofagia, intermediando a fixação e hemifusão da membrana essencial para o alongamento e o fechamento de fagósporos para formar autofagossomos, onde permanece associado durante toda a sua vida útil. Os níveis de LC3-II correlacionam-se assim com o número de autofagossomos no estado estacionário. A LC3-II que reside na membrana interna autofagomática é degradada dentro dos autolisossomos, enquanto aqueles na superfície citoplasmática dos autolisossomos são delipidados por Atg4 e reciclados (Au et al., 2010; Silva B., 2012; Klionsky et al., 2016; Kruppa et al., 2016; Masiero et al., 2009; Sarkar, 2013).

Autofagossomos de dupla membrana recém-gerados se movem bidirecionalmente ao longo dos microtúbulos com um viés em direção ao centro de organização dos microtúbulos, onde os lisossomos são enriquecidos. No autofagossomo, o LC3-II tem demonstrado desempenhar um papel na seleção de carga para degradação, onde sua ligação com p62, também conhecido como SQSTM1 (sequestossomo 1), o qual serve como uma ligação entre LC3 e substratos ubiquitinados a serem degradados, é um substrato seletivo de autofagia que incorporar-se ao autofagossomo completo e que serão degradados em autolisossomos, servindo assim como um índice de degradação autofágica atuando como proteína adaptadora de ligação à ubiquitina, que medeia o recrutamento de cargas protéicas ubiquitinadas, via sua interação com LC3-II, na membrana interna do autofagossomo para a degradação autofágica seletiva (Klionsky et al., 2016; Kruppa et al., 2016; Lin et al., 2015b; Mizushima and Komatsu, 2011; Sarkar, 2013; Zhang et al., 2013).

Os autofagossomos se fundem primeiro com os endossomas tardios para formar organelas híbridas de membrana única chamada anfisomos, que se fundem com os lisossomos para produzir autolisossomos. Esses

eventos de fusão são mediados por um processo dependente do complexo II (VPS34, Beclina-1 e UVRAG) e de LAMP-2 e Rab7, formando o autolisossomo. Nesse ambiente ácido, as hidrolases lisossomais quebram a membrana interna do autofagossomo e degradam o conteúdo, assim reciclam esses metabólitos, incluindo aminoácidos, ácidos graxos, glicose e ferro, de volta ao citosol (Kruppa et al., 2016; Sarkar, 2013).

Figura 4. Modelo esquemático representativo da via autofágica em mamíferos. O complexo mTOR é o principal responsável tanto na ativação como a inibição da autofagia. Através da inibição da mTOR, ativa o complexo ULK, que dá início à formação do fagossomo junto com a PIP3, produzido pelo complexo PI3K classe III. Recrutando o complexo Atg16L1/Atg12/Atg5 e o LC3II para o autofagossoma em crescimento permitindo assim a expansão da membrana. Assim o autofagossoma se funde com lisossoma e suas enzimas hidrolíticas degradam o material encapsulado, degradando e reciclando o conteúdo. (modificado de Autophagy Signaling Interactive Pathway 2019 © Cell Signaling Technology).

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

1. Avaliar os efeitos da deficiência da Neuraminidase 1 no processo de autofagia.
2. Determinar os efeitos do bloqueio da função lisossomal sobre o fenótipo muscular na deficiência da Neuraminidase 1.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar *in vivo* e *in vitro* (fibroblastos em cultura) se a deficiência da Neu1 afeta o fluxo autofágico, por meio de técnicas de ativação autofágica como privação alimentar e Rapamicina.
2. Avaliar *in vivo* se o bloqueio da função lisossomal, através do uso da Colchicina, causaria alívio ou exacerbação das alterações histológicas musculares na deficiência de Neu1.

3 MÉTODOS

3.1 Animais do estudo

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos *Neu1*^{-/-} (nocautes) e *Neu1*^{+/+} (normais) machos, no primeiro mês de vida (figura 2). Para obtê-los, camundongos heterozigotos para deficiência Neu1 (*Neu1*^{+/-}) (de Geest et al., 2002) de linhagem FVB/NJ isogênica foram cruzados e mantidos no Centro de Bioterismo da FMUSP em temperatura e umidade controladas, com ciclos de 12 horas de luz e escuro alternados, comida e água *ad libitum*.

Aos 21 dias de idade foram desmamados, genotipados e mantidos em gaiolas com, no máximo, outros 3 irmãos da mesma ninhada.

Camundongos normais e nocautes para o gene *Neu1* (*Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} respectivamente); foram utilizados nos experimentos com $n_{\text{total}}=90$, sendo 10 em padronizações, 20 para coleta de fibroblastos e abordagens *in vitro* e 60 para procedimentos *in vivo*. Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMUSP (protocolo 112/15). O estudo foi conduzido no Laboratório de Investigação Médica 45 (LIM45) da FMUSP.

3.2 Genotipagem

Os filhotes com vinte e um dias de vida foram desmamados e genotipados por meio de PCR multiplex. O DNA foi extraído a partir de

um fragmento da cauda e incubado em solução de lise (20% Tris 0.5M pH 8.5, 4% NaCl 5M, 1% EDTA 0,5M, 2% SDS 10% , 1% proteinase K 20mg/ml e H₂OQA) durante uma hora no termomixer (Eppendorf Thermo-Mixer R) a 60°C a 1.400 rpm, em seguida foi feita centrifugação de 10 minutos a 14.000 rpm. Para precipitação do DNA, foi utilizado isopropanol gelado seguido de homogeneização por inversão e centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm. Foram feitas duas lavagens com etanol 70% fresco, e o DNA foi ressuspendido em 200 µL de tampão TE. Seguindo para PCR multiplex, foi utilizado o kit GoTaq Green Mastermix (Promega, M7122), na proporção de 200ng de DNA e 240nM de cada oligonucleotídeo (Tabela 1). As amostras passaram por um ciclo inicial de desnaturação 98° C por 3 minutos; seguido por 35 ciclos a 98° C por 30 segundos, 70° C por 30 segundos e 72° C por 90 segundos; com um passo final de extensão a 72° C por 10 minutos. (de Geest *et al.*, 2002). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. Após término da eletroforese, o gel foi posicionado em uma bandeja plástica e coberto com a solução 1:10.000 de Diamond Nucleic Acid Dye (Promega) por 30 minutos em agitação leve. O gel foi exposto a luz ultravioleta em um transiluminador convencional e fotografado com exposição de 1 min.

