Juliana de Carvalho Neves

Regulação de receptores de IGF e PDGF na musculatura esquelética de camundongos com deficiência de neuraminidase 1

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Neves, Juliana de Carvalho
Regulação de receptores de IGF e PDGF na musculatura esquelética de camundongos com deficiência de neuraminidase 1 / Juliana de Carvalho Neves. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Neuraminidase 1 2.Músculo esquelético 3.Fibroblastos 4.Lisossomos 5.Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 6.Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas 7.Catepsinas

USP/FM/DBD-372/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Para minha família e amigos.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo e ao Prof. Dr. Edmar Zanoteli, pela oportunidade de desenvolver meu doutorado e participar de atividades que contribuíram de modo importante para minha formação.

À Profa. Dra. Alessandra D'Azzo, por ter fornecido as matrizes para estabelecimento da colônia dos camundongos utilizados neste estudo.

À equipe do *Laboratório de Neurologia Translacional* (LIM 45) pelo suporte.

Aos colegas do grupo de pesquisa de *Mecanismos moleculares e fisiopatogênicos das doenças neuromusculares*, por todas as contribuições e companheirismo, em especial Marina Dezie Tanaka, Sara Borges Viana, Rubens De Larina Neto, Alan Fappi e Eliene Dutra Campos.

Aos colegas e doutores Tiffany Coralie De Bessa, Victor Debbas, Paulo Newton Tonolli, Jessica Ruivo Maximino, Thaís Alves da Costa Silva, Daiane Dias Ferreira e todos os membros do LIM 58, pelas discussões, sugestões e auxílio nos experimentos.

À banca da minha qualificação: Profa. Dra. Umbertina Conti Reed, Profa. Dra. Célia Harumi Tengan e Dra. Mara Sandra Hoshida, pelas considerações e sugestões.

À FAPESP (processos 2015/05215-0 e 2014/02501-0), Capes, CNPq (processo 141662/2018-2) e ao Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE-FMUSP), por financiamento e bolsas.

Sumário

1 Introdução **1**

1.1 Neuraminidase 1 1

1.2 Receptores de IGF-1R e de PDGFR 7

1.3 Hipótese do estudo 11

2 Objetivos **13**

2.1 Objetivo geral 13

2.2 Objetivos específicos 13

3 Métodos **14**

3.1 Animais 14

3.2 Genotipagem 15

3.3 Procedimentos in vivo 16

3.4 Seccionamento histológico, colorações e medição de área das fibras 19

3.5 Procedimentos in vitro 19

3.5.1 Cultura primária de fibroblastos 19

3.5.2 Viabilidade celular 20

3.5.3 Estimulação e inibição de IGF-1R e PDGFR 22

3.5.4 Estudo de proliferação 22

3.5.5 Desialilação 23

3.6 Imunofluorescência 24

3.7 Separação das frações citosólica e lisossomal 24

3.8 Atividade das catepsinas B e L 25

3.9 Extração de proteínas 25

3.10 Western blotting 26

3.11 Análise estatística 28

4 Resultados 29

4.1 Tratamentos in vivo e in vitro com inibidores de IGF-1R e PDGFR 29

4.1.1 Peso corporal e muscular 29

4.1.2 Aspecto histológico geral 32

4.1.3 Área das fibras 34

4.1.4 Determinação das concentrações de inibidores para estudos in vitro 34

4.1.5 Marcadores de vias moleculares 35

4.1.6 Proliferação celular 41

4. 1.7 Fosfatase ácida 43

4.1.8 Expressão das catepsinas B e L nos músculos 45

4.1.9 Resumo dos resultados da inibição de IGF-1R e PDGFR 46

4.2 Tratamento de fibroblastos Neu1$^{-/-}$ com neuraminidase 48

5 Discussão 51

6 Conclusões 56

7 Anexos 57

8 Referências 58

Lista de abreviaturas e siglas

Akt	Proteína quinase B
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CO_2	Gás carbônico
DAPI	4′,6-diamidina-2′-fenilindol dicloridrato
DMEM	Em inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Do inglês, ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FVB	Em inglês, *Friend Virus B NIH Jackson*
HCl	Ácido clorídrico
HRP	Do inglês, raiz forte
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
IR	Receptor de insulina
LAMP-1	Do inglês, proteína 1 associada à membrana do lisossomo
MCF-7	*Michigan Cancer Foundation-7*
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio

Neu	Neuramindase
OCT	Do inglês, temperatura ótima para corte
p70S6K	Proteína ribossomal S6 quinase
PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PPCA	Proteína protetora/catepsina A
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RIPA	Do inglês, *Radioimmuno Precipitation Assay*
RPMI	Do inglês, *Roswell Park Memorial Institute Medium*
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBS	Tampão tris salino
TBS-T	Tampão tris salino *Tween*

Lista de figuras

Figura 1: Representação dos alelos _____ 4

Figura 2: Degeneração da musculatura esquelética *Neu1*$^{-/-}$ _____ 6

Figura 3: Desialilação de IGF-1R e PDGFR na proliferação celular _____ 7

Figura 4: Hipótese dos efeitos da deficiência da Neu1 _____ 12

Figura 5: Camundongos utilizados no estudo _____ 15

Figura 6: Representação da genotipagem _____ 16

Figura 7: Desenho experimental do estudo *in vivo* _____ 18

Figura 8: Classificação dos níveis de citotoxicidade dos inibidores _____ 22

Figura 9: Progressão do peso corporal de camundongos_____ 30

Figura 10: Peso dos animais e músculos _____ 31

Figura 11: Aspecto geral de músculos _____ 33

Figura 12: Área das fibras musculares _____ 34

Figura 13: Fibroblastos viáveis após incubação com inibidores _____ 35

Figura 14: Expressão de Akt após inibição do IGF-1R _____ 37

Figura 15: Expressão de ERK após inibição do IGF-1R _____ 38

Figura 16: Expressão de Akt após inibição do PDGFR_____ 39

Figura 17: Expressão de ERK após inibição do PDGFR_____ 40

Figura 18: Marcadores de proliferação celular após inibição de IGF-1R____ 42

Figura 19: Marcadores de proliferação celular após inibição de PDGFR ___ 43

Figura 20: Atividade lisossomal em músculos tratados com inibidores de IGF-1R e PDGFR _____ 44

Figura 21: Expressão das catepsinas B e L em músculos após inibição de IGF-1R _____ 45

Figura 22: Expressão das catepsinas B e L em músculos após inibição de PDGFR _____ 46

Figura 23: Resumo dos resultados _____ 47

Figura 24: Imunofluorescência de fibroblastos tratados com Neu_____ 49

Figura 25: Expressão proteica e atividade as catepsinas B e L após tratamento com Neu _____ 50

Lista de tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na genotipagem _____ 16

Tabela 2: Detalhamento dos grupos experimentais_____ 18

Tabela 3: Anticorpos utilizados no estudo para imunofluorescência. _____ 24

Tabela 4: Anticorpos utilizados nos experimentos de western blotting._____ 27

Resumo

Neves JC. *Regulação de receptores de IGF e PDGF na musculatura esquelética de camundongos com deficiência de neuraminidase 1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A neuraminidase 1 (Neu1) é a enzima que regula o catabolismo de sialoglicoconjugados nos lisossomos. A deficiência da Neu1 é a base da sialidose, doença grave associada a um amplo espectro de manifestações, incluindo hipotonia e fraqueza muscular. Camundongos com deficiência de Neu1 desenvolvem degeneração muscular caracterizada principalmente por atrofia, invasão das fibras musculares por fibroblastos e expansão da matriz extracelular. A Neu1 controla a proliferação de fibroblastos de pacientes por meio da desialilação dos receptores de PDGF e IGF. Além disso, há enzimas lisossomais que são moduladas pela Neu1, tais como as catepsinas, que são capazes de degradar componentes musculares e estariam excessivamente ou erroneamente ativas (sialiladas) em decorrência da deficiência de Neu1. O objetivo deste trabalho foi identificar se o fenótipo da musculatura esquelética de camundongos *Neu1*$^{-/-}$ poderia estar associado à atividade do IGF-1R, PDGFR e/ou à sialilação de catepsina B, através da análise histológica e proteica de músculos esqueléticos e fibroblastos de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ tratados com inibidores de IGF1-R e PDGFR. O estudo da expressão proteica de catepsina B foi realizado nos músculos tratados com os inibidores de IGF-1R e PDGFR, e nas frações citosólica e lisossomal de fibroblastos tratados com neuraminidase exógena. Em comparação com camundongos *Neu1*$^{+/+}$, os músculos de animais *Neu1*$^{-/-}$ apresentam menor área de fibra, peso corporal, expressão de pAkt e maior expressão de catepsina B; e os fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ exibem maior proliferação e expressão de pAkt. A inibição do IGF-1R em camundongos *Neu1*$^{-/-}$ aumentou a área das fibras musculares, expressão de pAKt e diminuiu a expressão de catepsina B; em relação aos fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$, entretanto aumentou a proliferação celular com diminuição de pAkt. A inibição do PDGFR em músculos de camundongos *Neu1*$^{-/-}$ levou ao aumento da expressão de pAkt, da área das fibras, com diminuição de pERK e catepsina L, quando comparados com os controles *Neu1*$^{-/-}$; a mesma inibição *in vitro* conduziu à diminuição da expressão de pAkt, pERK e proliferação. A catepsina B encontra-se bastante ativa na fração lisossomal e o tratamento com neuraminidase foi eficaz na correção de seu peso molecular e compartimentalização lisossomal. De forma geral, o fenótipo muscular de camundongos *Neu1*$^{-/-}$ parece estar relacionado com a atividade de IGF-1R e PDGFR, e a catepsina B hipersialilada é potencialmente deletéria para o músculo esquelético.

Descritores: neuraminidase 1; músculo esquelético; fibroblastos; lisossomos; receptor de fator de crescimento semelhante à insulina; receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas; catepsinas.

Abstract

Neves JC. *Regulation of IGF and PDGF receptors in the skeletal muscle of neuraminidase 1 deficient mice* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Neuraminidase 1 (Neu1) is an enzyme that regulates the catabolism of sialoglycoconjugates in lysosomes. Neu1 deficiency is the basis of sialidosis, a severe disease associated with a broad spectrum of manifestations, including hypotonia and muscle weakness. Neu1 deficient mice develop muscular degeneration characterized by atrophy, invasion of muscle fibers by fibroblasts, and expansion of the extracellular matrix. Neu1 controls the proliferation of fibroblasts from patients through the desialylation of PDGF and IGF receptors. In addition, lysosomal enzymes are modulated by Neu1, such as cathepsins, which degrade muscle components and are excessively or erroneously active (sialylated) as a result of Neu1 deficiency. The aim of this study was to identify whether skeletal muscle phenotype of *Neu1*$^{-/-}$ mice may be associated with IGF-1R, PDGFR and/or sialylation of cathepsin B, through protein and histological analysis of skeletal muscles and fibroblast from *Neu1*$^{+/+}$ and *Neu1*$^{-/-}$ mice treated with IGF-1R and PDGFR inhibitors. The study of cathepsin B protein expression was performed in skeletal muscles treated with IGF-1R and PDGFR inhibitors, and in the cytosolic and lysosomal fractions of fibroblasts treated with exogenous neuraminidase. Compared with *Neu1*$^{+/+}$ animals, *Neu1*$^{-/-}$ muscles showed smaller muscle fiber area, body weight, pAkt expression and higher cathepsin B expression; and *Neu1*$^{-/-}$ fibroblasts exhibited increased proliferation and expression of pAkt. The inhibition of IGF-1R *Neu1*$^{-/-}$ mice increased the area of muscle fibers, expression of pAkt and decreased expression of cathepsin B; but, considering *Neu1*$^{-/-}$ fibroblasts, there was increased cell proliferation with reduction of pAkt. The inhibition of PDGFR in muscles of *Neu1*$^{-/-}$ mice led to increased expression of pAkt, muscle fiber area, with decreased expression of pERK and cathepsin L, when compared with the *Neu1*$^{-/-}$ controls; the same inhibition *in vitro* led to reduced expression of pAkt, pERK and cell proliferation. Cathepsin B presented high activity in the lysosomal fraction and the treatment with neuraminidase was effective in the correction of its molecular weight and lysosomal compartmentalization. In general, the muscular phenotype of *Neu1*$^{-/-}$ mice is possibly related to IGF-1R and PDGFR activity, and oversialylated cathepsin B is potentially deleterious for the skeletal muscle.

Descriptors: neuraminidase 1; muscle, skeletal; fibroblasts; lysosomes; insulin like growth factor receptor; platelet-derived growth factor receptor; cathepsins.

1 Introdução

1.1 Neuraminidase 1

As neuraminidases são exoglicosidases importantes para a regulação de diversos processos biológicos, como ativação de vias bioquímicas, mudanças conformacionais de glicoproteínas, reconhecimento e marcação de biomoléculas (Monti *et al.*, 2002, Miyagi T., 2007) por meio da clivagem de ácidos siálicos das porções terminais de glicolipídios e glicoproteínas (Bonten *et al.*, 1996, Rottier *et al.*, 1998). Em células animais, a neuraminidase 1 (Neu1) é encontrada principalmente nos lisossomos e, em menor frequência, na membrana plasmática (Vinogradova *et al.*, 1998, Lukong *et al.*, 2001), a Neu2 no citoplasma (Monti *et al.*, 1999, Koda *et al.*, 2009), a Neu3 principalmente nas membrana plasmática, mas também nas membranas endossomal e lisossomal (Wang *et al.*, 2002, Zanchetti *et al.*, 2007) e a Neu4 especialmente nas mitocôndrias (Yamaguchi *et al.*, 2005, Bigi *et al.*, 2010), além da membrana do retículo endoplasmático (Monti *et al.*, 2004, Yamaguchi *et al.*, 2005) e lisossomos (Seyrantepe *et al.*, 2004). Além de diferirem geneticamente e em suas localizações subcelulares, as neuraminidases também possuem pH ótimo de atuação, diferentes respostas a íons e detergentes, propriedades cinéticas e substratos específicos, com pouca sobreposição de função entre si (Monti *et al.*, 2010).

Após sua síntese, a Neu1 se associa à proteína protetora/catepsina A (PPCA) e é transportada para os lisossomos em um complexo de proteico de alto peso molecular que evita a degradação da Neu1 e a mantém

cataliticamente ativa (Bonten *et al.*, 1996). A Neu1 atua em vários tecidos, como na glândula mamária, nos testículos, na tireoide, células do sistema imunológico e fibroblastos (Monti *et al.*, 2010). Porém, a expressão de Neu1 não é equivalente, apresentando níveis mais elevados nos rins, pâncreas, fígado, pulmões, placenta e cérebro (Bonten *et al.*, 1996, Smutova *et al.*, 2014).

Dentre as neuraminidases, a Neu1 é a que apresenta a maior quantidade de estudos indexados no banco de dados *Pubmed* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/, acesso em 05/09/2018), possivelmente por ser, até o momento, a única associada a patologias especificamente decorrentes de sua deficiência. A deficiência primária da Neu1 em humanos está associada à sialidose, uma doença de depósito lisossomal de herança autossômica recessiva (Thomas, 2001). Pacientes com sialidose desenvolvem um amplo espectro de manifestações clínicas, e a gravidade da doença está frequentemente correlacionada com os níveis de atividade residual da Neu1 (Bonten *et al.*, 2000).

A sialidose tipo 1 é a forma mais branda da doença, manifesta-se na segunda década de vida resultando em perda progressiva da visão associada à degeneração macular (*cherry-red spots*), nistagmo, ataxia e síndrome mioclônica (Thomas, 2001). A sialidose tipo 2 é considerada a forma grave da doença, manifestando-se no período perinatal, com quadros de hidropsia fetal, ascite neonatal, alterações dismórficas, aspecto *hurler-like*, disostose multiplexa, hepatoesplenomegalia e comprometimento neurológico. Além disso, alguns pacientes com sialidose também desenvolvem hipotonia e atrofia da musculatura esquelética (Bonten *et al.*, 2000).

O gene que codifica a *NEU1* humana e o que codifica a *Neu1* murina possuem organização genômica similar e ambos se localizam no complexo principal de histocompatibilidade (*loci* 6p21.3 e 17 H-2, respectivamente) (Bonten *et al.*, 1996, Pshezhetsky *et al.*, 1997, Igdoura *et al.*, 1998). Foram descritas mais de 40 mutações no gene *NEU1* que podem causar a sialidose, em sua maioria mutações *missense de novo* localizadas nos éxons 4 a 6 (Bonten *et al.*, 2000, Pattison *et al.*, 2004, Seyrantepe *et al.*, 2004). Também podem ocorrer mutações, deleções, inserções, duplicações e erros de *splicing*. Os polipeptídios sintetizados a partir do gene humano e do murino compartilham 90% de semelhança (Monti *et al.*, 2010), possibilitando supor a reprodutibilidade de resultados gerados a partir do camundongo modelo para estudo da sialidose criado por de Geest *et al.* (2002). Esta informação é interessante no contexto em que, apesar dos possíveis danos à musculatura esquelética em pacientes com sialidose, não há biópsias musculares de pacientes descritas na literatura. Portanto, todas as análises histológicas da musculatura esquelética na deficiência de Neu1 provêm de estudos com o modelo animal (Zanoteli *et al.*, 2010, Neves *et al.*, 2015).

Os camundongos homozigotos para o gene *Neu1* nocauteado (*Neu1*$^{-/-}$) pela inserção de um cassete β-geo -lacZ-PGK-neoR no éxon 1, **Figura 1**), traduzem uma forma truncada não funcional de Neu1 (de Geest *et al.*, 2002). Os camundongos *Neu1*$^{-/-}$ apresentam fenótipo intermediário aos tipos 1 e 2 da sialidose e são menores do que os controles normais desde o nascimento, mas os sinais da deficiência de Neu1 se evidenciam ao final do primeiro mês de vida. Quando mais velhos, encontram-se debilitados, apresentam tremores e dificuldade na locomoção. Com idade entre 6 e 9 meses morrem devido à

redução na absorção de nutrientes causada por hiperqueratose do aparelho digestivo (de Geest *et al.*, 2002).