Animais que apresentaram a inserção do cassete β -geo (lacZ-PGK-neo^R) no exon 1 do gene Neu1 em um dos alelos foram considerados heterozigotos (+/-), os que possuíam a inserção em ambos alelos foram considerados homozigotos (-/-), e os que não possuíam nenhuma inserção foram considerados normais (+/+) (Figura 5).

Oligonucleotídeos	Sequências 5' - 3'	Fragmentos obtidos
MNTG1 (direto)	GACAGGGATCGCCGGGAGCTATGG	Direto + reverso: 160pb
MNTG2 (reverso)	CACCAGGCTGAAGTCATCCTCTGC	
LacZ - Lac3KO	GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCG	Direto + LacZ: 450pb

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na genotipagem dos animais do estudo.

Figura 5. Representação dos resultados da genotipagem de um camundongo heterozigoto ($Neu1^{+/-}$), um nocaute ($Neu1^{-/-}$) e um normal ($Neu1^{+/+}$) para o gene *Neu1*. Análise dos fragmentos amplificados na PCR multiplex exibem presença da inserção do cassete β - geo (*lacZ*-PGK-neoR) no exon 1 do gene *Neu1* (banda de 450 pb). Camundongo com a presença da inserção do cassete em apenas um alelo (heterozigoto, +/-), com a inserção nos dois alelos (homozigoto, -/-) ou sem a inserção (normal, +/+). Apenas camundongos homozigotos foram utilizados nos experimentos, enquanto os heterozigotos destinaram-se exclusivamente para a formação de casais.

3.3 Grupos Experimentais

Para indução de autofagia/bloqueio da função lisossomal, foram utilizados camundongos machos com um N de 7 animais por grupo, com um mês de vida. Além disso, os animais foram pesados diariamente para

confirmar a inanição. Os animais permaneceram na sala de comportamento por 30 minutos antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados no período entre 8h00 e 17h00. Ao final de cada grupo de tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical (Neves et al., 2015).

O grupo de privação alimentar foi mantido por 2 dias em gaiolas sem ração (com livre acesso à água potável durante o período de privação alimentar) e foram eutanasiados após esse período. Em paralelo, o grupo de Colchicina adicionado de privação alimentar foi tratado por 4 dias com Colchicina. Nos dois primeiros dias foi disponibilizado livre acesso a água potável e ração, e nos dois últimos dias apenas livre acesso a água potável, e eutanasiados após esse período. A Colchicina (CC) foi administrada via intraperitoneal (0,4 mg/kg/dia, Sigma/C9754). Foi utilizado como veículo de diluição da Colchicina água. Após diluição, a Colchicina foi armazenada a -20 ° C como uma solução-mãe a uma concentração de 4 mg / ml. No dia do tratamento, a Colchicina foi diluída para 0,1 mg / ml em água antes da injeção (Bujak et al., 2015; Ju et al., 2010; Lin et al., 2015).

E o grupo da Rapamicina (4 mg/kg/dia, Sigma-Aldrich) onde foi administrada via intraperitoneal Rapamicina por 7 dias e os animais eutanasiados após esse período (Ching et al., 2013). A Rapamicina foi diluída em etanol 100% e estocada a -20°C. No dia do tratamento, foi diluída em 5% PEG400, 5% Tween 80 e 4% etanol (Guo et al., 2013; Ju et al., 2010).

Ao final do período de tratamento, os animais foram novamente pesados e eutanasiados por deslocamento cervical conforme estabelecido pelo comitê de ética, assim dissecando os músculos gastrocnêmios (GA) e tibial anterior (TA) que foram pesados. Os músculos foram congelados em

isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido e estocados para posterior análise no freezer -80°C.

Para indução de autofagia em cultura, por meio de fragmentos de pele, foram obtidos os fibroblastos que permaneceram por 4 hs em meio de cultura (D10) para o grupo controle, no grupo de privação de aminoácidos foi incubado em meio EBSS e para o grupo de tratamento com Rapamicina foi administrada na dose de 10 µg/mL por 4 horas no meio de cultura (D10) (Ju et al., 2010).

3.4 Histologia geral

Os fragmentos musculares TA foram montados em cortiça e submetidos a cortes transversais em criostato de forma sequencial, a uma temperatura entre -26° e -29° C, com secções com espessura de 6 micrômetros, em criostato da marca Leica CM3000. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina para verificação do aspecto histológico geral ou reação de fosfatase ácida para avaliar a atividade lisossomal.

3.5 Colorações

As lâminas com os cortes histológicos foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) por 5 minutos em Hematoxilina de Harris em cubeta de vidro, após este tempo foram feitas 2 lavagens em água corrente e incubadas para coloração com Eosina 1% por 1 minuto, por fim foram feitas mais 2 lavagens em água corrente. Posteriormente as lâminas foram desidratadas em bateria de alcoóis com concentração ascendente (70 – 100%), lavadas em xileno e montadas com Entellan (Merck 107960).

Para a reação de Fosfatase Ácida, as lâminas foram incubadas em pH 4,7 a 5 por 1 hora e 30 minutos na estufa à 37° (Veronal Acetato buffer 5ml + nitrito de Sódio 4% 0,4ml, pararosalina 5% 0,4 ml + H₂O_D 13 ml + NN Dimethylformamide 1 ml + Naphtol ASB1 Phosfato 10mg). Após o término do período foram lavadas 2 vezes em água corrente e colocadas por 30 segundos em 0,3% methyl Green, posteriormente foram lavadas 2 vezes em água corrente. Após secar ao redor do corte, as lâminas foram montadas com glicerina.

As lâminas foram examinadas e fotografadas em 40x no microscópio Olympus AX70 para comparação e descrição comparativa por intensidade do aglomerado lisossomal.

3.6 Imunofluorescência

Para marcação e avaliação da expressão dos receptores de LC3 -I/II no tecido muscular, cortes com espessura de 7 µm foram submetidos à imunofluorescência. Para proceder as reações, lâminas contendo secções musculares foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram isolados com caneta hidrofóbica e fixados em metanol a -20°C por 3 minutos e foram lavados em PBS por 3 vezes durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram permeabilizados em Triton X-100 0,5% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente, após o término foram bloqueados em solução (10% de soro normal, 0,2% Triton-X-100, 2% BSA) por 30 minutos em temperatura ambiente. Os fragmentos foram incubados overnight a 4°C, com anticorpo primário (Tabela 2) diluído em solução de bloqueio. Para obter um controle interno da reação, cortes também foram incubados apenas com solução de bloqueio nesta etapa. Após lavagens em PBS (3 vezes de 10 minutos), os fragmentos foram novamente bloqueados

por 30 minutos em temperatura ambiente e incubados com anticorpo secundário fluorescente (FITC) diluído em solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente protegido da luz e lavados em PBS (3 vezes de 10 minutos). Por fim as lâminas foram montadas com Vectashild-DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As lâminas foram examinadas no microscópio Olympus AX70 no modo fluorescência em aumento de 40X.

Anticorpo	Hospedeiro	Peso Mol.	Empresa/código	Diluição	Uso
Anti LC3	Coelho, policlonal	16/18 kDa	Sigma/L7543	1/200 1/1000	IF/ WB
Anti Lamp1	Rato	110 kDa	Abcam 25245/1D4B	1/10000	WB
P62/SQSTM1	Coelho	62 kDa	Sigma/P0067	1/1000	WB
Anti- α -tubulina	Camundongo	55 kDa	Hybridoma Bank/12G10	1/600	WB
Anti-coelho IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor ® 488 Conjugate)	Cabra	---	Cell Signaling 4412	1/500	IF
Anti- camundongo HRP	---	---	Rockland, 6101319	1/10 000	WB
Anti-coelho HRP	---	---	Abcam, ab97051	1/20 000	WB
Anti-rato HRP	---	---	Abcam, ab97057	1/20 000	WB

Tabela 2. Tabela de anticorpos utilizados no estudo. Anticorpos e concentrações usadas nas reações de Imunofluorescência (IF), e Western blot (WB).

3.7 Análise ultra-estrutural

Foram avaliados os músculos tibiais anteriores (TA) direito de quatro animais *Neu1^{+/+}* e *Neu1^{-/-}* após privação alimentar, privação alimentar + administração de Colchicina e administração de Rapamicina. Após eutanásia dos animais, fragmentos musculares com 1Mm de espessura foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,15M (pH7,2) por 2 horas, à temperatura ambiente e encaminhados para o Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular da FMUSP. Estes foram lavados 3 vezes em solução de lavagem (0,6 % Cloreto de Sódio (NaCl) 7,3% gramas de Sacarose em água destilada) por 1 minuto e foram incubados em 2 ml de solução de Tetróxido de ósmio a 1% e deixados em repouso por 1 hora na geladeira. Posteriormente, foram feitas três lavagens em solução de lavagem por 1 minuto cada. Enfim os fragmentos foram submetidos a 2 ml de solução de Acetato de Uranila a 1% e incubados "overnight" à 4°. No dia seguinte para desidratação e inclusão do músculo na resina o músculo foi levado à banhos (acetona 30°, por 10 minutos, acetona 70°, por 10 minutos, acetona 95°, por 15 minutos e 4 banhos de acetona 100°, de 15 minutos). Após isso, o material foi incluído em barquinhas e deixado na estufa a 60°, por 72 horas. Foi realizada a análise do melhor local para serem feito os cortes para preparo das telas. As telas foram coradas com Uranila saturada e Citrato de chumbo. A análise foi realizada em Microscópio Eletrônico Zeiss localizado na FMUSP, também pertencente ao Serviço Multiusuário do Departamento de Biologia Celular. As telas foram analisadas em Microscópio Eletrônico de transmissão JEOLJEM-1010.

3.8 Cultura primária de fibroblastos

Para obtermos fibroblastos em cultura, foram coletados dois fragmentos de 1mmx5mm de pele da região dorsal dos camundongos fêmeas *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-} com 1 mês de idade para realizar explante (n=10 por genótipo) após eutanásia por deslocamento cervical. Os fragmentos de pele foram tricotomizados, dissecados e mantidos em meio Leibovitz's L-15 contendo penicilina 10U/mL e estreptomicina 0,1mg/mL (P/S 1%) (meio L15) até o momento da dissociação enzimática. Os tecidos foram incubados em solução de tripsina 0,2% e versene 0,02% (Instituto Adolfo Lutz, ATV) por 45 minutos em banho úmido a 37°C. Os fragmentos foram então dispostos com a derme voltada para baixo e a epiderme foi removida mecanicamente com auxílio de uma pinça curva. A derme foi lavada em PBS e fragmentada para facilitar a dissociação enzimática com collagenase tipo I 1000U/mL (Worthington Biochemical, LS004196) durante 1 hora em banho úmido a 37°C (vórtex a cada 15 minutos). Adicionaram-se 3mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, DMEM) acrescido de 20% de soro fetal bovino e P/S 1% (meio D20) gelado para interrupção da atividade da collagenase, o lisado foi vortexado vigorosamente e centrifugado durante 10 minutos a 150g e 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuscitado em 5mL de meio D20, centrifugado a 150g e 4°C por 5 minutos e novamente ressuscitado em meio D20. Os fibroblastos foram semeados em placas de 100mm com meio D20 e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio D20 foi trocado após 24 e 48 horas para remoção dos *debris*, e três vezes por semana utilizando o DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e P/S 1% (meio D10) nas demais trocas.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os fibroblastos foram cultivados em triplicatas, e quando atingiram a confluência de 80-100%, foram lavadas com PBS e incubadas com meio D10 (DMEM + 10% soro) (controle), meio EBSS (sais balanceados de EARLE) (privação de nutrientes) ou 10ug/mL de rapamicina diluída em meio D10 (Adooq Bioscience A10782) por 4 horas. Em seguida foi realizada a extração de proteínas seguindo a mesma metodologia dos experimentos *ex vivo*. (Li and Siragy, 2017; Min et al., 2013; Zhou et al., 2018)

3.9 Extração de proteínas para experimentos *in vivo* e *in vitro*

Fragmentos do músculo GA de cada animal foram dilacerados com o auxílio de uma lâmina e amassados no gral com pistilo de porcelana, utilizando o processo de congelamento por nitrogênio para a quebra em partículas menores e adicionados no tubo com solução tampão de lise RIPA (1% NP-40 Tergitol, 0,5% Deoxicolato de Sódio, 0,1% de SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM Tris-HCL em PBS) em 10X seu peso em volume contendo um coquetel de inibidores (deoxicolato de sódio 0,5%; inibidor de proteases: Sigma P8340 1%; inibidores de fosfatase: ortovanadato de sódio 10mM), o material masserado foi sonicado, e em seguida foi feita centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos à 4°C, sendo reservado o sobrenadante para uso. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina (BSA) na realização de curva de diluição padrão seriada.