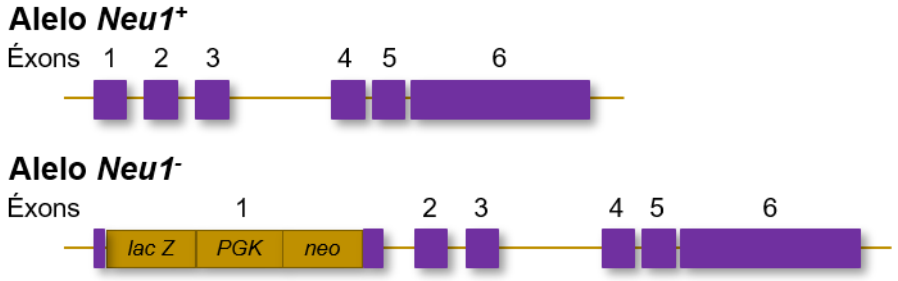

Figura 1: Representação dos alelos normal (*Neu1*$^{+}$) e nocauteado (*Neu1*$^{-}$) para neuraminidase 1. O alelo *Neu1*$^{-}$ possui uma sequência inativadora (lacZ-PGK-neo) inserida no éxon 1 (de Geest *et al*., 2002).

A principal alteração histológica observada na deficiência da Neu1 é a vacuolização do citoplasma de vários tipos celulares de pacientes e/ou modelo animal. Dentre as células acometidas estão fibroblastos, linfócitos, células de Kupffer, hepatócitos, células renais, neurônios, músculo cardíaco e esquelético (Lowden e O'Brien, 1979, de Geest *et al.*, 2002). A falha no controle da quantidade de ácido siálico ligado a diversas moléculas é um dos fatores da fisiopatogenia da sialidose (Hinek *et al.*, 2008, Yogalingam *et al.*, 2008). Além disso, a patogênese está correlacionada com a indução anormal de exocitose lisossomal. Normalmente, a Neu1 regula negativamente o processo de exocitose através da clivagem de ácidos siálicos na proteína associada à membrana do lisossomo 1 (LAMP-1) (Yogalingam *et al.*, 2008). Portanto, verifica-se uma correlação direta entre a gravidade da doença, a quantidade de LAMP-1 na superfície celular e a exocitose lisossomal.

Os camundongos *Neu1*$^{-/-}$ apresentam áreas de degeneração progressiva na musculatura esquelética com profunda alteração dos componentes da

matriz extracelular (Zanoteli *et al.*, 2010). Tais manifestações ocorrem principalmente após 2 meses de vida do animal, havendo intenso comprometimento aos 6 meses. Essas alterações histológicas nunca haviam sido descritas para a musculatura esquelética, sugerindo serem próprias da deficiência primária de Neu1 (Zanoteli *et al.*, 2010).

A musculatura esquelética dos camundongos *Neu1*$^{-/-}$ apresenta atrofia com causa ainda a ser esclarecida. Há evidências de que a Neu1 regula negativamente a atividade das catepsinas B e L (Yogalingam *et al.*, 2008) e é sabido que a atividade destas catepsinas está aumentada no músculo esquelético de camundongos com deficiência de Neu1 (Zanoteli *et al.*, 2010). Além disso, a deglicosilação de fibroblastos *in vitro* por administração de N-glicanase (neuraminidase de fonte exógena) confirmou que a catepsina B é um substrato natural da Neu1.

As catepsinas são as principais proteases encontradas no lúmen lisossomal, e são capazes de hidrolisar proteínas da estrutura muscular (Schwartz e Bird, 1977, Noda *et al.*, 1981, Bechet *et al.*, 2005). Nas atrofias musculares induzidas por septicemia, tratamentos com glicocorticoides, câncer, inatividade e privação alimentar, as catepsinas L, B e D, encontram-se com níveis aumentados (Bechet *et al.*, 2005). Contudo, ainda não foram determinados os efeitos decorrentes da modulação da sialilação de catepsinas na musculatura esquelética.

Além da atrofia, a musculatura esquelética dos camundongos *Neu1*$^{-/-}$ é progressivamente degenerada, com proliferação aumentada de fibroblastos do tecido conjuntivo adjacente às fibras musculares e síntese excessiva de colágeno (Zanoteli 2010). Este colágeno se deposita nos espaços endomisiais

e perimisiais, os quais se tornam aumentados, assim como a atividade de metaloproteinases (Zanoteli 2010). A atividade gelatinolítica observada na matriz extracelular resulta na degradação do colágeno, porém, também facilita a migração e invasão dos fibroblastos nas fibras musculares perifasciculares, as quais desenvolvem fragmentação do citoplasma e formação vacuolar (Zanoteli *et al.*, 2010) (**Figura 2**).

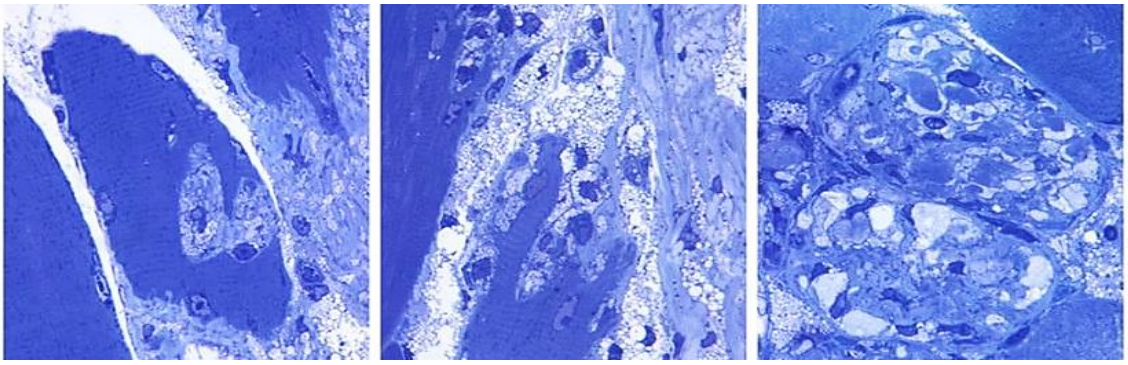

Figura 2: Degeneração da musculatura esquelética de camundongos *Neu1*$^{-/-}$. Da esquerda para a direita, as imagens apresentam a progressão da invasão das fibras musculares por fibroblastos (Zanoteli *et al*., 2010). Coloração por azul de toluidina, 60x.

O mecanismo responsável pelo aumento da proliferação dos fibroblastos na musculatura esquelética ainda não foi esclarecido, porém, um estudo prévio demonstrou que fibroblastos de pacientes com sialidose estimulados *in vitro* com o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF-2) ou com fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma BB (PDGF-BB) apresentaram maior proliferação em relação a fibroblastos humanos normais (Hinek *et al*., 2008, **Figura 3*Figura 1***). Contudo, quando a incubação com hormônios foi combinada ao tratamento com neuraminidase exógena análoga à Neu1, os respectivos receptores da membrana celular foram desialilados e os

fibroblastos de pacientes passaram a se proliferar em níveis normais (Hinek *et al.*, 2008).

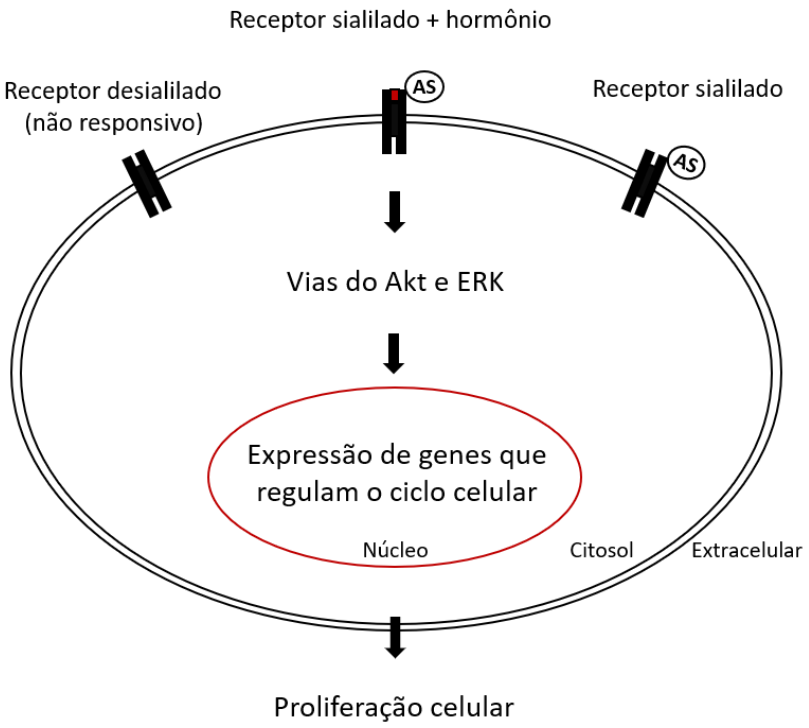

Figura 3: Envolvimento da desialilação dos receptores de IGF e PDGF na proliferação celular, segundo Hinek et al., 2008. Em condições normais, a Neu1 clivaria os ácidos siálicos (AS) de IGF-1R e PDGFR, reduzindo a responsividade dos hormônios mitogênicos IGF-2 e PDGF-BB, respectivamente.

Além de toda relevância para a regulação lisossomal, a Neu1 também atua na regulação da sinalização celular através da desialilação de receptores na membrana plasmática (Lukong *et al.*, 2001, Pshezhetsky e Hinek, 2011, Dridi *et al.*, 2013), sendo importante para a modulação das vias dos receptores de insulina (Blaise *et al.*, 2013, Dridi *et al.*, 2013), integrina β4 (Uemura *et al.*, 2009) PDGF-BB, IGF-1 (Hinek *et al.*, 2008), dentre outros.

1.2 Receptores de IGF-1R e de PDGFR

Os receptores de IGF (IGF-1R) e de PDGF (PDGFR) são proteínas transmembrana, cujas atividades desencadeiam cascatas bioquímicas com importância para a regulação da mitose, crescimento e diferenciação celular, bem como apoptose de células cancerosas (Kahan *et al.*, 2000, D'Andrea *et al.*, 2005). A interrupção destas cascatas, seja pela redução da quantidade do hormônio agonista ou pelo bloqueio do receptor, resulta na inibição do crescimento e da proliferação celular, afetando a via do Akt (Kahan *et al.*, 2000, D'Andrea *et al.*, 2005). Além de atuar na regulação destes receptores sialilados, estudos demonstram que o aumento da expressão da Neu1 pode reduzir o potencial metastático de melanomas e a capacidade invasiva em tumores intestinais (Kato *et al.*, 2001, Sawada *et al.*, 2002), e que a atividade da Neu1 inibe a via ERK1/2 e a expressão de metaloproteinases durante a metástase no câncer de cólon (Uemura *et al.*, 2009).

A família do IGF é composta por três receptores de superfície celular (IR - receptor de insulina, IGF-1R e IGF-2R), três substratos (insulina, IGF-1 e IGF-2) e sete proteínas de ligação a IGF (Adams *et al.*, 2000, Nakae *et al.*, 2001). O IR e o IGF-1R possuem alto grau de homologia, porém regulam processos fisiológicos distintos, como transporte de glicose e biossíntese de glicogênio e gordura (Patti e Kahn, 1998), e regulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular (Blakesley *et al.*, 1996, Girnita *et al.*, 2014), respectivamente.

O IGF-1R é uma proteína transmembrana de estrutura tetramérica sintetizada como um pró-receptor α-β de cadeia simples e sofre proteólise e glicosilação após sua tradução (Sepp-Lorenzino, 1998, Adams *et al.*, 2000). Em seguida, o IGF-1R se converte em duas subunidades extracelulares α e duas

β, sendo que o domínio β intracelular contém quinase (Sepp-Lorenzino, 1998, Girnita *et al.*, 2014). Após a ligação do substrato, a transdução do sinal de IGF-1R resulta em mudanças conformacionais do receptor e na sua autofosforilação (Girnita *et al.*, 2014). Quando a autofosforilação está ativa, a tirosina quinase do IGF-1R conduz a cascatas bioquímicas que promovem a sobrevivência e a proliferação celular (Hubbard e Till, 2000, Kooijman, 2006).

A expressão aumentada de IGF-1R, IGF-1 e/ou IGF-2 foi observada no câncer de mama, da próstata, do trato gastrointestinal, de ovário, dentre outros (revisado por Samani *et al.* (2007)). Estudos pré-clínicos demonstraram que a inibição do IGF-1R seria benéfica para o tratamento do câncer (Girnita *et al.*, 2000, Vasilcanu *et al.*, 2006, Yin *et al.*, 2010). Pesquisas *in vivo* e *in vitro* utilizando anticorpos para IGF-1R, inibidores de moléculas pequenas e metodologia *antisense* mostraram que o IGF-1R é imprescindível para o crescimento e proliferação de células tumorais (Baserga, 2005, Tornkvist *et al.*, 2008) e que sua inibição reduziu o tamanho de tumores (Hartog *et al.*, 2007, Feng e Dimitrov, 2008, Hewish *et al.*, 2009).

O mecanismo de inibidores da quinase do IGF-1R ocorre principalmente pela ligação em sítios altamente conservados do domínio catalítico do IGF-1R, competindo com o ATP necessário à autofosforilação (Li *et al.*, 2009). Os inibidores de tirosina quinases que atuam no IGF-1R escolhidos para a condução deste estudo foram o OSI-906 e o PQ401.

O OSI-906, pertencente à classe das moléculas pequenas, inibe a autofosforilação do IGF1-R e do IR. Além disso, o OSI-906 impede a ativação de cascatas bioquímicas dependentes da autofosforilação resultante da ligação

com substrato, incluindo a fosforilação do Akt, do ERK1/2 e do p70S6K (Mulvihill *et al.*, 2009).

O PQ401 é considerado um potente inibidor da sinalização de IGF-1R, também capaz de inibir a ligação entre o IGF-1R e o ATP (Pargellis *et al.*, 2002). Células MCF-7 tratadas com PQ401 tiveram redução na sinalização mediada por IGF-1, associada com a apoptose mediada por caspase induzida pela via do Akt (Gable *et al.*, 2006). Por sua vez, o tratamento com PQ401 *in* vivo reduziu a taxa de crescimento de células MCNeuA implantadas em camundongos (Gable *et al.*, 2006).

O receptor de PDGF (PGFR) possui duas isoformas (α e β), que se combinam em três possibilidades: αα, ββ e αβ (Bonten *et al.*, 1996, Magesh *et al.*, 2006). Os substratos destes receptores são o PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD e PDGF-AB (Rusciani *et al.*, 2010, Bonten *et al.*, 2014), os quais atuam em processos biológicos diferentes (Blaise *et al.*, 2013). Os receptores α e β são semelhantes estruturalmente e ativam vias de sinalização do Akt, ERK 1/2, quinases Src e fosfolipases Cγ (Maurice *et al.*, 2016). Apesar de atuarem sobre vias semelhantes, os receptores de PDGF possuem atividade distinta: a estimulação de PDGFRα inibe a quimiotaxia de fibroblastos e células musculares lisas, enquanto, a ativação de PDGFRβ estimula a quimiotaxia de fibroblastos (Duca *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2014). Além disso, a via do PDGFR está profundamente relacionada com a regulação da proliferação e migração celular e síntese da matriz extracelular (MEC), atuando, portanto, sobre a remodelação de tecidos e a fibrose (Maurice *et al.*, 2016).

Os inibidores de PDGFR escolhidos para a condução deste estudo foram o JNJ-10198409 e o mesilato de imatinibe. O JNJ-10198409 é um agente

antiproliferativo inibidor de células tumorais e antiangiogênico competidor do ATP da tirosina quinase do PDGFR (D'Andrea *et al.*, 2005, Ho *et al.*, 2005), sendo comprovadamente inibidor da progressão de tumores em modelos de estudo de tumores de cólon humano (Waltenberger *et al.*, 1999). De modo semelhante, o mesilato de imatinibe também pertence à classe das moléculas pequenas que inibem a tirosina quinase, consequentemente a autofosforilação do PDGFR, da oncoproteína c-Alb e receptores c-kit (Druker, 2003, Distler e Distler, 2008), desenvolvendo propriedades anticâncer (Druker *et al.*, 2001) e antifibróticas (Abdollahi *et al.*, 2005, Yoshiji *et al.*, 2005, Distler *et al.*, 2007).

1.3 Hipótese do estudo

Considerando **1)** que o quadro de degeneração da musculatura esquelética de camundongos *Neu1*$^{-/-}$ compreende uma série de eventos, incluindo a proliferação e atividade aumentadas de fibroblastos do tecido conjuntivo e a maior atividade de catepsina B (Zanoteli *et al.*, 2010); **2)** as atividades de IGF-1R e PDGFR são indevidamente reguladas em fibroblastos humanos com deficiência de Neu1 (Hinek *et al.*, 2008) e **3)** as evidências de que a Neu1 regula negativamente a atividade da catepsina B (Yogalingam *et al.*, 2008), a hipótese deste estudo é que o aumento da atividade de receptores de IGF e PDGF e/ou de catepsina B poderia (m) contribuir para a degeneração da musculatura esquelética (**Figura 4**).

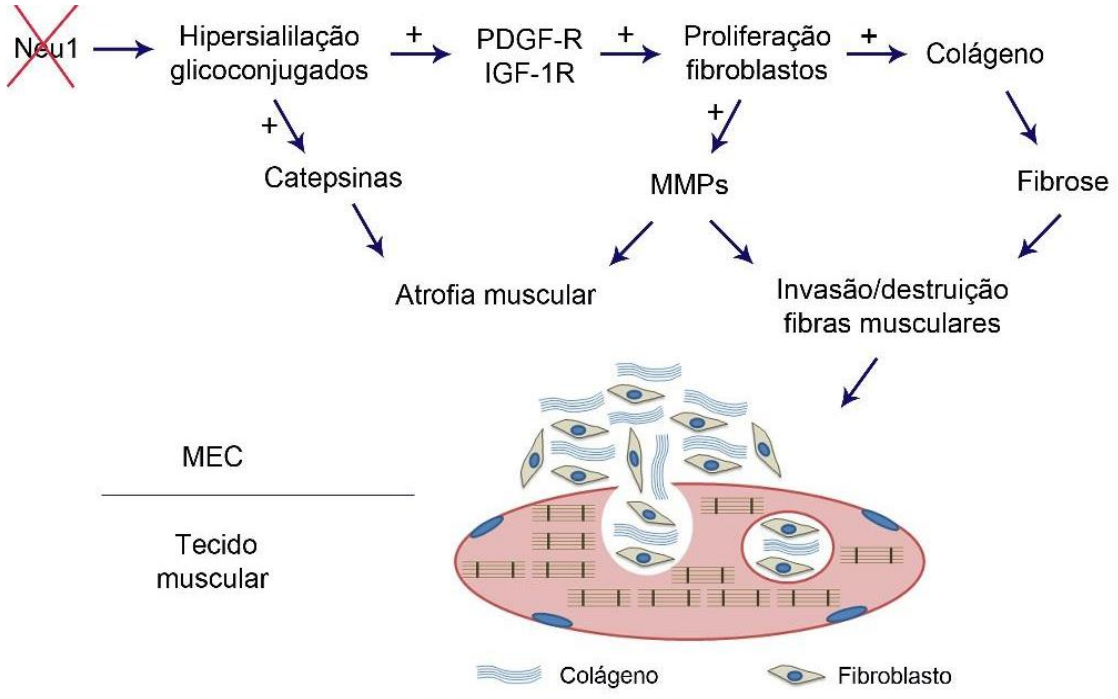

Figura 4: Hipótese dos efeitos da deficiência da neuraminidase 1 sobre a degeneração da musculatura esquelética de camundongos. MEC - matriz extracelular; MMPs – metaloproteinases de matriz.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Identificar se o fenótipo da musculatura esquelética de camundongos *Neu1*$^{-/-}$ pode estar associado à atividade do IGF-1R, PDGFR e/ou à sialilação de catepsina B ou L.