Para a extração de proteínas de células, as placas foram lavadas três vezes com PBS gelado e adicionaram-se 300µL de tampão RIPA gelado (EDTA 1mM; EGTA 1mM; tergitol NP-40 1%; SDS 1%; deoxicolato de

sódio 0,5%; tris - HCl 50mM; inibidor de proteases: Sigma P8340 1%; inibidores de fosfatase: ortovanadato de sódio 10mM; fluoreto de sódio 50mM; pirofosfato de sódio 10mM) para cada placa de 100mm. As células foram removidas utilizando raspador gelado, transferidas para tubo de microcentrífuga e mantidas em agitação por 30 minutos a 4°C. Para a extração de proteínas de tecidos, os músculos GA foram macerados e incubados em tampão RIPA (300µl de tampão RIPA para cada 5mg de tecido). Em seguida, foram mantidos em gelo por 30 minutos. Os lisados celulares e musculares foram centrifugados a 16000g por 20 minutos a 4°C, e os sobrenadantes coletados. A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford utilizando curva de diluições seriadas de BSA como padrão.

3.10 Eletroforese SDS-PAGE (*Western blotting*)

Para corrida eletroforética foram utilizadas 80µg de proteínas ex vivo e 10µg de proteínas provenientes de células, acrescidas de tampão marcador de corrida e β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 99°C por 10 minutos no termomixer e mantidas no gelo pelo mesmo período.

As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE (12% de acrylamida) e submetidas a eletroforese a voltagem de 65 por 1 hora e 50 minutos em aparato de eletroforese marca BioRad. As proteínas foram então transferidas para membrana de PVDF 0,2µm (voltagem de 65 por 1 hora) em uma solução tampão de transferência (Tris, Glicina e 10% metanol) e posteriormente incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em TBS-T (50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl e 0,1% Tween 20) por 1 hora, em temperatura ambiente.

As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C em anticorpo primário (Tabela 2) diluído em solução de leite desnatado 3% em TBS-T. Então foram realizadas três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*Horseradish peroxidase conjugated*) diluído em solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em TBS-T por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem com TBS-T (3 vezes de 10 minutos cada), a membrana foi incubada com reagente quimioluminescente (Western Enhancing Chemiluminescence Reagent Plus, ECL Kit, Perkinelmer, EUA) de 2-3 min em agitação manual. Após a incubação, a membrana foi digitalizada em equipamento C-DIGIT (LI-COR Biosciences, U.S.A), conforme instruções do fabricante.

Para verificar a homogeneidade das amostras transferidas, as membranas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue ou Ponceau. A proteína total foi utilizada como normatizadora da análise da intensidade das bandas.

Com o objetivo de normatizar a quantidade de proteínas do tecido muscular aplicadas ao gel e determinar os valores de *blot* obtidos foi realizada a razão da proteína alvo com normalizador em cada amostra utilizou-se como controle a proteína total das membranas coradas com corante *comassie blue* e escaneadas.

A análise densitométrica das bandas de proteínas marcadas nas membranas foi feita utilizando o software ImageJ (NIH), de acordo com as instruções do manual do desenvolvedor.

3.11 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada inicialmente através do teste de Shapiro-Wilk para a escolha do teste estatístico apropriado. Sendo em seguida analisados através de métodos estatísticos correspondentes ao tipo de distribuição. Para comparação dentre os grupos de amostras foi feita análise de variância (ANOVA) de uma via ou com medidas repetidas em caso de variáveis dependentes seguido de seus pós-teste correspondente, para comparação entre dois grupos de amostras foi realizado teste T de *Student* ou Mann-Whitney dependendo da distribuição de dados, sendo os testes utilizados descritos no momento da apresentação de cada resultado.

Foram consideradas variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultar em um P menor igual a 0,05. Os resultados estão apresentados como medida de tendência central em média aritmética $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Graph Pad Prism*, versão 5.00 de 2007, para *Windows* (Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Histologia

Foram avaliadas por meio da reação de Hematoxilina & Eosina a presença de áreas com aumento da celularidade (fibroblastos), fibras musculares em degeneração (infiltração por fibroblastos), aumento dos espaços endomisiais e perimisiais (matriz extracelular) e por meio da técnica de Fosfatase Ácida foi feita a análise da atividade lisossomal intracitoplasmática (pontos em vermelho), em animais machos (n=7 para cada grupo) nos grupos controle e nos grupos de privação alimentar, com e sem administração de Colchicina e Rapamicina.

As análises histológicas do grupo controle em comparação dos animais normais e nocautes ($Neu1^{+/+}$ e $Neu1^{-/-}$) através de H&E apresentaram alterações nos componentes da matriz extracelular (MEC), com aumento das regiões endomisiais e perimisiais e invasão das fibras por fibroblastos, juntamente com importante degeneração e atrofia muscular nos animais deficientes de $Neu1$ quando comparados ao normal (Figura 6) com importante aumento na atividade lisossomal intracitoplasmática dos animais $Neu1$ deficientes (Figura 7).

Quando em comparação ao controle de seu grupo e levando como base as características base fundamentais da deficiência, a musculatura esquelética de animais submetidos à privação alimentar (com e sem Colchicina), não revelaram alterações consistentes, apenas um leve aumento das regiões endomisiais e perimisiais e atrofia (Figura 6) e a presença de aumento da atividade lisossomal intracitoplasmática, mais importante nos animais $Neu1^{-/-}$ submetidos a estes tratamentos sendo maior nos animais tratados juntamente de privação alimentar e Colchicina (Figura 7), tal como já descrito previamente por Zanoteli *et al.*, 2010.