2.2 Objetivos específicos

Analisar em músculos e fibroblastos de camundongos controle *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ não tratados ou *Neu1*$^{-/-}$ tratados com inibidores de IGF-1R ou de PDGFR os parâmetros a seguir:

1) Expressão de Akt e ERK (formas totais e fosforiladas);

2) Proliferação celular;

3) Expressão de catepsina B e L.

Adicionalmente, verificar expressão e a atividade de catepsina B e L nas frações lisossomal e citosólica após tratamento *in vitro* de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ com neuraminidase exógena.

3 Métodos

3.1 Animais

Camundongos heterozigotos para a deficiência de 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, 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; **Figura 5**) foram utilizados nos experimentos com n_{total}=90, sendo 10 em padronizações, 20 para coleta de fibroblastos e abordagens *in vitro* e 60 para procedimentos *in vivo*. Com o intuito de reduzir o descarte de material biológico inutilizado, os machos foram destinados para a experimentação *in vivo* e as fêmeas para a experimentação *in vitro*. Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FMUSP (protocolo 526/13) e 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). O estudo foi conduzido no Laboratório de Investigação Médica 45 (LIM45) da FMUSP.

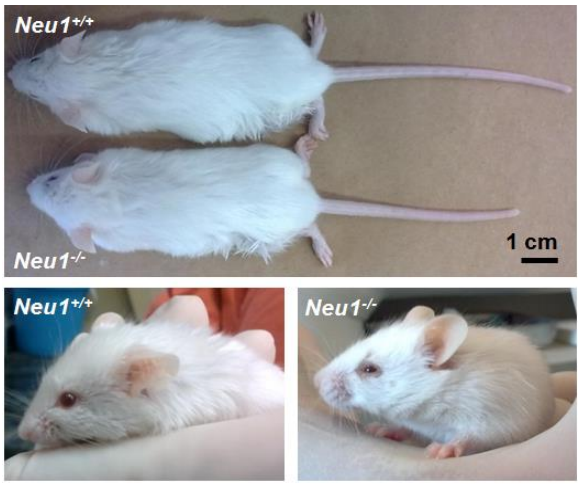

Figura 5: Camundongos utilizados no estudo. O fenótipo apresentado corresponde a camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ com 60 dias de idade. Os animais nocautes são menores e apresentam hiperqueratose ao redor dos olhos.

3.2 Genotipagem

O DNA para genotipagem dos camundongos foi extraído de um fragmento da cauda incubado em solução de lise (Tris 1M pH 7,5; NaCl 5M; EDTA 0,5M; SDS 20% e proteinase K 0,2 mg/mL) durante 1 hora a 60ºC. O DNA foi submetido à PCR multiplex utilizando GoTaq Green Mastermix (Promega, M7122), 200ng de DNA e 240nM de cada oligonucleotídeo (**Tabela 1**). A reação consistiu de uma etapa inicial de 98ºC por 3 minutos; 35 ciclos de 98ºC por 30 segundos, 70ºC por 30 segundos e 72ºC por 90 segundos; e uma etapa final de 72ºC por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio e fotografados em transiluminador sob luz ultravioleta (**Figura 6**).

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

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

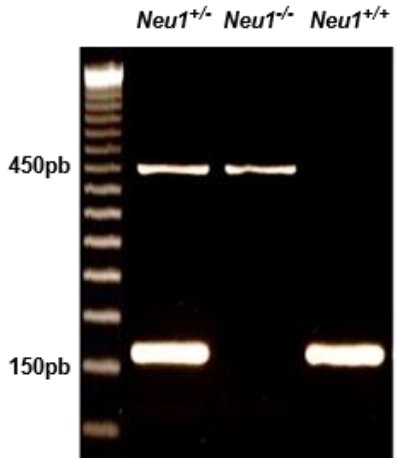

Figura 6: Representação dos resultados da genotipagem de um camundongo heterozigoto (*Neu1*$^{+/-}$), um nocaute (*Neu1*$^{-/-}$) e um normal (*Neu1*$^{+/+}$) para o gene *Neu1*. Os fragmentos amplificados na PCR multiplex apresentaram 450 e 160pb. Apenas camundongos homozigotos foram utilizados nos experimentos, enquanto os heterozigotos destinaram-se exclusivamente para a formação de casais.

3.3 Procedimentos *in vivo*

Os camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ utilizados nos procedimentos *in vivo* (n_{total}=60 machos) foram divididos em cinco grupos experimentais (**Figura 7**) e manejados conforme dados da **Tabela 2**. O grupo controle foi apenas pesado periodicamente e não recebeu veículos para evitar a inclusão de uma quantidade excessiva de camundongos ao estudo, pois cada inibidor possuía seu próprio veículo. Os animais tratados receberam inibidores de IGF-1R (OSI-

906 e PQ401) ou de PDGFR (JNJ-10198409 e mesilato de imatinibe) via gavagem ou injeção intraperitoneal três vezes por semana, durante quatro semanas (12 aplicações). Os animais foram pesados a cada administração dos inibidores e na data da eutanásia (dia em que aconteceria a 13ª administração). Após as eutanásias, os músculos tibiais anteriores e gastrocnêmios foram dissecados, pesados, congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e estocados a -80ºC até o momento das análises.

Os experimentos foram iniciados quando os camundongos completaram 1 mês de idade, início da vida adulta e fase ainda pré-sintomática para manifestações decorrentes da deficiência de neuraminidase 1 (de Geest *et al.*, 2002, Zanoteli *et al.*, 2010). Os inibidores OSI-906, PQ401 e JNJ-10198409 foram administrados seguindo parâmetros previamente publicados (D'Andrea *et al.*, 2005, McKinley *et al.*, 2011, Troib *et al.*, 2011). A dose inicialmente escolhida para tratamento com mesilato de imatinibe constava em Akhmetshina *et al.* (2009), porém foi reduzida por ter sido letal aos camundongos *Neu1*$^{-/-}$.

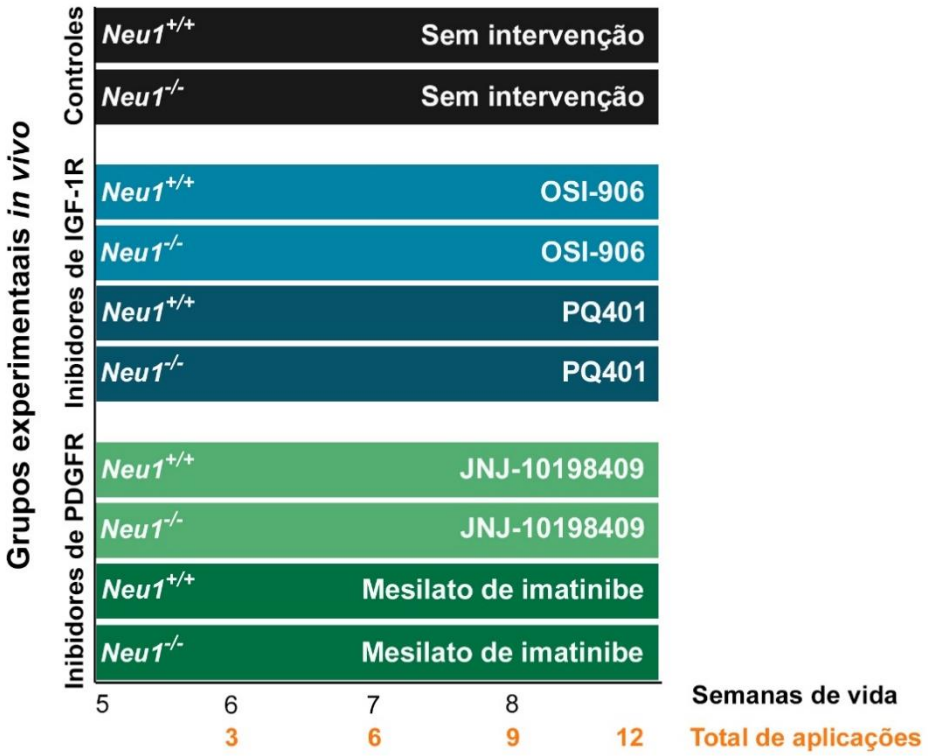

Figura 7: Desenho experimental do estudo *in vivo*. O grupo controle foi apenas pesado, enquanto os tratados receberam 12 administrações de inibidores de IGF-1R (OSI-906 e PQ401) ou de PDGFR (JNJ-10198409 e mesilato de imatinibe) entre 1 e 2 meses de idade. Após este período, os animais foram eutanasiados, os tecidos coletados e estocados para análises. N=5 animais por genótipo para cada tratamento.

Tabela 2: Detalhamento dos grupos experimentais do estudo. As doses, veículos e vias de administração de inibidores de IGF-1R (OSI-906 e PQ401) ou PDGFR (JNJ-10198409 e mesilato de imatinibe) estão descritas para os grupos tratados, além da quantidade camundongos presentes em cada grupo e genótipo. Dos 60 camundongos utilizados em abordagens *in vivo*, 6 não sobreviveram aos tratamentos e seus dados parciais foram desconsiderados nas análises.

Grupos	**Dose e veículo**	**Via**	***Neu1$^{+/+}$***	***Neu1$^{-/-}$***
Controle	-	-	7	7
OSI-906 (LC Laboratories, L – 5814)	60mg/kg Ácido tartárico 25mM	Gavagem	5	5
PQ401 (Adooq Biosciences, A11951)	50mg/kg 8% etanol, 8% Tween 80	Intraperitoneal	5 + 1 óbito	5
JNJ-10198409 (LC Laboratories, J – 4567)	50mg/kg Polietilenoglicol 400	Gavagem	5 + 1 óbito	5
Mesilato de imatinibe (LC Laboratories, I – 5508)	100mg/kg PBS	Intraperitoneal	5 + 1 óbito	5 + 3 óbitos
		Total de camundongos:	*30*	*30*

3.4 Seccionamento histológico, colorações e medição de área das fibras

Os músculos tibiais anteriores foram montados em cortiça com meio de suporte *Tissue-Tek OCT Compound* (Sakura, 4583) e seccionados transversalmente (espessura de 7µm) em criostato Leica CM3000 a -30ºC. 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. As secções coradas foram fotografadas no microscópio Olympus AX70 em aumento de 20x. O programa ImageJ (NIH) foi utilizado para estabelecer uma escala de conversão de micrômetros em *pixels* a partir da foto de uma régua com medida conhecida, também fotografada com mesmo aumento. A área transversa de cada fibra muscular foi calculada de modo semiautomático no programa Photoshop CS6 (Adobe), com base na escala anteriormente obtida. As áreas das fibras foram mensuradas em 3 regiões diferentes do músculo (mínimo de 200 fibras por animal).

3.5 Procedimentos *in vitro*

3.5.1 Cultura primária de fibroblastos

Fragmentos de pele de fêmeas *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ (n=10 por genótipo) não submetidas a tratamentos 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 37ºC. 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 colagenase tipo I 1000U/mL (Worthington Biochemical, LS004196) durante 1 hora em banho úmido a 37ºC (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 colagenase. O lisado foi vortexado vigorosamente e centrifugado durante 10 minutos a 150g e 4ºC. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspendido em 5mL de meio D20, centrifugado a 150g e 4ºC por 5 minutos e novamente ressuspendido em meio D20. Os fibroblastos foram semeados em placas de 100mm com meio D20 e mantidos em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. 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.

3.5.2 Viabilidade celular

Para verificar a viabilidade de fibroblastos tratados com os inibidores de IGF-1R ou PDGFR, 1 x 10^3 fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ (n=3 por genótipo, P3 ou P4) foram semeados em placas de 96 poços, em triplicata para cada condição a ser analisada, com meio D10 e incubadas em estufa a 37ºC e 5%

de CO_2 por 48 horas para adesão. Em seguida, esses fibroblastos foram privados de soro fetal bovino *overnight* em meio D0 e incubados em D0 contendo BSA 0,1% na ausência ou presença dos inibidores nas concentrações de 0,01µM, 0,1µM, 1µM ou 10µM ($[DMSO]_{final}$= 0,1%), por 72 horas (duração do experimento **3.5.4 Estudo de proliferação**). Foi incluído também um controle sem células (branco) para identificar possíveis artefatos de cor dos reagentes utilizados. Os meios contendo os inibidores foram substituídos por brometo de tiazolil azul de tetrazólio 0,5mg/mL (MTT, Sigma-Aldrich, M5655) dissolvido em meio RPMI-1640 incolor por 3 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C. O MTT foi descartado e incubado em isopropanol acidificado com HCl (0,04N) durante 15 minutos em temperatura ambiente, sob agitação e proteção da luz. A absorbância das amostras foi medida no comprimento de onda de 570nm no espectrofotômetro Synergy HT (BioTek).

A média dos valores dos brancos foi subtraída da média de cada triplicata e a viabilidade celular foi calculada como percentual da absorbância das amostras incubadas apenas com veículo (do respectivo genótipo). Os percentuais de viabilidade foram classificados nos níveis de citotoxicidade extremo, muito alto, alto, moderado e baixo ou nulo (**Figura 8**). As concentrações de inibidor que levaram à toxicidade extrema, muito alta ou baixa/nula foram desconsideradas. A concentração de inibidor escolhida para a condução dos experimentos foi a que manteve a viabilidade celular de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ entre 50% e 60% (citotoxicidade entre alta e moderada) e uma viabilidade mínima de 40% de fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$.

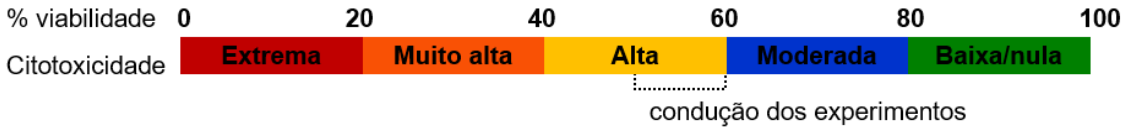

Figura 8: Classificação dos níveis de citotoxicidade dos inibidores utilizados no estudo, com base nos percentuais de viabilidade celular após tratamentos durante 72 horas. A viabilidade das amostras incubadas com MTT foi obtida por leitura de absorbância (570nm). Os experimentos foram conduzidos em concentrações de inibidores que mantiveram entre 50 e 60% da viabilidade celular em fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$.

3.5.3 Estimulação e inibição de IGF-1R e PDGFR

Fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ (n=5 por genótipo, P3 ou P4) foram semeados em densidade de 50 x 10^4 células por placa de 100mm com meio D10, mantidos nestas condições por 48 horas e privados de soro fetal em meio D0 *overnight* em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. O meio foi desprezado e os fibroblastos foram incubados em:

1) Controles: D0 por 1 hora com adição de IGF-1 100ng/mL ou PDGF-BB 10ng/mL por 30 minutos (Sigma-Aldrich, I8779 e SRP3229);

2) Tratados: D0 na presença de inibidores de IGF-1R ou PDGFR por 1 hora e adição de IGF-1 100ng/mL ou PDGF-BB 10ng/mL nos 30 minutos seguintes.

Todas as incubações continham BSA 0,1% e DMSO 0,1%.

3.5.4 Estudo de proliferação

Fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ (n=5 por genótipo, P3) foram semeados com densidade de 1 x 10^4 células sobre lamínulas tratadas com poli-D-lisina em placas de 24 poços e meio D10 em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Após 24

horas, as células foram privadas de soro fetal em meio D0 *overnight*. O meio foi desprezado e o experimento de proliferação foi conduzido por 72 horas nas seguintes condições:

1) Controles: 2 horas em meio D0 com adição de IGF-1 100ng/mL ou PDGF-BB 10ng/mL pelas próximas 70 horas;

2) Tratados: 2 horas em meio D0 e inibidores de IGF-1R ou PDGFR, com adição de IGF-1 100ng/mL ou PDGF-BB 10ng/mL pelas 70 horas seguintes.

Todas as incubações continham BSA 0,5% e DMSO 0,1%.

As lamínulas contendo fibroblastos foram montadas em lâminas e coradas com meio DAPI (Vector Laboratories, H-1200). Todos os campos foram fotografados a 20x no microscópio Olympus AX70 e os núcleos foram contabilizados utilizando a ferramenta de contagem automática do programa Image J (NIH).

3.5.5 Desialilação

Fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ semeados para imunofluorescência ou para o experimento de separação das frações citosólica e lisossomal (itens **3.6** e **3.7**) foram privados de soro fetal em meio D0 *overnight*, incubados em meio D10 contendo 50mU/mL de neuraminidase de *Clostridium perfringens* (Sigma-Aldrich, N2876) durante 24 horas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. A neuraminidase utilizada atua nos mesmos sítios de clivagem da neuraminidase 1 endógena. As células foram coletadas ou processadas de acordo com os itens **3.6** e **3.7**.

3.6 Imunofluorescência

Para a imunocitoquímica, 2 x 10^3 fibroblastos (n=3 por genótipo, P3) foram semeados com meio D10 sobre lamínulas tratadas poli-D-lisina em placa de 48 poços. Após a desialilação (item **3.5.5**), foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos, lavadas em PBS e fixadas em metanol por 15 minutos a -20ºC. Em seguida, foram permeabilizadas em Triton-X 2% por 20 minutos, bloqueadas em BSA 1% e soro normal 10% (Vector Laboratories, S-1000) e incubadas em anticorpo primário (**Tabela 3**) *overnight* a 4ºC. Após novo bloqueio por 10 minutos, o anticorpo secundário foi incubado em temperatura ambiente por 1 hora. As lamínulas foram montadas em meio de montagem com DAPI (Vector Laboratories, H-1200).

Tabela 3: Anticorpos utilizados no estudo para imunofluorescência.

Anticorpos	**Marca e código**	**Hospedeiro e clone**	**Diluição**
Anti-Catepsina B	Cell Signaling, 31718	Coelho, D1C7Y	1: 200
Anti-LAMP-1	Abcam, ab25245	Rato, 1D4B	1: 600
Anti-coelho (Alexa Fluor 488)	Cell Signaling, 4412	Cabra	1: 500
Anti-rato (Alexa Fluor 594)	Abcam, ab150160	Cabra	1: 500

3.7 Separação das frações citosólica e lisossomal

As frações citosólica e lisossomal de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ (não tratados ou tratados com neuraminidase segundo o item **3.5.5**) e *Neu1*$^{+/+}$ foram separadas utilizando o *Lysosome Isolation Kit* (Sigma-Aldrich, LYSISO1), sendo 2 x 10^8 fibroblastos por amostra (n=1, P3). As células foram lisadas por maceração na

presença de *Extraction Buffer* e centrifugadas a 1000g por 10 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 16100g por 25 minutos. A fração citosólica presente no sobrenadante desta centrifugação (Song *et al.*, 2017) foi coletada e o *pellet* contendo a fração lisossomal foi ressuspendido em 400µL de *Extraction Buffer*.

3.8 Atividade das catepsinas B e L

A atividade das catepsinas B e L foi quantificada nas frações citosólicas e lisossomais em placas de 96 poços pretas com fundo preto, em duplicatas, sendo 50µg de proteínas por replicata. Foi incluído um controle sem amostra (branco) para descontar possíveis emissões de fluorescência com origem inespecífica. A cada replicata foram adicionados 50µL do *Reaction Buffer* e 2µL do substrato fluorescente pertinente (integram os kits da Abcam ab65300 e ab65306), incubados protegidos da luz a 37ºC por 2 horas. A fluorimetria foi conduzida no equipamento FilterMax F5 Multi-mode Microplate Reader (Molecular Devices) com excitação a 400nm e emissão a 505nm.

3.9 Extração de proteínas

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 4ºC. Para a extração de proteínas de tecidos, os músculos GA foram macerados em tampão RIPA (300µl de tampão RIPA para cada 5mg de tecido) e incubados em gelo por 30 minutos. Os lisados celulares e musculares foram centrifugados a 16000g por 20 minutos a 4ºC, 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 *Western blotting*

Para a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram utilizados 10µg de proteínas provenientes de células ou 50µg de proteínas de tecidos (n=5 de cada grupo para cada genótipo), acrescidos de tampão de corrida e β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 95ºC por 5 minutos, mantidas no gelo pelo mesmo tempo, aplicadas nos géis (concentração de 8, 10 ou 12%) e submetidas à eletroforese a 100V por 1:30 hora. As proteínas foram transferidas a 50V por 45 minutos ou 1:30 hora para uma membrana de PVDF com poro de 0,2µm e posteriormente bloqueadas em BSA 5% durante 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas *overnight* a 4ºC com os anticorpos primários (**Tabela 4**). Após três

lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (**Tabela 4**) por 2 horas em temperatura ambiente, lavadas com TBS-T duas vezes por 10 minutos e uma com TBS por 10 minutos. Por fim, foram expostas ao substrato quimioluminescente Immobilon Western para HRP (Merck Millipore) durante 3 minutos e reveladas no equipamento C-Digit Blot Scanner (Licor) por 6 minutos. A densitometria das bandas obtidas foi calculada utilizando o programa ImageJ (NIH). A homogeneidade das amostras foi obtida pela coloração das membranas com azul de Coomassie 0,08%, seguida pela digitalização e análise no programa Image J.

Tabela 4: Anticorpos utilizados nos experimentos de *western blotting*.

Anticorpos	**Marca e código**	**Hospedeiro e clone**	**Diluição**
Anti-Akt	Cell Signaling, 4691	Coelho, C67E7	1: 500
Anti-pAkt (S473)	Cell Signaling, 4060	Coelho, D9E	1: 500
Anti-Catepsina B	Cell Signaling, 31718	Coelho, D1C7Y	1: 2 000
Anti-Catepsina L	Sigma-Aldrich, C2970	Camundongo, 33/2	1: 1 000
Anti-ERK	Cell Signaling, 4695	Coelho, 137F5	1: 500
Anti-pERK (T202/Y204)	Cell Signaling, 4377	Coelho, 197G2	1: 500
Anti-LAMP-1	Abcam, ab25245	Rato, 1D4B	1: 1 000
Anti-PCNA	Cell Signaling, 13110	Coelho, D3H8P	1: 500
Anti-camundongo HRP	Rockland, 6101319	Cabra	1: 10 000
Anti-coelho HRP	Abcam, ab97051	Cabra	1: 20 000
Anti-rato HRP	Abcam, ab97057	Cabra	1: 20 000

3.11 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk para a escolha do teste estatístico apropriado. Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um P menor ou igual a 0,05. A análise estatística foi feita no programa Prism 7 (GraphPad Software).

4 Resultados

4.1 Tratamentos *in vivo* e *in vitro* com inibidores de IGF-1R e PDGFR

4.1.1 Peso corporal e muscular

O peso dos camundongos *Neu1*$^{+/+}$ foi maior do que o peso dos *Neu1*$^{-/-}$ em todos os períodos e grupos analisados (**Figura 9**). Porém, os grupos do genótipo *Neu1*$^{-/-}$ apresentaram maior ganho de peso ao longo do estudo.

Na data da eutanásia, apenas o peso corporal do grupo PQ401 *Neu1*$^{+/+}$ diferiu dos controles deste genótipo (**Figura 10A**). O peso do grupo PQ401 *Neu1*$^{-/-}$ também foi mais elevado do que o dos controles *Neu1*$^{-/-}$, assim como o do grupo mesilato de imatinibe *Neu1*$^{-/-}$. Entretanto, o grupo mesilato de imatinibe *Neu1*$^{-/-}$ já iniciou os experimentos com peso superior ao controle (P=0,006), enquanto os grupos PQ401 não apresentavam diferenças (P=0,076 em *Neu1*$^{+/+}$ e P= 0,135 em *Neu1*$^{-/-}$).

Assim como no peso corporal, o peso dos músculos gastrocnêmios e tibiais anteriores foi maior nos camundongos *Neu1*$^{+/+}$ em todos os grupos analisados (**Figura 10B**). Os músculos tibiais anteriores do grupo PQ401 *Neu1*$^{+/+}$ foram os únicos que tiveram alteração de peso, com aumento em relação aos controles não tratados (**Figura 10C**).

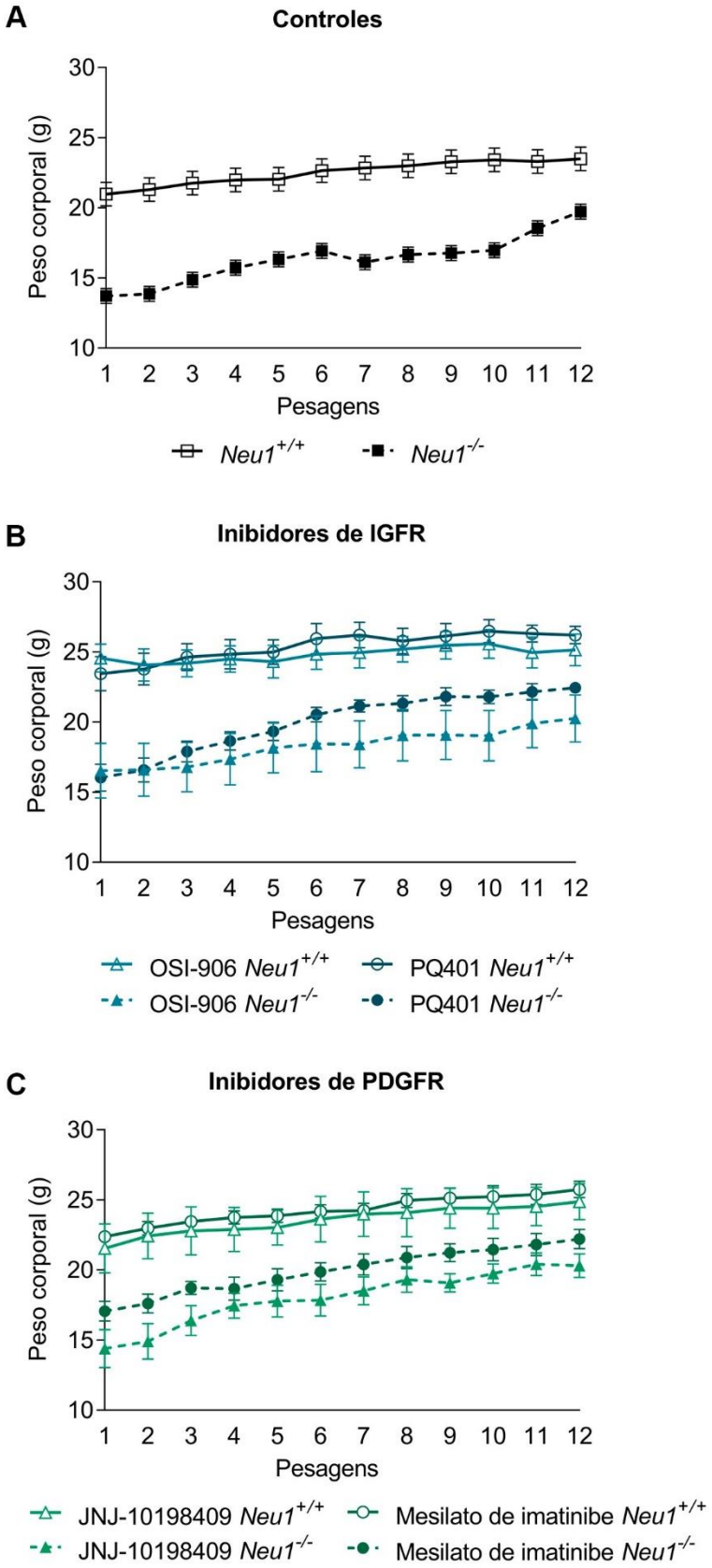

Figura 9: Progressão do peso corporal de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ durante o estudo e na data da eutanásia. Os camundongos controles (**A**) foram pesados em 12 momentos diferentes entre o primeiro e o segundo mês de vida; os demais foram pesados e tratados com inibidores de IGF-1R (**B**) ou de PDGFR (**C**).

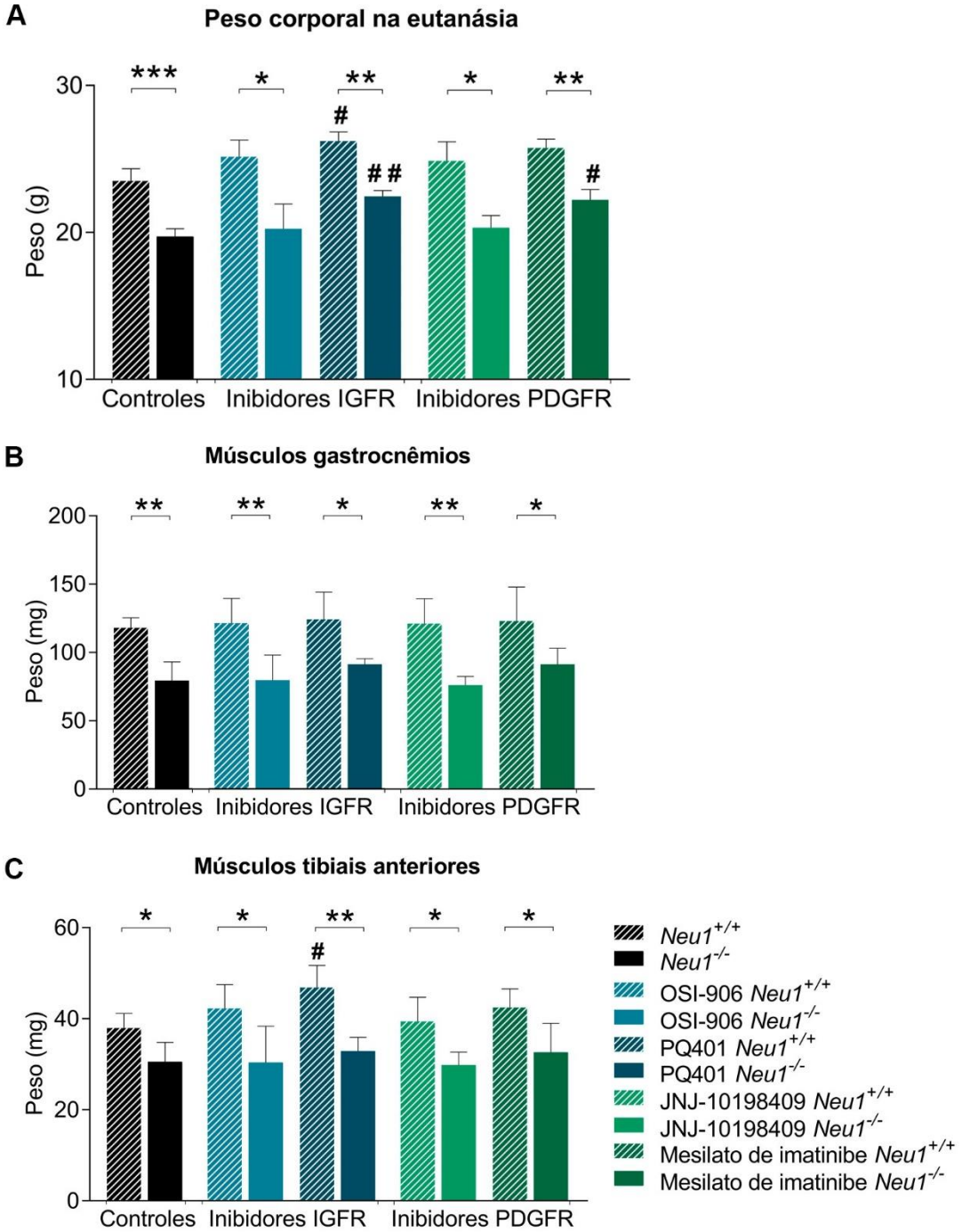

Figura 10: Peso dos animais (**A**), músculos gastrocnêmios (**B**) e tibiais anteriores (**C**) de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ na data da eutanásia dos grupos controle, tratados com inibidores de IGF-1R ou de PDGFR. Teste de t para amostras independentes, média ± desvio padrão. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 indicam diferenças entre genótipos; # P<0,05 e # # P<0,01 indicam diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

4.1.2 Aspecto histológico geral

Os grupos *Neu1*$^{+/+}$ não presentaram alterações histológicas, porém todos os grupos *Neu1*$^{-/-}$ tiveram algumas regiões com maior presença de fibroblastos, inclusive com formações fibróticas e invasão de fibras musculares (**Figura 11**). No entanto, os espaços endomisiais e perimisiais estiveram majoritariamente preservados em todos os animais analisados. Os inibidores não pareceram interferir com o aspecto histológico geral dos camundongos analisados.

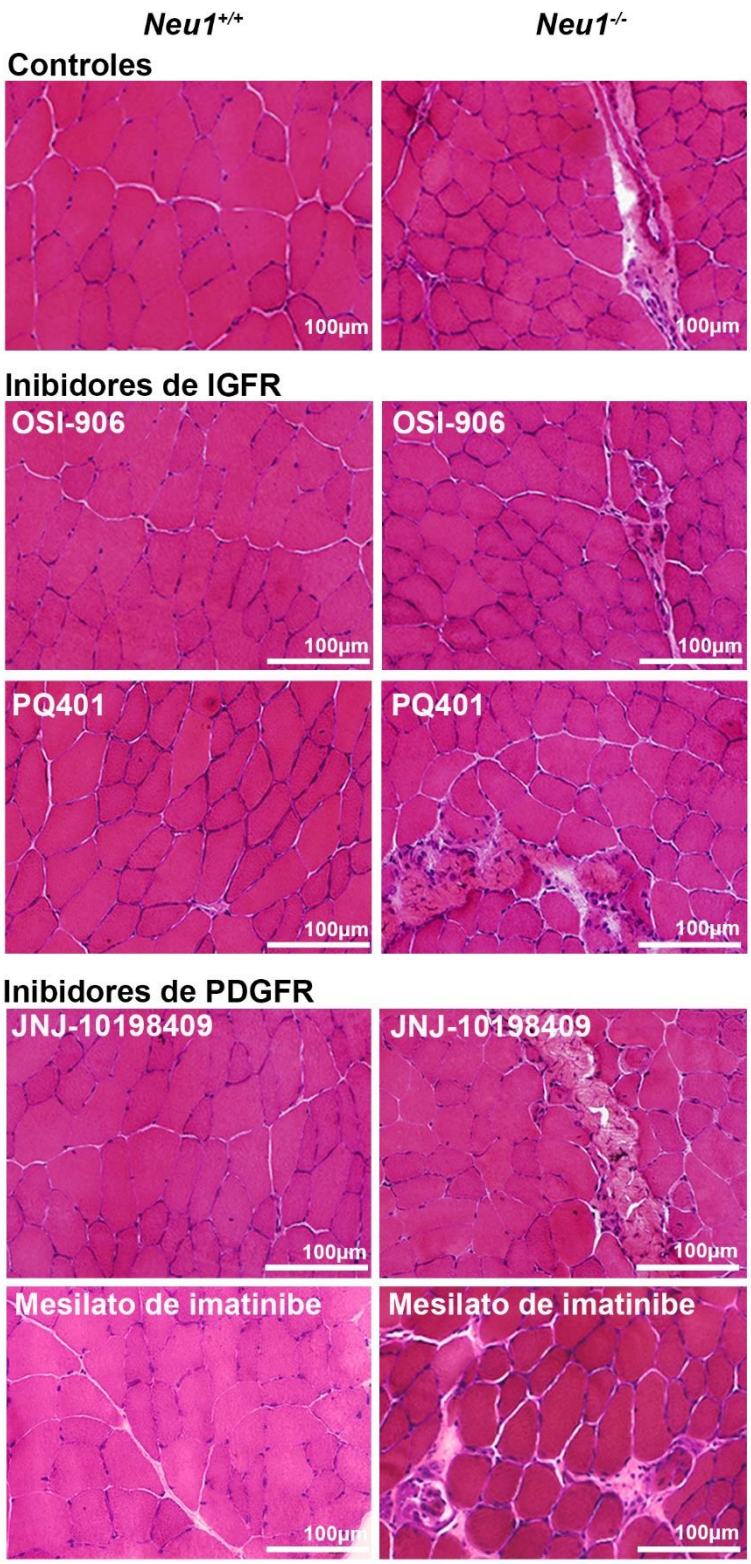

Figura 11: Aspecto geral de músculos tibiais anteriores de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ controles, tratados com inibidores de IGF-1R ou de PDGFR. Coloração com hematoxilina e eosina, aumento de 20x.