Com relação aos animais tratados por administração de Rapamicina, foi possível observar uma diminuição e variação no calibre das fibras, com várias fibras atrofiadas e algumas em degeneração (Figura 6), e uma leve diminuição da atividade lisossomal intracitoplasmática, podendo ser visto uma maior atividade nas células em estado de degeneração (Figura 7).

Figura 6. Histologia H&E. Histologia (H&E) do músculo tibial anterior (TA) em animais machos normais e com deficiência de Neu1 após privação alimentar com e sem administração de Colchicina e em Rapamicina. As imagens mostram que não houve alterações significativas histológicas através de hematoxilina & eosina no tecido muscular de animais normais e com deficiência de Neu1, após privação alimentar com ou sem administração de Colchicina (40x) Barra de escala = 50μm

Figura 7. Histologia Fosfatase Ácida. Histologia do músculo tibial anterior (TA) em animais machos normais e com deficiência de *Neu1* após privação alimentar, com e sem administração de Colchicina e Rapamicina. No controle pode se notar uma reação normal para Fosfatase Ácida em camundongo normal e acentuado aumento na reação para Fosfatase Ácida em camundongo com deficiência de *Neu1*. Nas imagens de privação com e sem Colchicina, nota-se um leve aumento na reação para Fosfatase Ácida intracitoplasmática tanto nos animais normais quanto nos animais com

deficiência de Neu1, já nos animais tratados com Rapamicina mostra uma diminuição na reação para Fosfatase Ácida nos animais normais e uma leve diminuição da reação nos animais com deficiência (40x) Barra de escala = 50um.

4.2 Análise ultra-estrutural

Foram avaliados os músculos TAs de cinco animais machos (1 mês de vida) *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}.

Onde foram observados (Figura 8) achados ultra-estruturais na musculatura esquelética em todos os animais machos tanto nos normais e como nos com deficiência de Neu1. Com a presença de diversas estruturas com aspecto autofágico, de diferentes tamanhos, formas e constituintes. Algumas estruturas autofágicas tinham um aspecto bem inicial, apenas com uma membrana e pouco constituinte interno. Porém, em outros casos, havia vacúolos autofágicos bem formados, com dupla membrana e grande quantidade de constituinte interior. Os vacúolos autofágicos ocorrem de forma irregular dentro da fibra muscular, preferencialmente em localização subsarcolemal, o que dificulta identificar sua formação. Mas é possível fazer uma análise qualitativa do aspecto ultra-estrutural dos vacúolos autofágicos.

Figura 8. Análise ultra-estrutural. Músculo TA em camundongos machos normais e

com deficiência de Neu1. Observa-se a presença de diversas estruturas com aspecto autofágico, de diferentes tamanhos, formas e constituintes, tanto em animais normais quanto naqueles com deficiência de Neu1 (setas). Barra = 0.2 μ m; 0.5 μ m; 1 μ m.

4.3 Imunofluorescência e Western Blotting in vivo

Com o objetivo de avaliar a ativação da autofagia na deficiência de Neu1, avaliamos a expressão do LC3 através de imunofluorescência indireta, na musculatura esquelética (tibial anterior). Sabendo-se que o LC3 mostra dois padrões diferentes, o LC3-I apresentando uma fluorescência difusa no citoplasma, enquanto LC3-II apresenta um padrão puntiforme na membrana do autofagossomo ou do fagósporo (Klionsky et al., 2008; Mizushima and Yoshimori, 2007).

Difícilmente foram encontrados conjuntos de células, fluorescentes para LC3, considerando o estudo ultra-estrutural mostrou que os vacúolos autofágicos estão preferencialmente localizados na região subsarcolemal, foram encontrados em sua maioria nesta região, mas foi encontrado um padrão entre os grupos. Não sendo possível observar diferença significativa consistente entre os grupos (Figura 9).

Figura 9. Marcação de LC3 por imunofluorescência indireta em músculo tibial anterior de animais controles e com deficiência de Neu1 dos grupos controle, privação com ou

sem Colchicina e Rapamicina. Não foi possível observar diferenças consistentes entre os grupos através de tal análise. Barra de escala=50um.

Na análise da expressão do LC3 através de *Western Blotting* em músculo gastrocnêmico anterior (Figura 10) mostrou importante ativação autofágica pelo aumento da expressão proteica do LC3-II na privação alimentar e uma maior expressão quando somada com a administração de Colchicina, devido ao bloqueio da degradação lisossomal tanto em animais controles quanto em animais com deficiência de Neu1. E em Rapamicina em ambos os grupos mostrou o aumento do fluxo autofágico completo através do bloqueio do mTOR estando expressa em níveis maiores que o controle em LC3-I. (Figura 8) e relacionado a uma atividade lisossomal aumentada e funcional na musculatura tanto de animais normais quanto de animais com deficiência de Neu1 (Figura 7).

Aproveitando o experimento realizado, testamos a expressão de outro marcador de autofagia e P62/SQTM1. No entanto, a sua expressão não se alterou substancialmente entre os grupos controle e Neu1^{-/-}, tratados e não tratados. E por fim a análise proteica de LAMP1 uma proteína envolvida no processo de exocitose lisossomal mostrou-se, em comparação com os animais normais está muito mais expresso substancialmente nos animais que possuem a doença como já visto em outros experimentos do nosso grupo com um acentuado aumento em privação com e sem Colchicina (Figura 10 e 11).

Figura 10. Expressão de LAMP-1/P62/SQSTM1/LC3-I/II através de Western blotting em músculo gastrocnêmico anterior. Observa-se um aumento da expressão do LC3-II na privação alimentar (com e sem administração de Colchicina) tanto em animais controles quanto em animais com deficiência de Neu1, na Rapamicina observa um aumento de LC3-I. A normalização foi obtida através da razão da proteína alvo com o da proteína total. Utilizamos 80µg por amostra.