4.1.3 Área das fibras

A área das fibras musculares dos grupos *Neu1*$^{+/+}$ diferiram das áreas dos *Neu1*$^{-/-}$ nos grupos controle, PQ401 e mesilato de imatinibe (**Figura 12**). Em ambos os genótipos, houve aumento da área das fibras nos grupos tratados com PQ401 e JNJ-10198409 quando comparados com os controles não tratados.

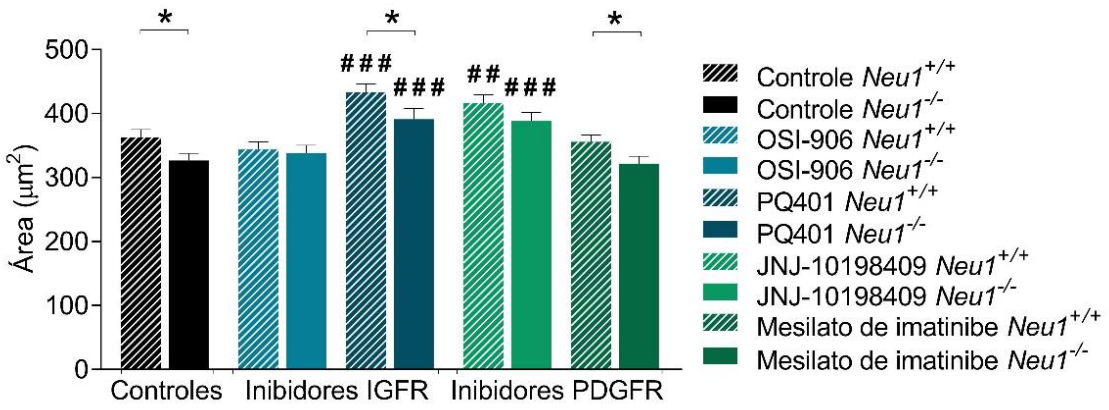

Figura 12: Área das fibras de músculos tibiais anteriores de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ controles, tratados com inibidores de IGF-1R ou de PDGFR. Teste de t para amostras independentes, média ± desvio padrão. * P<0,05 indica diferenças entre genótipos; # # P<0,01 e # # # P<0,001 indicam diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

4.1.4 Determinação das concentrações de inibidores para estudos *in vitro*

De acordo com os dados obtidos, as concentrações 0,1µM de OSI-906, 1µM de PQ401, 0,1µM de JNJ-10198409 e 1µM de mesilato de imatinibe foram as que mantiveram a viabilidade de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ entre 50 e 60% (**Figura 13**) e não reduziram a de fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ abaixo de 40% (dados não

apresentados). Portanto, estas foram as concentrações escolhidas para a condução dos estudos *in vitro*.

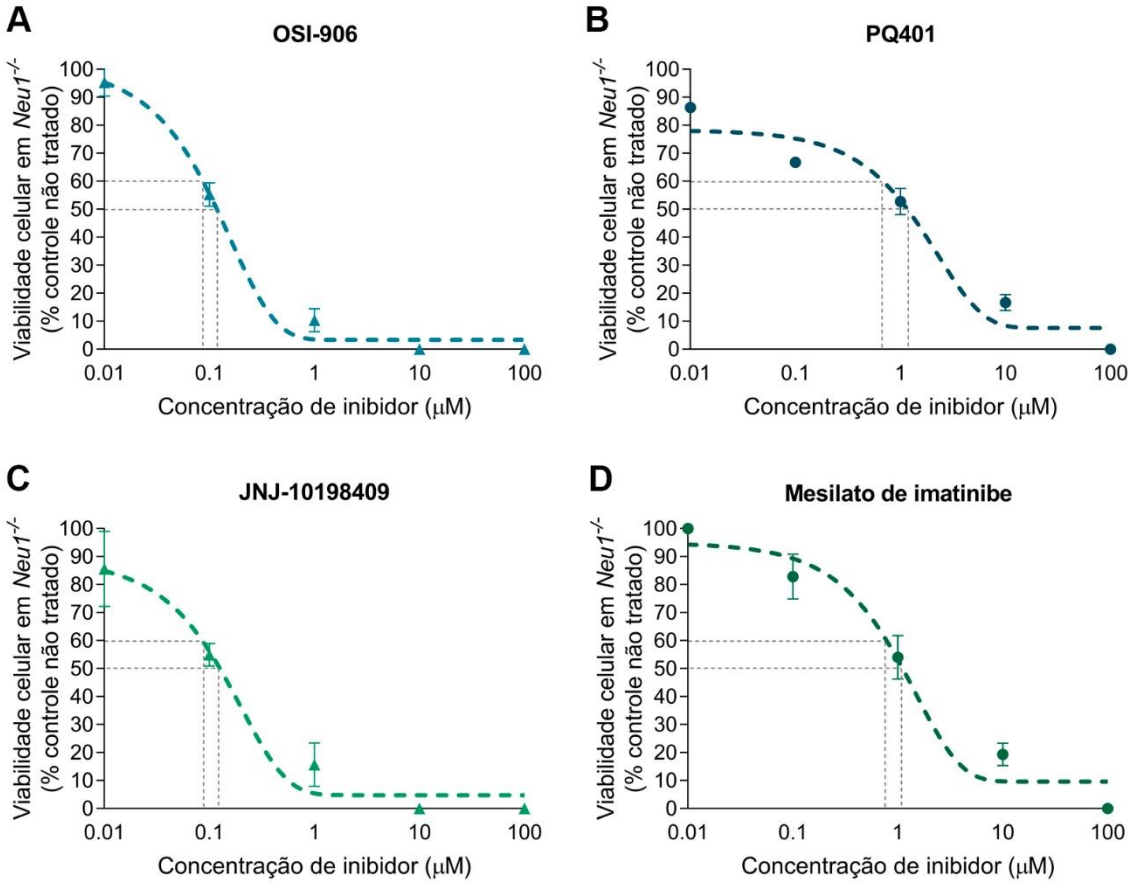

Figura 13: Percentual de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ viáveis após incubação por 72 horas em diferentes concentrações de inibidores de IGF-1R (**A** e **B**) ou PDGFR (**C** e **D**). As concentrações de inibidores escolhidas para utilização no estudo *in vitro* foram aquelas que mantiveram a viabilidade entre 50 e 60%. Média ± desvio padrão.

4.1.5 Marcadores de vias moleculares

As formas totais de Akt e ERK não apresentaram diferenças de expressão entre genótipos nos grupos controle ou não tratados, exceto a expressão de ERK de músculos *Neu1*$^{-/-}$ controle comparados com os tratados com JNJ-10198409 do mesmo genótipo (**Figuras 14** a **17**). A expressão de pAkt nos músculos *Neu1*$^{+/+}$ do grupo controle foi maior do que a dos músculos *Neu1*$^{-/-}$ *in*

vivo, porém foi menor do que nos fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ tratados com IGF-1. Os tratamentos com os inibidores OSI-906, PQ401, JNJ101-98409 e mesilato de imatinibe *in vivo* causaram aumento da expressão de pAkt, enquanto os inibidores OSI-906 e mesilato de imatinibe diminuíram sua expressão *in vitro*. A expressão de pERK não diferiu entre os músculos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ do grupo controle e fibroblastos tratados com hormônios. O inibidor JNJ-10198409 causou diminuição da expressão de ERK em músculos *Neu1*$^{-/-}$ e de pERK em fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$. O inibidor mesilato de imatinibe diminuiu a expressão de pERK *in vivo* e *in vitro*.

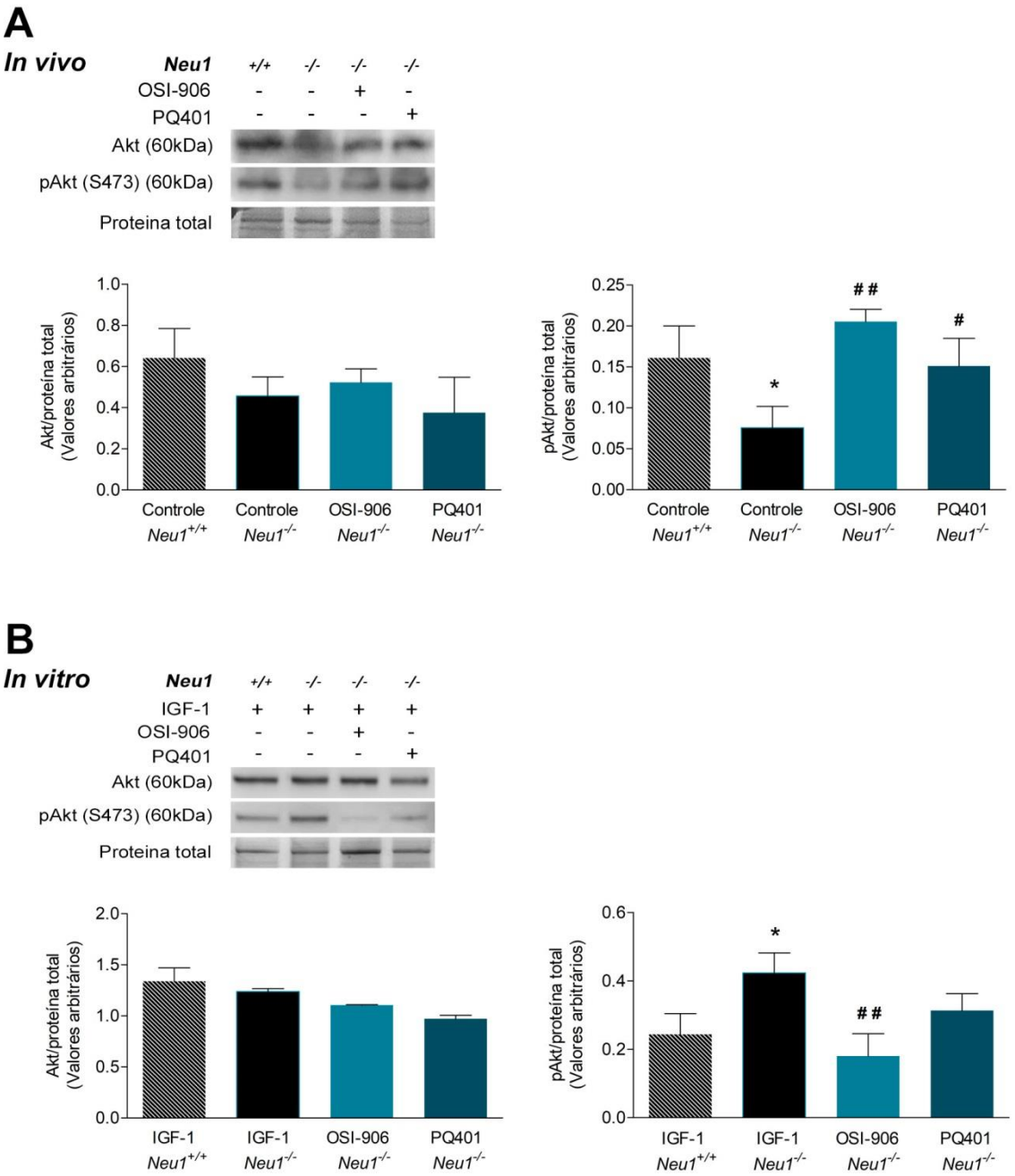

Figura 14: Expressão de Akt (formas totais e fosforiladas) no músculo esquelético (A) e em fibroblastos (B) de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$, após inibição do IGF-1R por administração de OSI-906 e PQ401 *in vivo* e *in vitro*. Teste de t para amostras independentes, média ± desvio padrão. * P<0,05 indica diferenças entre genótipos; # P<0,05 e # # P<0,01 indicam diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

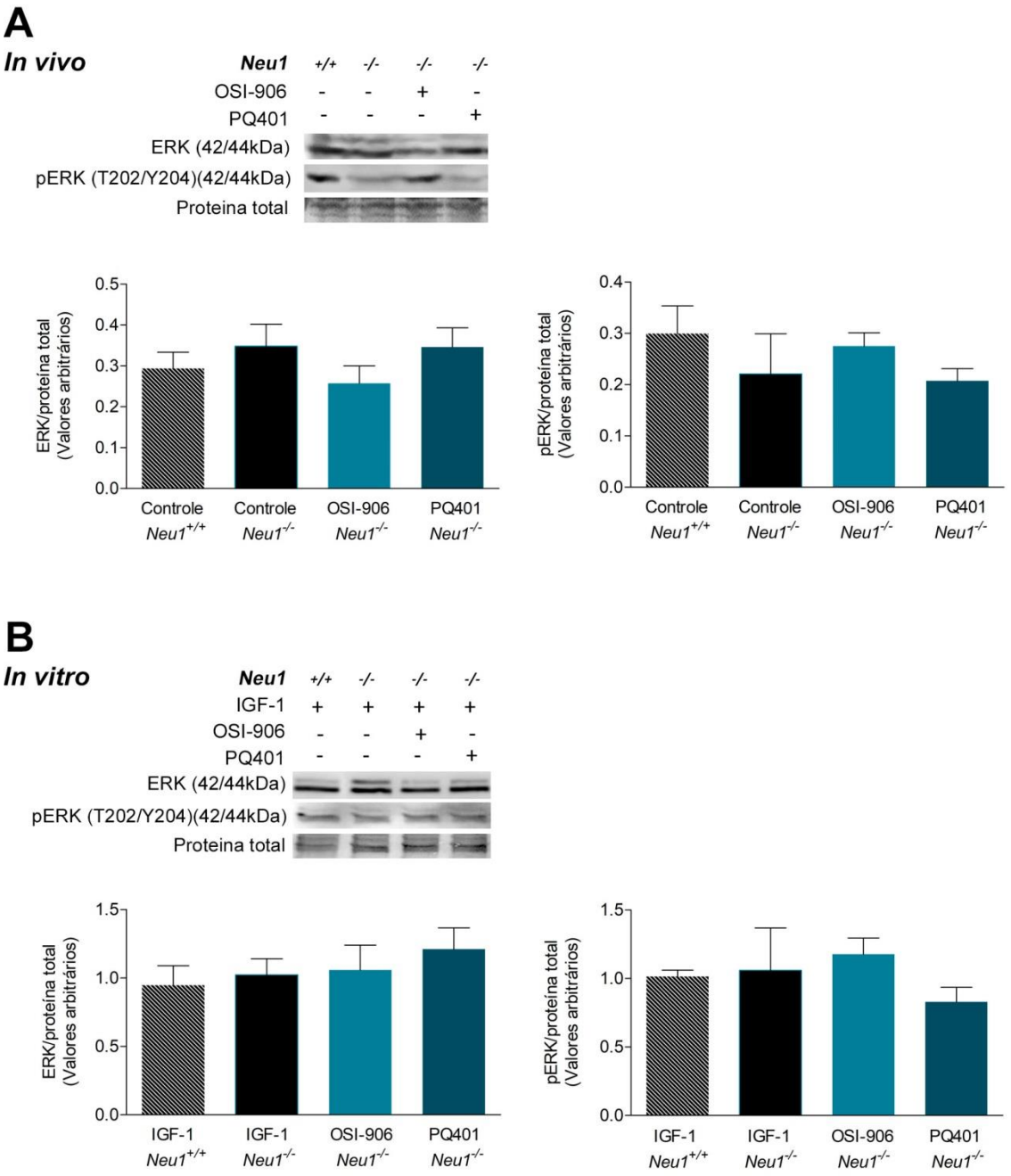

Figura 15: Expressão de ERK (formas totais e fosforiladas) no músculo esquelético (A) e em fibroblastos (B) de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$, após inibição do IGF-1R por administração de OSI-906 e PQ401 *in vivo* e *in vitro*. Teste de t para amostras independentes, média ± desvio padrão.