Figura 11: Análise da expressão de Lamp-1, P61/SQSTM1 e LC3 por meio da técnica de Western Blotting em músculo gastrocnêmico anterior de animais controles e com deficiência de Neu1 submetidos a privação alimentar (com e sem administração de Colchicina) e Rapamicina. Observa-se ativação do LC3-II na privação alimentar (com e sem administração de colchicina) tanto em animais controles quanto em animais com

deficiência de *Neu1*. A expressão do p62, outro marcador de autofagia, não variou substancialmente entre os diferentes grupos. A expressão do *Lamp-1* foi sempre aumentada nos animais *Neu1*^{-/-}, como esperado, e mostrou acentuado aumento após privação alimentar (com e sem Colchicina) e administração de Rapamicina. Legenda: asteriscos representam comparação estatística em relação ao grupo CT (* = P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001), sustentados representam comparação estatística entre demais grupos (# = P<0,05, ## P<0,01, ### P<0,001). Teste estatístico: Teste *t* de Student para comparação entre grupos.

4.4 Expressão de LC3 em fibroblastos

Tanto após privação de nutrientes quanto após administração de Rapamicina houve ativação do LC3 II, indicando ativação da autofagia (Figura 12). No entanto, tal ativação foi similar entre fibroblastos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}, indicando novamente que a deficiência da Neu1 aparentemente não interfere com a ativação da autofagia.

Figura 12. Expressão de LC3 em fibroblasto em cultura. Expressão de LC3 em fibroblastos em cultura após privação de nutrientes (priv) (meio EBSS) e administração de Rapamicina (rapa). Observa-se aumento da expressão da fração LC3 II após privação e Rapamicina, porém de forma similar entre fibroblastos *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}. CT= controle.

5 DISCUSSÃO

Com o intuito de observar possíveis efeitos de forma sistêmica e isolada, foram realizadas análises provenientes de animais geneticamente modificados para deficiência da neuraminidase 1 (de Geest et al., 2002). Os animais foram tratados com privação alimentar e Rapamicina com o intuito de inibição do mTOR levando a um aumento da reação autofágica. Assim, analisamos a deficiência da neuraminidase 1 em paralelo aos estágios do fluxo autofágico (Guo et al., 2013; Ju et al., 2010; Neves et al., 2015).

Também foram realizados experimentos em grupo tratado com Colchicina adicionado da técnica de privação alimentar, que promove a inibição da mTOR, assim intensificando o fluxo autofágico e bloqueando a fusão do autofagossomo com o lisossomo, desta forma impedindo a degradação lisossomal e gerando o acúmulo de vacúolos (Bujak et al., 2015; Ju et al., 2010; Klionsky et al., 2016; Lin et al., 2015).

Além dos experimentos *in vivo*, foram feitos experimentos *in vitro* com cultura primária de fibroblastos por meio de uma secção da pele dos camundongos normais e deficientes para *Neu1* tratados com a Rapamicina e com a privação de nutrientes (em meio EBSS) (Li and Siragy, 2017; Min et al., 2013; Zhou et al., 2018).

As análises histológicas de músculos de animais machos através de Hematoxilina & Eosina e reação de Fosfatase Ácida confirmou novamente que em animais com deficiência de *Neu1* há um aumento anormal do espaço endomisial e perimisial, e um aumento da atividade lisossomal intracitoplasmática, característica base dos animais com deficiência, provocada por uma super-sialilação nas células, produzindo um aumento da exocitose lisossomal destas organelas sialiladas, dados que já haviam sido

descritos em pesquisas anteriores do nosso grupo em Neves et al., 2015; Zanoteli et al., 2010 e Rizzato, 2014.

Nos animais submetidos à privação alimentar (com e sem administração de Colchicina), foi observado apenas um leve aumento na reação para Fosfatase Ácida intracitoplasmática. Tal aumento na reação foi mais importante nos animais *Neu1*^{-/-} submetidos a estes tratamentos, indicando uma maior atividade lisossomal.

Com relação à administração de Rapamicina, observa-se na reação de Hematoxilina & Eosina uma diminuição do calibre causado pela atrofia nas fibras e uma maior quantidade de fibras em degeneração, em complemento, a reação de Fosfatase Ácida nos mostrou uma leve diminuição da reação de atividade lisossomal, indicada por menor quantidade de pontos vermelhos intracitoplasmáticos, focando os pontos vermelhos em estruturas que estavam em processo de degeneração, podendo ser visto em maior quantidade nos animais com deficiência de *Neu1*. As alterações se deram devido à administração da Rapamicina, que com o aumento da autofagia, alterou a homeostase, fazendo com que haja uma maior degradação dos componentes intracelulares e até da fibra por inteira, levando ao aumento da degeneração e atrofia da fibra muscular.

No experimento de análise ultra-estrutural, foi encontrado em todos os grupos, nos animais normais, igualmente nos animais com deficiência de *Neu1*, tanto nos experimentos intensificadores de autofagia, quanto no experimento bloqueador da degradação autofágica, sendo encontradas estruturas com aspecto autofágico, de diferentes tamanhos, formas e constituintes, espalhadas pela fibra, mas preferencialmente localizadas na região subsarcolemal. Evidenciando-nos, que após analisar os animais controles e os deficientes de cada grupo, apontou que os tratamentos foram eficazes, levando a formação de vacúolos sendo em parte de aspecto inicial,

com uma membrana e pouco material interno. Em outros casos, os vacúolos eram bem formados, com dupla membrana e grande quantidade de material interno. Evidenciando que a resposta aos tratamentos foi igual nos animais *Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}.

A análise de microscopia de Imunofluorescência se tratava de uma técnica de difícil avaliação, objetiva e estatisticamente rigorosa, onde dificilmente foram encontrados vários conjuntos de células, que mostravam a fluorescência puntiforme de LC3-II, alguns encontrados preferencialmente na região subsarcolemal, equivalendo-se do que foi encontrado na técnica de análise ultra-estrutural, sendo que todos os grupos de tratamento tanto os normais como os deficientes de *Neu1*, mostraram tratar do mesmo padrão de achado autofágico (Pugsley, H. R. 2017; Klionsky et al., 2008; Mizushima and Yoshimori, 2007).

Na análise da expressão proteica por meio da técnica de *Western Blotting*, detectamos aumento no fluxo autofágico sob privação alimentar indicado por uma importante expressão do LC3-II e um maior aumento do nível de LC3-II quando a fusão do autofagossomo com o lisossomo foi bloqueada quando o tratamento foi implementado com Colchicina, tanto em animais controles quanto em animais com deficiência de *Neu1*. Além disso, observamos uma importante ativação do LC3-I e uma maior degradação de LC3-II em Rapamicina em ambos os grupos, mostrando assim que houve um aumento da via da autofagia através do bloqueio do mTOR.