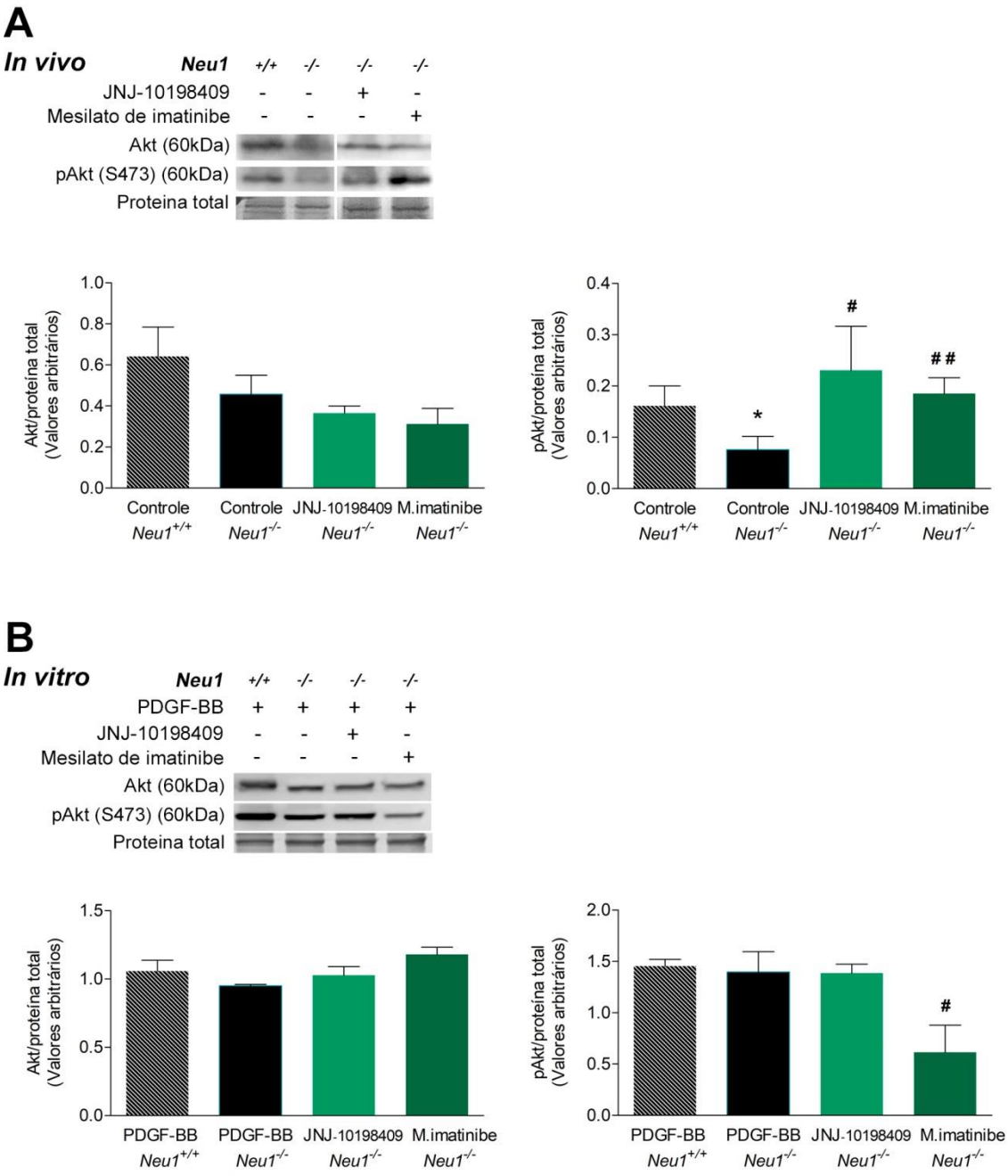

Figura 16: Expressão de Akt (formas totais e fosforiladas) no músculo esquelético (A) e em fibroblastos (B) de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$, após inibição do PDGFR por administração de JNJ-10198409 e mesilato de imatinibe *in vivo* e *in vitro*. * P<0,05 indica diferenças entre genótipos; # P<0,05 e # # P<0,01 indicam diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

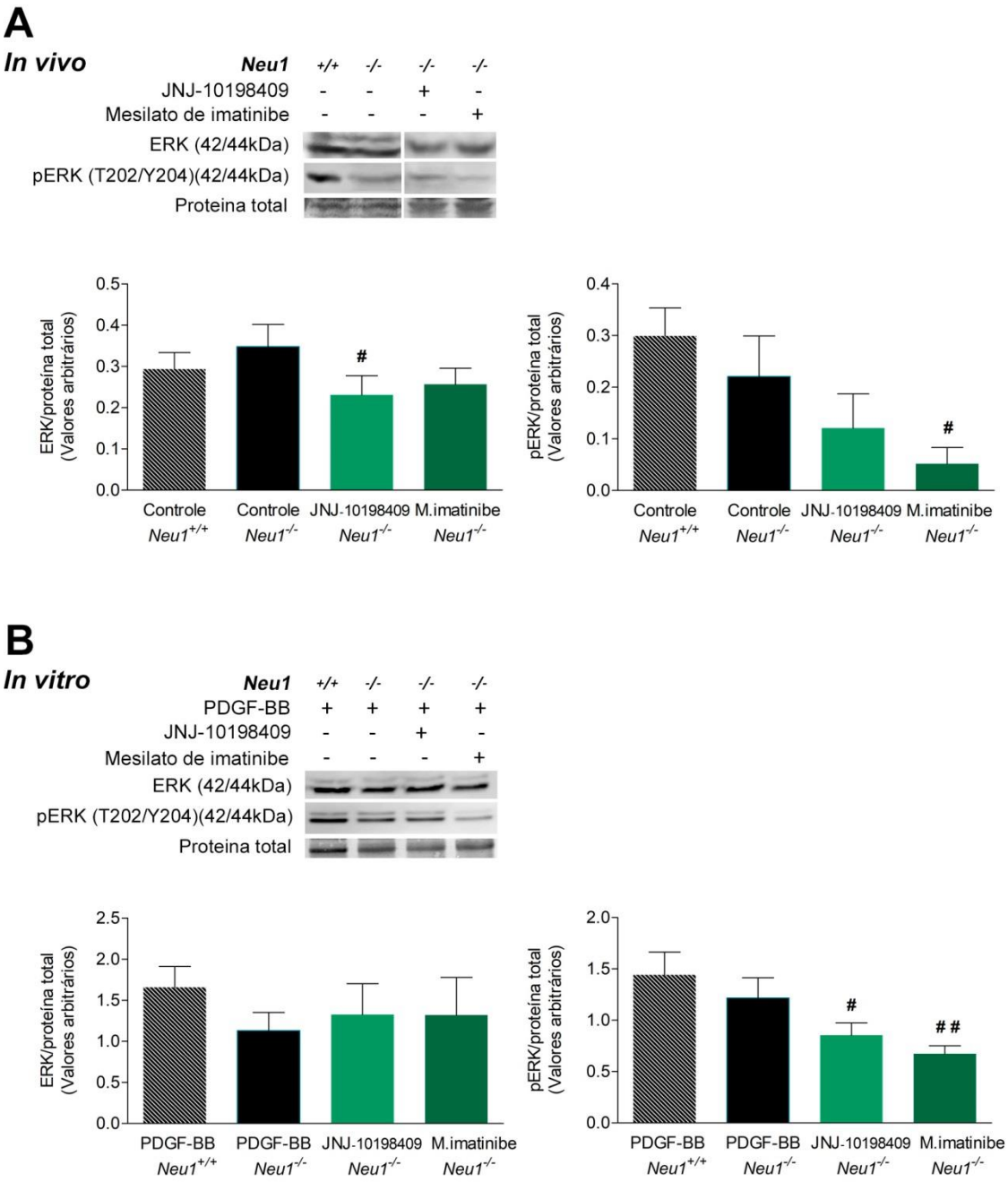

Figura 17: Expressão de ERK (formas totais e fosforiladas) no músculo esquelético (A) e em fibroblastos (B) de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$, após inibição do PDGFR por administração de JNJ-10198409 e mesilato de imatinibe *in vivo* e *in vitro*. # P<0,05 e # # P<0,01 indicam diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

4.1.6 Proliferação celular

A expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) não diferiu entre os músculos dos grupos controle *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$(**Figura 18** e **Figura 19**), e a expressão de PCNA em músculos do grupo PQ401 *Neu1*$^{-/-}$ foi superior ao controle *Neu1*$^{-/-}$ (**Figura 18**). Não foram observadas alterações na expressão de PCNA no músculo de animais tratados com os inibidores de PDGFR (**Figura 19**).

Com relação à contagem de fibroblastos tratados *in vitro*, o hormônio IGF-1 induziu maior proliferação em células *Neu1*$^{-/-}$ (**Figura 18**). A combinação de IGF-1 e OSI-906 reduziu o número de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ ao final do experimento, atingindo valores equivalentes aos de *Neu1*$^{+/+}$. A combinação de IGF-1 e PQ401 aumentou o número final de fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ em relação às células apenas tratadas com IGF-1. O hormônio PDGF-BB não induziu proliferação celular diferenciada entre os genótipos (**Figura 19**), porém a combinação com o inibidor mesilato de imatinibe reduziu o número final de fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ em relação às células apenas tratadas com PDGF-BB.

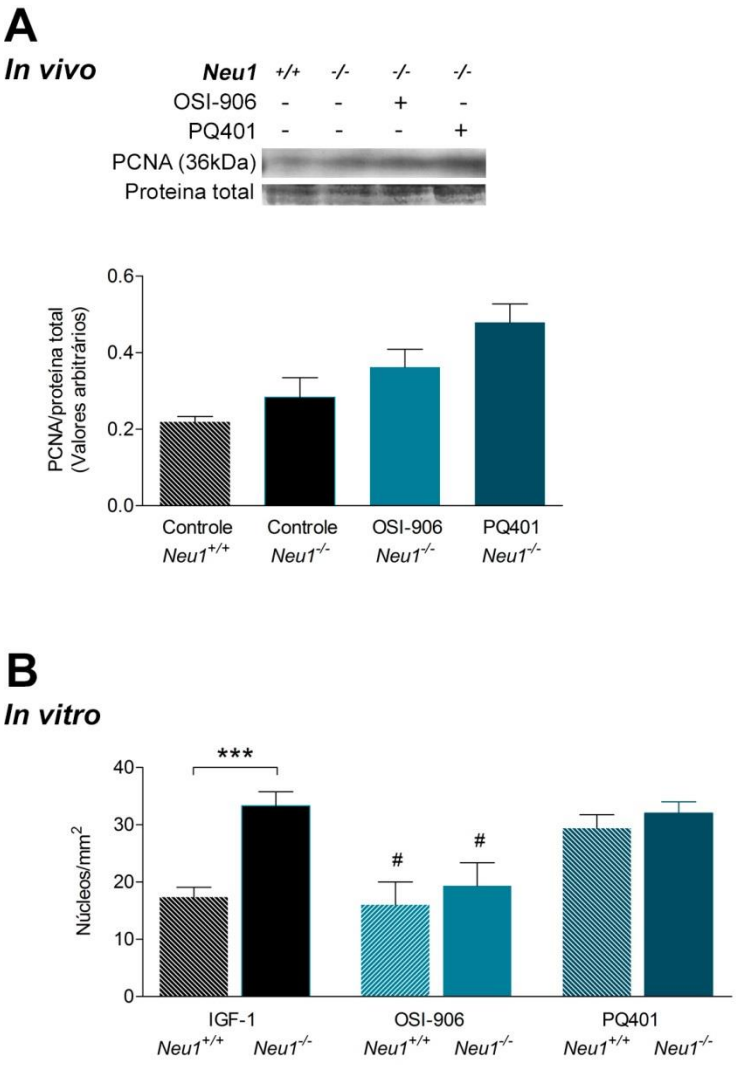

Figura 18: Expressão de marcador de proliferação celular (PCNA) em músculos de camundongos tratados *in vivo* com os inibidores de IGF-1R OSI-906 e PQ401 (A) e contagem de fibroblastos tratados com IGF-1 ou IGF-1 e inibidores após 72 horas de incubação *in vitro* (B). Teste de t para amostras independentes, média ± desvio padrão. *** P<0,001 indica diferenças entre genótipos; # P<0,05 indica diferença entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

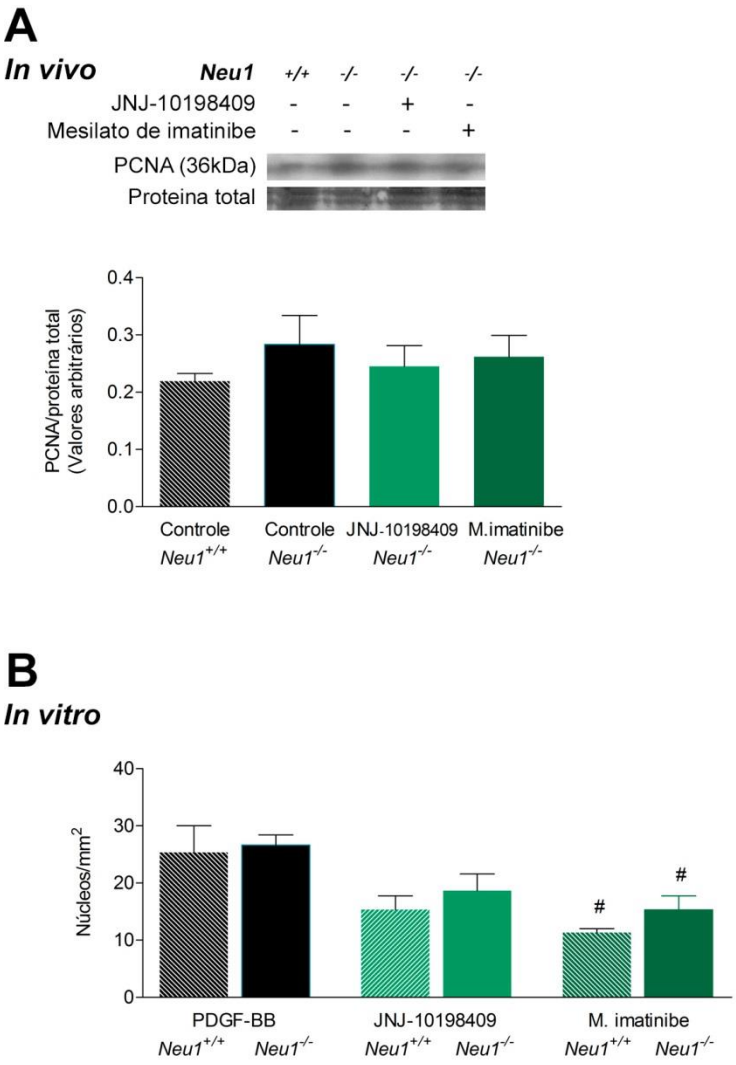

Figura 19: Expressão de marcador de proliferação celular (PCNA) em músculos de camundongos tratados *in vivo* com os inibidores de PDGFR JNJ-10198409 e mesilato de imatinibe (A) e contagem de fibroblastos tratados com PDGF-BB ou PDGF-BB e inibidores após 72 horas de incubação *in vitro* (B). Teste de t para amostras independentes, média ± desvio padrão. # P<0,05 indica diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

4. 1.7 Fosfatase ácida

A marcação de atividade de fosfatase ácida em músculos *Neu1*$^{+/+}$ foi baixa ou nula em todos os grupos analisados e não se alterou com a administração dos inibidores (**Figura 20**). Apesar de a marcação de fosfatase

ácida ter sido mais elevada em todos os grupos *Neu1*$^{-/-}$ do que nos músculos normais, os tratamentos não pareceram aumentar a atividade lisossomal em relação aos controles do mesmo genótipo em áreas mais extensas, ainda que a quantidade de infiltrados pareça ter aumentado no grupo PQ401 *Neu1*$^{-/-}$ (**Figura 20**).

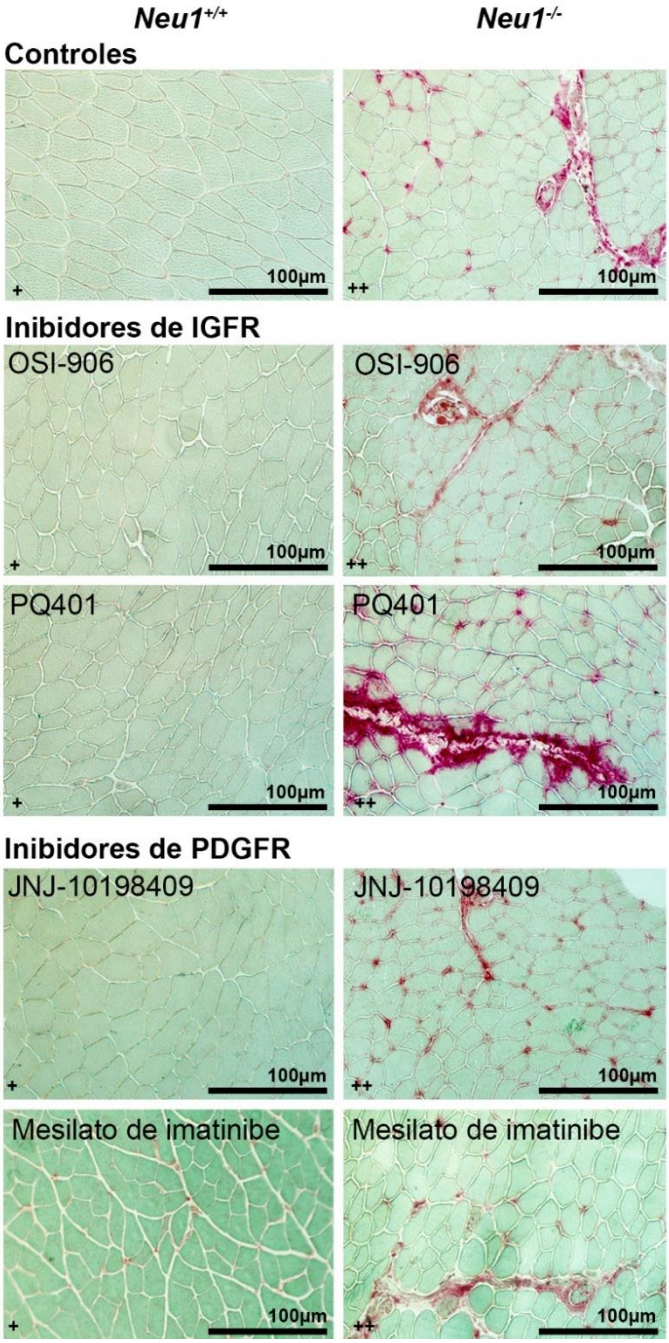

Figura 20: Atividade lisossomal em músculos tibiais anteriores de camundongos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ controles, tratados com inibidores de IGF-1R (OSI-906 e PQ401) e PDGFR (JNJ-10198409 e mesilato de imatinibe). A intensidade das marcações de cada grupo foram classificadas com os símbolos + e ++. Marcação com fosfatase ácida, Aumento de 20x.

4.1.8 Expressão das catepsinas B e L nos músculos

A expressão muscular de catepsina B (**Figura 21** e **Figura 22**) foi maior nos animais *Neu1*$^{-/-}$ em todos os grupos analisados, com exceção dos tratados com OSI-906, que não presentaram diferenças entre os genótipos. Entretanto, este mesmo grupo apresentou redução na expressão de catepsina B dos músculos *Neu1*$^{-/-}$ quando comparados com os controles não tratados do mesmo genótipo. Com relação à catepsina L, houve redução significativa apenas na expressão de animais tratados com JNJ-10198409 *Neu1*$^{-/-}$ em relação aos *Neu1*$^{+/+}$ tratados e ao grupo *Neu1*$^{-/-}$ controle (**Figura 22**).

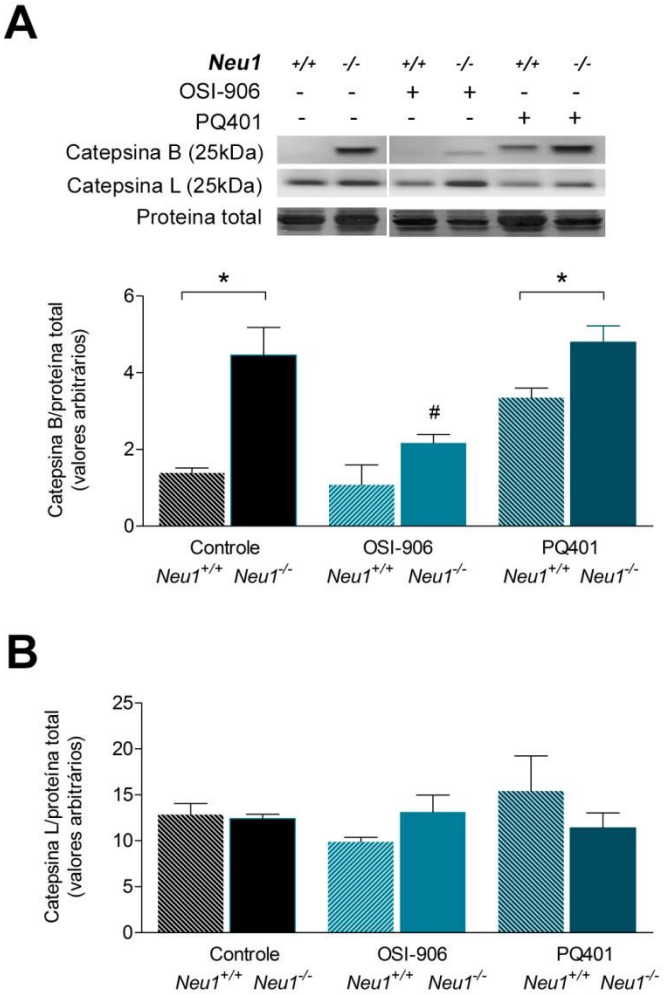

Figura 21: Expressão das catepsinas B (A) e L (B) em músculos de camundongos tratados *in vivo* com os inibidores de IGF-1R OSI-906 ou PQ401. Teste de t para amostras independentes,

média ± desvio padrão. * P<0,05 indica diferenças entre genótipos; # P<0,05 indica diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

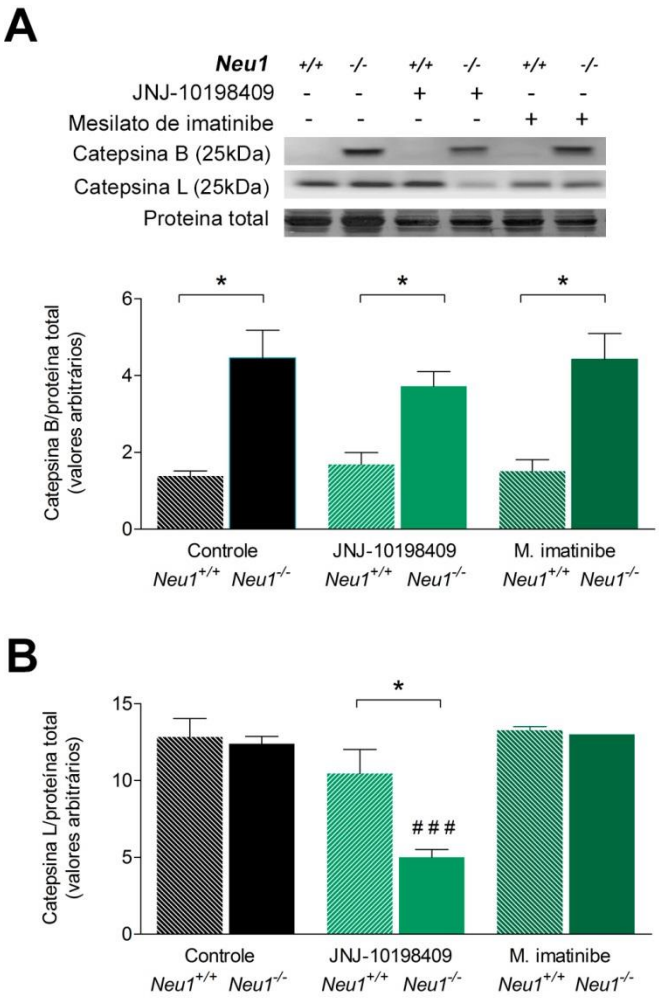

Figura 22: Expressão das catepsinas B (A) e L (B) em músculos de camundongos tratados *in vivo* com os inibidores de PDGFR JNJ-10198409 ou mesilato de imatinibe. Teste de t para amostras independentes, média ± desvio padrão. * P<0,05 indica diferenças entre genótipos; # # # P<0,001 indica diferenças entre determinado grupo experimental e o controle do mesmo genótipo.

4.1.9 Resumo dos resultados da inibição de IGF-1R e PDGFR

A **Figura 23Erro! Fonte de referência não encontrada.** resume os principais resultados obtidos após os tratamentos *in vitro* e *in vivo* com os inibidores de IGF-1R e PDGFR.

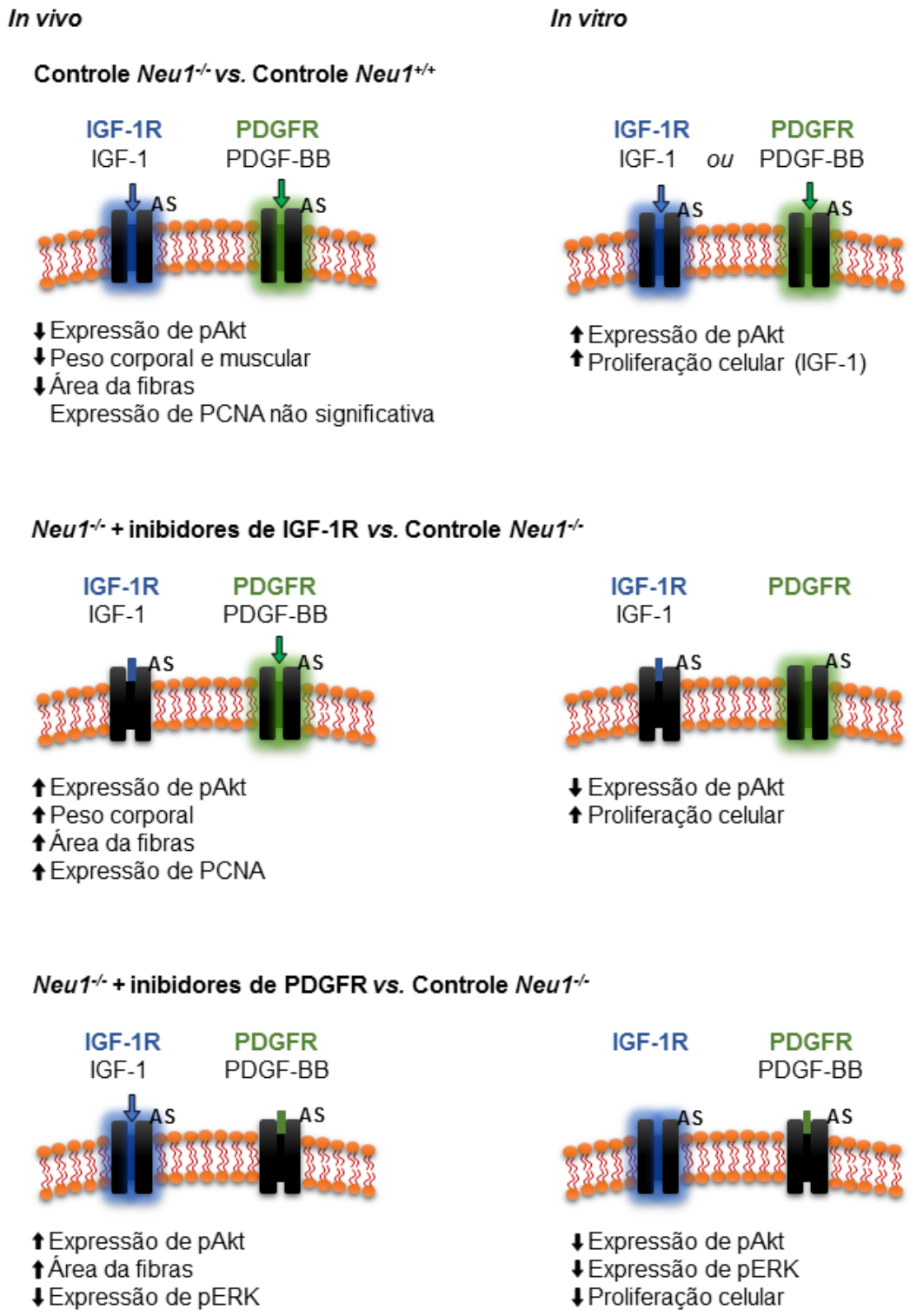

Figura 23: Resumo dos resultados das análises da inibição de IGF-1R e de PDGFR *in vivo* e *in vitro*, com enfoque nos resultados obtidos para o genótipo *Neu1*$^{-/-}$. Na deficiência de Neu1 não há regulação negativa de IGF-1R e PDGFR, condição representada pela ligação com de ácido siálico (AS) aos receptores ativados (coloridos). A imagem indica ainda a inibição dos receptores com substâncias antagonistas e a estimulação dos mesmos com seus hormônios agonistas.

4.2 Tratamento de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ com neuraminidase

A imunofluorescência de fibroblastos controles *Neu1*$^{+/+}$ demonstra a colocalização da enzima catepsina B e dos lisossomos (marcação por LAMP-1), ao passo que nos fibroblastos controles *Neu1*$^{-/-}$ a marcação de catepsina estava presente tanto nos lisossomos como também dispersa no citoplasma (**Figura 24**). O tratamento com neuraminidase fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ diminuiu a presença de catepsina B no citoplasma, indicando que a neuraminidase possivelmente atua no seu processamento e/ou compartimentalização (**Figura 24**). No intuito de confirmar esta hipótese, a análise da expressão e da atividade de catepsina B foi realizada isoladamente nas frações lisossomal e citosólicas desses fibroblastos. O tratamento com neuraminidase em fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ praticamente anulou a presença de catepsina B no citosol (**Figura 25A**), além de ter aumentado sua atividade lisossomal e reduzido a citosólica (**Figura 25B**). Nenhuma alteração foi identificada na expressão e atividade de catepsina L.

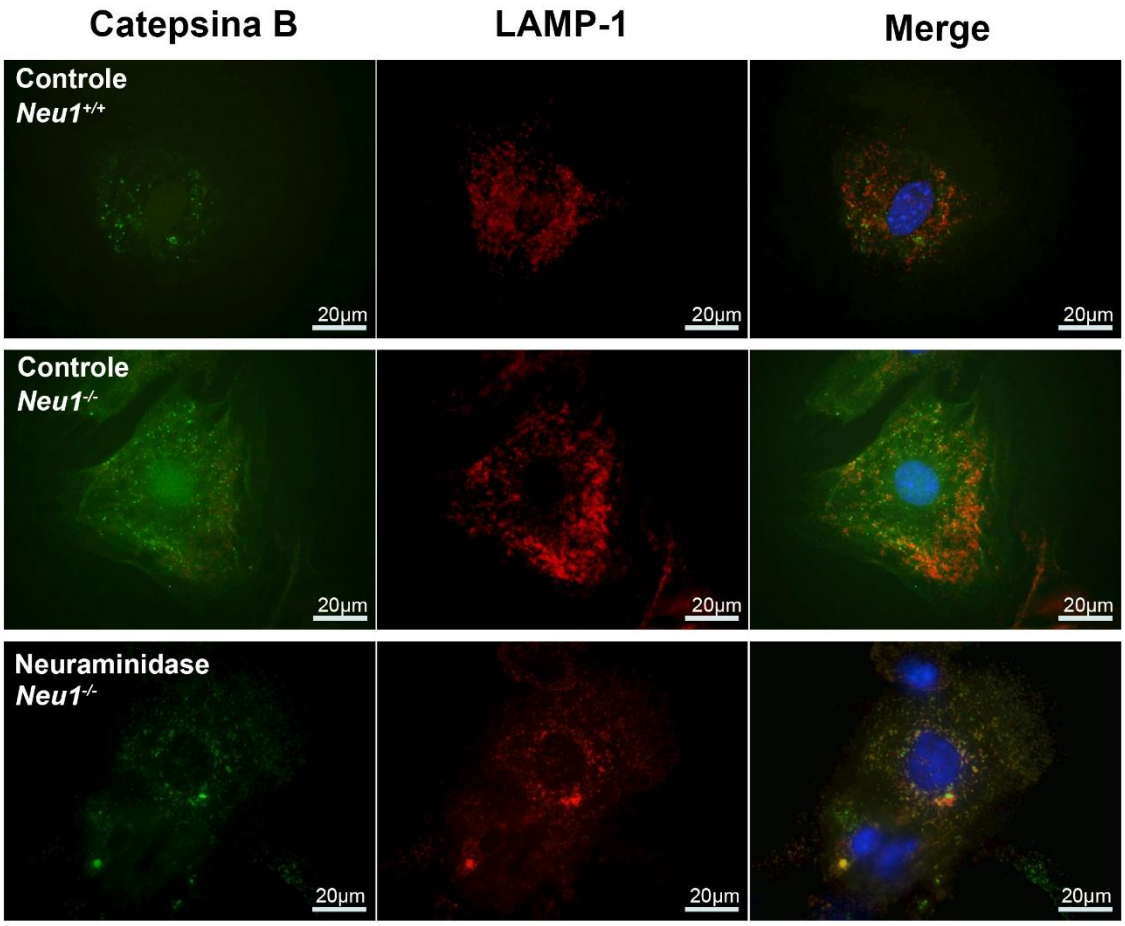

Figura 24: Imunofluorescência de fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ tratados ou não com neuraminidase, com marcação de lisossomos (LAMP-1) e catepsina B. Aumento 100x.

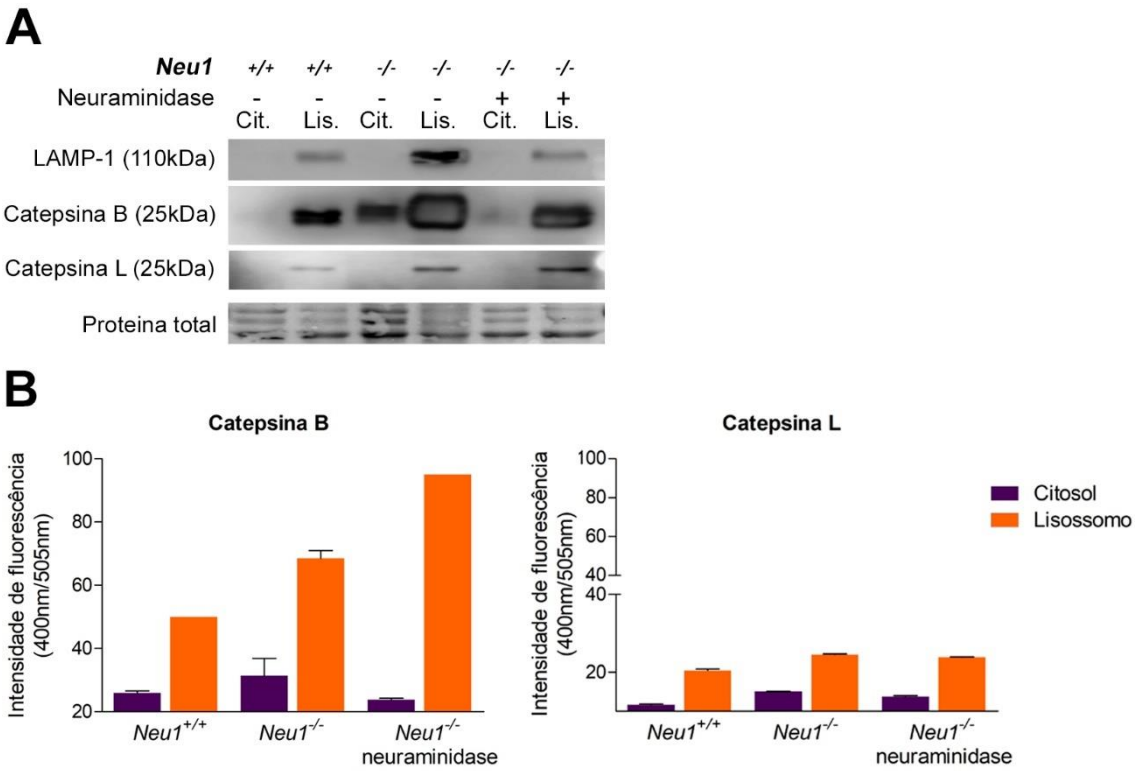

Figura 25: Expressão proteica (**A**) e atividade (**B**) das catepsinas B e L nas frações citosólicas (Cit.) e lisossomais (Lis.) de fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ que não sofreram intervenções e fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ tratados com neuraminidase. A proteína LAMP-1 foi utilizada por ser um marcador exclusivo da membrana lisossomal, no intuito de atestar a fração celular utilizada.

5 Discussão

O objetivo deste estudo foi identificar se o IGF-1R, PDGFR e/ou a catepsina B poderiam ser relevantes para o estabelecimento do quadro de degeneração da musculatura de camundongos *Neu1*$^{-/-}$. Com intuito de observar possíveis efeitos de forma sistêmica e isolada, foram realizadas análises de músculos provenientes de animais tratados *in vivo* e células de cultura primária de fibroblastos tratados *in vitro* com inibidores de IGF-1R ou de PDGFR. Adicionalmente, os efeitos da catepsina B foram observados separadamente nas frações citosólica e lisossomal de fibroblastos tratados ou não com neuraminidase exógena.

As análises morfométricas e histológicas após tratamentos com inibidores de IGF-1R ou PDGFR *in vivo* revelaram menor peso muscular e área da secção transversa das fibras musculares em camundongos do grupo controle *Neu1*$^{-/-}$, corroborando os estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (Zanoteli *et al.*, 2010, Neves *et al.*, 2015). Por outro lado, embora ocorra aumento na proliferação de fibroblastos em estágios avançados da degeneração muscular na deficiência de Neu1 (Zanoteli *et al.*, 2010), não foi observado o aumento na expressão de PCNA nos músculos do grupo controle *Neu1*$^{-/-}$. Apesar da análise histológica indicar regiões de aumento de celularidade, possivelmente a proliferação de fibroblastos ainda não atingiu níveis significativos nos períodos analisados neste estudo. No entanto, a tendência para maior proliferação celular de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ *versus Neu1*$^{+/+}$ foi confirmada nos experimentos *in vitro* após a incubação com IGF-1.