Tais achados indicam que a deficiência de *Neu1* não afeta o correto funcionamento do LC3, ou seja, não reduz e nem aumenta sua resposta. Este resultado é compatível com o obtido no estudo ultra-estrutural e na imunofluorescência, que mostrou que mesmo com deficiência de *Neu1* o

vacúolo autofágico é formado após ativação e visto em maior expressão quando há o bloqueio da digestão da organela.

Testamos a expressão de outro importante marcador autofágico, o P62/SQTM1, no entanto sua expressão não se alterou substancialmente, entre os grupos controle e Neu1^{-/-}, estando levemente aumentada nos animais tratados com privação alimentar com ou sem Colchicina e estando com uma leve diminuição da expressão proteica no grupo da Rapamicina quando comparado ao controle. E por fim a análise da expressão proteica de LAMP-1 uma proteína envolvida no processo de exocitose com função na ancoragem lisossomal, que se mostrou, em comparação com o animal normal, substancialmente expressa nos animais que possuem a doença, como já visto em outros experimentos do nosso grupo, e visto um aumento em nos tratamentos de privação alimentar com e sem Colchicina (Neves et al., 2015; Zanoteli et al., 2010 e Rizzato, 2014).

6 CONCLUSÃO

Os experimentos relacionados com a ativação autofágica mostraram ser uma técnica confiável, nos levando a obter um aumento dos vacúolos autofágicos em todos os grupos quando comparados ao grupo controle, mas quando comparados entre o grupo normal e o grupo nocaute (*Neu1*^{+/+} e *Neu1*^{-/-}), não resultou em diferenças consideráveis entre os músculos e fibroblastos, podendo-se concluir que a deficiência da *Neu1*, não está envolvida no processo de autofagia, nem mesmo sua super-sialilação causa alteração, nem regulando positivamente ou negativamente.

O experimento relacionado ao bloqueio da fusão lisossomal no autofagossomo, mostrou ser uma técnica confiável, gerando um aumento na produção de lisossomos e vacúolos ativos, e maior ativação quando forçado a realizar uma maior degradação para que a célula se mantenha homeostática, mostrando assim novamente que a deficiência da *Neu1*, não está envolvida no processo de autofagia.

Desta forma, podemos concluir com estes experimentos, que até o momento a deficiência da *Neu1*, apesar de ser uma importante enzima lisossomal, não interfere no processo de autofagia.

ANEXO

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo do envolvimento da neuraminidase 1 no processo de autofagia na musculatura esquelética**” protocolo nº **112/15** sob a responsabilidade de **Edmar Zanoteli** e **Rubens de Larina Neto**, apresentado pelo Departamento de Neurologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 15.07.2015

Vigência do Projeto	Agosto/2016
Espécie/linhagem	camundongo
Nº de animais	110
Peso/Idade	3 semanas
Sexo	fêmea
Origem	Biotério Central da FMUSP

CEUA-FMUSP, 15 de Julho de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP

e-mail: ceua.fm@usp.br

REFERÊNCIA

1. Au AK, Bayir H, Kochanek PM, Clark RSB. Evaluation of autophagy using mouse models of brain injury. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:918–23. doi:10.1016/j.bbadis.2009.10.010.
2. Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010;221:117–24. doi:10.1002/path.2694.
3. Bonten E, van der 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* 1996;10:3156–69.
4. Bonten EJ, Arts WF, Beck M, Covanis A, Donati MA, Parini R, et al. Novel mutations in lysosomal neuraminidase identify functional domains and determine clinical severity in sialidosis. *Hum Mol Genet* 2000;9:2715–25. doi:10.1093/hmg/9.18.2715.
5. Bujak AL, Crane JD, Lally JS, Ford RJ, Kang SJ, Rebalka IA, et al. AMPK Activation of Muscle Autophagy Prevents Fasting-Induced Hypoglycemia and Myopathy during Aging. *Cell Metab* 2015;21:883–90. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.016.
6. Ching JK, Ju JS, Pittman SK, Margeta M, Weihl CC. Increased autophagy accelerates colchicine-induced muscle toxicity. *Autophagy* 2013;9:2115–25. doi:10.4161/auto.26150.
7. Costa Pereira A, Dias do Carmo E, Ávila Sarmiento Silveira V, Ungaro Amadei S, Eduardo Blumer Rosa L. O papel das MMP-2 e-9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide The role of MMP-2 and MMP-9 in the development of squamous cell carcinoma. vol. 52. 2006.

8. Dodds SG, Livi CB, Parihar M, Hsu H-K, Benavides AD, Morris J, et al. Adaptations to chronic rapamycin in mice. *Pathobiol Aging Age-Related Dis* 2016;6:31688. doi:10.3402/pba.v6.31688.
9. Fan X, Liang Q, Lian T, Wu Q, Gaur U, Li D, et al. Rapamycin preserves gut homeostasis during *Drosophila* aging. *Oncotarget* 2015;6:35274–83. doi:10.18632/oncotarget.5895.
10. Fanzani A, Zanola A, Faggi F, Papini N, Venerando B, Tettamanti G, et al. Implications for the mammalian sialidases in the physiopathology of skeletal muscle. *Skelet Muscle* 2012;2:23. doi:10.1186/2044-5040-2-23.
11. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic Control of Autophagy. *Cell* 2014;159:1263–76. doi:10.1016/j.cell.2014.11.006.
12. Gao Y, Wang N, Liu L, Liu Y, Zhang J. Relationship between mammalian target of rapamycin and autophagy in lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Surg Res* 2016;201:356–63. doi:10.1016/j.jss.2015.11.018.
13. de Geest N, Bonten E, Mann L, de Sousa-Hitzler J, Hahn C, d’Azzo A. Systemic and neurologic abnormalities distinguish the lysosomal disorders sialidosis and galactosialidosis in mice. *Hum Mol Genet* 2002;11:1455–64. doi:10.1093/hmg/11.12.1455.
14. Guo D, Zeng L, Brody DL, Wong M. Rapamycin Attenuates the Development of Posttraumatic Epilepsy in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *PLoS One* 2013;8:e64078. doi:10.1371/journal.pone.0064078.
15. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:251–62. doi:10.1038/nrm3311.

16. 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* 2008;173:1042–56. doi:10.2353/ajpath.2008.071081.
17. Silva, B. Mestrado em medicina tropical papel da autofagia na resposta imune ao mycobacterium leprae. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de janeiro, 2012.
18. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011;7:279–96. doi:10.4161/AUTO.7.3.14487.
19. Ju J-S, Varadhachary AS, Miller SE, Weihl CC. Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle. *Autophagy* 2010;6:929–35. doi:10.4161/auto.6.7.12785.
20. 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* 2000;19:5720–8. doi:10.1093/emboj/19.21.5720.
21. Khan A, Sergi C, Khan A, Sergi C. Sialidosis: A Review of Morphology and Molecular Biology of a Rare Pediatric Disorder. *Diagnostics* 2018;8:29. doi:10.3390/diagnostics8020029.
22. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011;13:132–41. doi:10.1038/ncb2152.
23. Kima PE, Burleigh B, Andrews NW. Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 2000;2:477–86.

24. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozana A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12:1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356.
25. Kruppa AJ, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosins, Actin and Autophagy. *Traffic* 2016;17:878–90. doi:10.1111/tra.12410.
26. Lin P-H, Duann P, Komazaki S, Park KH, Li H, Sun M, et al. Lysosomal two-pore channel subtype 2 (TPC2) regulates skeletal muscle autophagic signaling. *J Biol Chem* 2015 a;290:3377–89. doi:10.1074/jbc.M114.608471.
27. Li C, Siragy HM. Autophagy upregulates (pro)renin receptor expression via reduction of P62/SQSTM1 and activation of ERK1/2 signaling pathway in podocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2017; 313:R58–64. doi:10.1152/ajpregu.00088.2017.
28. Lowden, J. A. and J. S. O'Brien. Sialidosis: a review of human neuraminidase deficiency. 1979; *Am J Hum Genet* 31(1): 1-18.
29. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, et al. Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass. *Cell Metab* 2009;10:507–15. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.008.
30. Maurice P, Baud S, Bocharova O V., Bocharov E V., Kuznetsov AS, Kawecki C, et al. New Insights into Molecular Organization of Human Neuraminidase-1: Transmembrane Topology and Dimerization Ability. *Sci Rep* 2016;6:38363. doi:10.1038/srep38363.
31. Min Y, Xu W, Liu D, Shen H, Xu Y, Zhang S, et al. Earle's balanced salts solution and rapamycin differentially regulate the *Bacillus Calmette-Guerin*-induced maturation of human dendritic cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013; 45:162–9. doi:10.1093/abbs/gms117.

-
32. Miyagi T, Yamaguchi K. Mammalian sialidases: Physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology* 2012;22:880–96. doi:10.1093/glycob/cws057.
  33. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 2011;147:728–41. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026.
  34. 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* 2004;15:1101–11. doi:10.1091/mbc.e03-09-0704.
  35. Monti E, Bonten E, D’Azzo A, Bresciani R, Venerando B, Borsani G, et al. Sialidases in Vertebrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, vol. 64, 2010, p. 403–79. doi:10.1016/S0065-2318(10)64007-3.
  36. Nazio F, Cecconi F. mTOR, AMBRA1, and autophagy: an intricate relationship. *Cell Cycle* 2013;12:2524–5. doi:10.4161/cc.25835.
  37. Neves J de C, Rizzato VR, Fappi A, Garcia MM, Chadi G, van de Vlekkert D, et al. Neuraminidase-1 mediates skeletal muscle regeneration. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2015;1852:1755–64. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.006.
  38. Nishino I. Autophagic Vacuolar Myopathy. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:90–5. doi:10.1016/j.spen.2006.06.004.
  39. Pugsley, H. R. Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry. *J. Vis. Exp.* (125), e55637, doi:10.3791/55637 (2017).
  40. Rizzato VR. Envolvimento da neuraminidase-1 na atrofia muscular. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2014. doi:10.11606/D.5.2014.tde-01122014-094857.

-
41. Saliba SW. Avaliação do efeito da rapamicina sobre a neuroinflamação e neurodegeneração em modelo de excitotoxicidade induzido por injeção intraestriatal de ácido quinolínico n.d.
  42. Sarkar S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem Soc Trans* 2013;41:1103–30. doi:10.1042/BST20130134.
  43. Settembre C, De Cegli R, Mansueto G, Saha PK, Vetrini F, Visvikis O, et al. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat Cell Biol* 2013;15:647–58. doi:10.1038/ncb2718.
  44. Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al. Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
  45. Thomas, G. H.. Disorders of Glycoprotein Degradation: α -Mannosidosis, β -Mannosidosis, Fucosidosis, and Sialidosis. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 2001; 3507–3534.
  46. Winter RM, Swallow DM, Baraitser M, Purkiss P. Sialidosis type 2 (acid neuraminidase deficiency): clinical and biochemical features of a further case. *Clin Genet* 1980;18:203–10.
  47. Yogalingam G, Bonten EJ, van de Vlekkert D, Hu H, Moshiah S, Connell SA, et al. Neuraminidase 1 Is a Negative Regulator of Lysosomal Exocytosis. *Dev Cell* 2008;15:74–86. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.005.
  48. Yuan H-X, Russell RC, Guan K-L. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* 2013;9:1983–95.

-
49. Zanoteli E. Mecanismos moleculares envolvidos no trofismo e na regeneração do tecido muscular e na fisiopatogenia das doenças neuromusculares 2013.
  50. Zanoteli E, van de Vlekkert D, Bonten EJ, Hu H, Mann L, Gomero EM, et al. Muscle degeneration in neuraminidase 1-deficient mice results from infiltration of the muscle fibers by expanded connective tissue. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:659–72. doi:10.1016/j.bbadis.2010.04.002.
  51. Zhang X, Chen S, Huang K, Le W. Why should autophagic flux be assessed? *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:595–9. doi:10.1038/aps.2012.184.
  52. Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Zhang X, et al. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 2011;7:412–25. doi:10.4161/auto.7.4.14541.
  53. Zhou L, Kong Q, Zhang Y, Yang W, Yan S, Li M, et al. Glucose deprivation promotes apoptotic response to S1 by enhancing autophagy in human cervical cancer cells. *Cancer Manag Res* 2018;10:6195–204. doi:10.2147/CMAR.S184180.