Os tratamentos *in vitro* com IGF-1 e PDGF-BB resultaram em maior expressão de pAkt nos fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ em relação aos fibroblastos *Neu1*$^{+/+}$, embora a expressão de pAkt nos músculos do grupo controle *Neu1*$^{-/-}$ tenha sido menor. Quadros de atrofia muscular com reduções na expressão de pAkt são tradicionalmente relacionados a inibições da via do IGF-1 (revisado por Schiaffino *et al.* (2013), porém o presente estudo confirmou as observações de Hinek *et al.* (2008), indicando que o receptor de IGF-1 é mais responsivo na deficiência de Neu1. Já foi descrito na literatura que atrasos no desenvolvimento embrionário com causas genéticas podem gerar adultos com menor peso e estrutura corporal, e, consequentemente, músculos menores, mimetizando uma atrofia muscular (Sandri, 2008). Não há estudos sobre o desenvolvimento embrionário da musculatura esquelética de camundongos *Neu1*$^{-/-}$, contudo, eles são menores em comparação aos camundongos *Neu1*$^{+/+}$ desde o nascimento. Além disso, apresentam atrasos na miogênese durante o processo de regeneração muscular induzida por injeção de cardiotoxina, com expressão tardia de MyoD, miogenina e isoformas imaturas de miosina e presença de fibras musculares atróficas ao final dos 28 dias de estudo (Neves *et al.*, 2015).

Ao estimular os fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ com PDGF-BB e tratá-los com inibidores de PDGFR, houve queda na expressão de pAkt e pERK, associada com diminuição da proliferação celular em relação aos controles do mesmo genótipo. A estimulação de IGF-1R e sua respectiva inibição causou redução na expressão do pAkt, porém aumentou a proliferação celular. Uma possível explicação é que a coleta dos fibroblastos para extração de proteínas foi realizada na fase aguda dos tratamentos (30 minutos de incubação com

hormônio), e, aparentemente, os efeitos da inibição de IGF-1R não duraram até os estágios mais tardios do experimento para verificação da proliferação.

A expressão reduzida de pAkt verificada nos fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ tratados *in vitro* não se replicou após os tratamentos *in vivo* dos camundongos *Neu1*$^{-/-}$. A elevação na expressão de pAkt nos camundongos foi acompanhada por incremento na área das fibras e na massa muscular. No caso da inibição do IGF1-R *in vivo* houve ainda elevação na expressão de PCNA, combinada com aumentos de regiões com infiltrados, o que sugere aumento de proliferação de fibroblastos. Esses eventos foram inesperados, uma vez que os inibidores justamente bloqueiam a ação de receptores sialilados capazes de iniciar as cascatas bioquímicas que levariam à proliferação e não houve comprovação dos resultados *in vitro*. Uma possibilidade é que foram aplicados inibidores específicos para IGF-1R ou PDGFR *in vivo*, e o inibidor não bloqueado continuaria autuando hipersialilado. Hipoteticamente, a inibição de uma via de sinalização favoreceria o estímulo de outras vias bioquímicas não inibidas. O mesmo efeito não poderia ser observado nos experimentos *in vitro*, pois a estimulação hormonal da atividade dos receptores foi agonista para cada receptor isoladamente, dificultando ou inibindo ações de outras vias bioquímicas.

A expressão das catepsinas B e L não diferiram entre os genótipos após os tratamentos *in vitro* com inibidores de IGF-1R e PDGFR, entretanto, a expressão de ambas as catepsinas se alteraram após os tratamentos *in vivo*, com diminuição na expressão de catepsina B quando o receptor de IGF-1R foi inibido e a redução na expressão de catepsina L após a inibição de PDGFR. Os processos de degradação e reciclagem do IGF-1R e do PDGFR ocorrem

por uma combinação de ubiquitinação e ação lisossomal (Girnita *et al.*, 2003, Sehat *et al.*, 2008, Goh e Sorkin, 2013) e, curiosamente, as catepsinas L e B estão envolvidas com a regulação e proteólise de IGF-1R e PDGFR respectivamente (Okuyama *et al.*, 2001, Navab *et al.*, 2008). Estudos futuros poderão analisar a expressão das pró-catepsinas e a atividade das catepsinas B e L para uma melhor compreensão funcional destas enzimas e da possível relação com a regulação de IGF-1R e PDGFR na deficiência de Neu1.

A expressão de catepsina B *in vitro* foi mais alta nos fibroblastos com deficiência de Neu1 do que nos fibroblastos normais, ao passo que a expressão de catepsina L não diferiu. Esta observação corrobora as expressões obtidas em músculos *Neu1*$^{+/+}$ e *Neu1*$^{-/-}$ dos grupos controle, sugerindo que a catepsina B é mais relevante na deficiência de Neu1 do que a catepsina L. Além disso, há maior atividade da catepsina B nas frações lisossomais e citosólicas, e o tratamento com neuraminidase não alterou a atividade de catepsina L.

Conforme demonstrado por *western blotting*, o tratamento de fibroblastos *Neu1*$^{-/-}$ com neuraminidase reduziu/corrigiu o peso molecular da catepsina B, tanto na fração citosólica como na lisossomal, indicando desialilação. Além disso, houve transferência da catepsina B do citosol para os lisossomos, indicando compartimentalização. Observamos ainda redução da atividade da catepsina B citosólica e aumento da atividade de catepsina B lisossomal. Neste sentido, a não compartimentalização da catepsina B torna-se relevante ao quadro de degeneração muscular descrito nos camundongos *Neu1*$^{-/-}$, pois já foi verificado que sua síntese e atividade são aumentadas nos músculos esqueléticos desses animais (Zanoteli *et al.*, 2010).

Em suma, reunindo informações de outros trabalhos e do presente estudo, postulo que o quadro muscular característico na deficiência da Neu1 parece ser iniciado durante o desenvolvimento embrionário dos camundongos, uma vez que nascem com redução no peso e na massa muscular. Essa diminuição na massa muscular passaria a ser comprometida secundariamente pela ação dos fibroblastos que apresentam alta taxa proliferativa, possivelmente com a contribuição da ativação de vias mediadas pelos receptores de IGF e PDGF. Por serem tipicamente quiescentes, as células que compõem as fibras musculares são sobrepujadas pela capacidade proliferativa dos fibroblastos sob estímulo hormonal, mantendo o quadro de atrofia ao longo da vida, em conjunto com a degeneração das fibras realizada pelos fibroblastos. Essa destruição pode também ser relacionada com a atividade de catepsina B não alocada nos lisossomos, embora ela seja menor quando comparada a sua atividade ótima no lúmen lisossomal.

6 Conclusões

Os resultados apresentados permitem concluir que a atividade de IGF-1R, PDGFR e a ação da catepsina B estão potencialmente relacionados com o fenótipo muscular de camundongos *Neu1*$^{-/-}$.

7 Anexos

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13/03/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 526/13 intitulado: **"REGULAÇÃO DE RECEPTORES DE IGF E PDGF NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS COM DEFICIÊNCIA DE NEURAMINIDASE 1"** que utilizará **120** animais da espécie **CAMUNDONGOS,** apresentado pelo Departamento Neurologia, LIM 45, Lab. Fisiopatologia Neurocirúrgica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Edmar Zanoteli
Pesquisador (a) Executante: Juliana de Carvalho Neves

CEP-FMUSP, 13 de Março de 2014.

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

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

8 Referências

Abdollahi, A., Li, M., Ping, G., Plathow, C., Domhan, S., Kiessling, F., Lee, L. B., McMahon, G., Grone, H. J., Lipson, K. E. e Huber, P. E. (2005). Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 201(6): 925-935.

Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P. e Ward, C. W. (2000). Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 57(7): 1050-1093.

Akhmetshina, A., Venalis, P., Dees, C., Busch, N., Zwerina, J., Schett, G., Distler, O. e Distler, J. H. (2009). Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum* 60(1): 219-224.

Baserga, R. (2005). The insulin-like growth factor-i receptor as a target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 9(4): 753-768.

Bechet, D., Tassa, A., Taillandier, D., Combaret, L. e Attaix, D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 2098-2114.

Bigi, A., Morosi, L., Pozzi, C., Forcella, M., Tettamanti, G., Venerando, B., Monti, E. e Fusi, P. (2010). Human sialidase neu4 long and short are extrinsic proteins bound to outer mitochondrial membrane and the endoplasmic reticulum, respectively. *Glycobiology* 20(2): 148-157.

Blaise, S., Romier, B., Kawecki, C., Ghirardi, M., Rabenoelina, F., Baud, S., Duca, L., Maurice, P., Heinz, A., Schmelzer, C. E., Tarpin, M., Martiny, L., Garbar, C., Dauchez, M., Debelle, L. e Durlach, V. (2013). Elastin-derived peptides are new regulators of insulin resistance development in mice. *Diabetes* 62(11): 3807-3816.

Blakesley, V. A., Scrimgeour, A., Esposito, D. e Le Roith, D. (1996). Signaling via the insulin-like growth factor-i receptor: Does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev* 7(2): 153-159.

Bonten, E., van der Spoel, A., Fornerod, M., Grosveld, G. e d'Azzo, A. (1996). Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. *Genes Dev* 10(24): 3156-3169.

Bonten, E. J., Annunziata, I. e d'Azzo, A. (2014). Lysosomal multienzyme complex: Pros and cons of working together. *Cell Mol Life Sci* 71(11): 2017-2032.

Bonten, E. J., Arts, W. F., Beck, M., Covanis, A., Donati, M. A., Parini, R., Zammarchi, E. e d'Azzo, A. (2000). Novel mutations in lysosomal neuraminidase identify functional domains and determine clinical severity in sialidosis. *Hum Mol Genet* 9(18): 2715-2725.

D'Andrea, M. R., Mei, J. M., Tuman, R. W., Galemmo, R. A. e Johnson, D. L. (2005). Validation of in vivo pharmacodynamic activity of a novel pdgf receptor tyrosine kinase inhibitor using immunohistochemistry and quantitative image analysis. *Mol Cancer Ther* 4(8): 1198-1204.

de Geest, N., Bonten, E., Mann, L., de Sousa-Hitzler, J., Hahn, C. e d'Azzo, A. (2002). Systemic and neurologic abnormalities distinguish the lysosomal

disorders sialidosis and galactosialidosis in mice. *Hum Mol Genet* 11(12): 1455-1464.

Distler, J. e Distler, O. (2008). Novel treatment approaches to fibrosis in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 34(1): 145-159; vii.

Distler, J. H., Jungel, A., Huber, L. C., Schulze-Horsel, U., Zwerina, J., Gay, R. E., Michel, B. A., Hauser, T., Schett, G., Gay, S. e Distler, O. (2007). Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* 56(1): 311-322.

Dridi, L., Seyrantepe, V., Fougerat, A., Pan, X., Bonneil, E., Thibault, P., Moreau, A., Mitchell, G. A., Heveker, N., Cairo, C. W., Issad, T., Hinek, A. e Pshezhetsky, A. V. (2013). Positive regulation of insulin signaling by neuraminidase 1. *Diabetes* 62(7): 2338-2346.

Druker, B. J. (2003). Imatinib alone and in combination for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 40(1): 50-58.

Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S. e Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the bcr-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344(14): 1031-1037.

Duca, L., Blanchevoye, C., Cantarelli, B., Ghoneim, C., Dedieu, S., Delacoux, F., Hornebeck, W., Hinek, A., Martiny, L. e Debelle, L. (2007). The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its neu-1 subunit. *J Biol Chem* 282(17): 12484-12491.

Feng, Y. e Dimitrov, D. S. (2008). Monoclonal antibodies against components of the igf system for cancer treatment. *Curr Opin Drug Discov Devel* 11(2): 178-185.

Gable, K. L., Maddux, B. A., Penaranda, C., Zavodovskaya, M., Campbell, M. J., Lobo, M., Robinson, L., Schow, S., Kerner, J. A., Goldfine, I. D. e Youngren, J. F. (2006). Diarylureas are small-molecule inhibitors of insulin-like growth factor i receptor signaling and breast cancer cell growth. *Mol Cancer Ther* 5(4): 1079-1086.

Girnita, L., Girnita, A. e Larsson, O. (2003). Mdm2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8247-8252.

Girnita, L., Wang, M., Xie, Y., Nilsson, G., Dricu, A., Wejde, J. e Larsson, O. (2000). Inhibition of n-linked glycosylation down-regulates insulin-like growth factor-1 receptor at the cell surface and kills ewing's sarcoma cells: Therapeutic implications. *Anticancer Drug Des* 15(1): 67-72.

Girnita, L., Worrall, C., Takahashi, S., Seregard, S. e Girnita, A. (2014). Something old, something new and something borrowed: Emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (igf-1r) signaling regulation. *Cell Mol Life Sci* 71(13): 2403-2427.

Goh, L. K. e Sorkin, A. (2013). Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(5): a017459.

Hartog, H., Wesseling, J., Boezen, H. M. e van der Graaf, W. T. (2007). The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: Old focus, new future. *Eur J Cancer* 43(13): 1895-1904.

Hewish, M., Chau, I. e Cunningham, D. (2009). Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: Novel compounds and novel treatment

strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4(1): 54-72.

Hinek, A., Bodnaruk, T. D., Bunda, S., Wang, Y. e Liu, K. (2008). Neuraminidase-1, a subunit of the cell surface elastin receptor, desialylates and functionally inactivates adjacent receptors interacting with the mitogenic growth factors pdgf-bb and igf-2. *Am J Pathol* 173(4): 1042-1056.

Ho, C. Y., Ludovici, D. W., Maharoof, U. S., Mei, J., Sechler, J. L., Tuman, R. W., Strobel, E. D., Andraka, L., Yen, H. K., Leo, G., Li, J., Almond, H., Lu, H., DeVine, A., Tominovich, R. M., Baker, J., Emanuel, S., Gruninger, R. H., Middleton, S. A., Johnson, D. L. e Galemmo, R. A., Jr. (2005). (6,7-dimethoxy-2,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)phenylamines: Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with broad antiproliferative activity against tumor cells. *J Med Chem* 48(26): 8163-8173.

Hubbard, S. R. e Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 69: 373-398.

Igdoura, S. A., Gafuik, C., Mertineit, C., Saberi, F., Pshezhetsky, A. V., Potier, M., Trasler, J. M. e Gravel, R. A. (1998). Cloning of the cdna and gene encoding mouse lysosomal sialidase and correction of sialidase deficiency in human sialidosis and mouse sm/j fibroblasts. *Hum Mol Genet* 7(1): 115-121.

Kahan, Z., Varga, J. L., Schally, A. V., Rekasi, Z., Armatis, P., Chatzistamou, L., Czompoly, T. e Halmos, G. (2000). Antagonists of growth hormone-releasing hormone arrest the growth of mda-mb-468 estrogen-independent human breast cancers in nude mice. *Breast Cancer Res Treat* 60(1): 71-79.

Kato, T., Wang, Y., Yamaguchi, K., Milner, C. M., Shineha, R., Satomi, S. e Miyagi, T. (2001). Overexpression of lysosomal-type sialidase leads to suppression of metastasis associated with reversion of malignant phenotype in murine b16 melanoma cells. *Int J Cancer* 92(6): 797-804.

Koda, T., Kijimoto-Ochiai, S., Uemura, S. e Inokuchi, J. (2009). Specific expression of neu2 type b in mouse thymus and the existence of a membrane-bound form in cos cells. *Biochem Biophys Res Commun* 387(4): 729-735.

Kooijman, R. (2006). Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (igf)-i. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(4): 305-323.

Lee, C., Liu, A., Miranda-Ribera, A., Hyun, S. W., Lillehoj, E. P., Cross, A. S., Passaniti, A., Grimm, P. R., Kim, B. Y., Welling, P. A., Madri, J. A., DeLisser, H. M. e Goldblum, S. E. (2014). Neu1 sialidase regulates the sialylation state of cd31 and disrupts cd31-driven capillary-like tube formation in human lung microvascular endothelia. *J Biol Chem* 289(13): 9121-9135.

Li, R., Pourpak, A. e Morris, S. W. (2009). Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor (igf1r) tyrosine kinase as a novel cancer therapy approach. *J Med Chem* 52(16): 4981-5004.

Lowden, J. A. e O'Brien, J. S. (1979). Sialidosis: A review of human neuraminidase deficiency. *Am J Hum Genet* 31(1): 1-18.

Lukong, K. E., Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Ahmad, A., Gahl, W. A., Lefrancois, S., Morales, C. R. e Pshezhetsky, A. V. (2001). Intracellular

distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 276(49): 46172-46181.

Magesh, S., Suzuki, T., Miyagi, T., Ishida, H. e Kiso, M. (2006). Homology modeling of human sialidase enzymes neu1, neu3 and neu4 based on the crystal structure of neu2: Hints for the design of selective neu3 inhibitors. *J Mol Graph Model* 25(2): 196-207.

Maurice, P., Baud, S., Bocharova, O. V., Bocharov, E. V., Kuznetsov, A. S., Kawecki, C., Bocquet, O., Romier, B., Gorisse, L., Ghirardi, M., Duca, L., Blaise, S., Martiny, L., Dauchez, M., Efremov, R. G. e Debelle, L. (2016). New insights into molecular organization of human neuraminidase-1: Transmembrane topology and dimerization ability. *Sci Rep* 6: 38363.

McKinley, E. T., Bugaj, J. E., Zhao, P., Guleryuz, S., Mantis, C., Gokhale, P. C., Wild, R. e Manning, H. C. (2011). 18fdg-pet predicts pharmacodynamic response to osi-906, a dual igf-1r/ir inhibitor, in preclinical mouse models of lung cancer. *Clin Cancer Res* 17(10): 3332-3340.

Miyagi T., Y. K. (2007). *Biochemistry of glycans*. Comprehensive glycoscience. Kamerling J. P., B. G., Lee Y. C., Suzuki A., Taniguchi N., Voragen A. G. J. Amsterdam, Elsevier BV**:** 297–322.

Monti, E., Bassi, M. T., Bresciani, R., Civini, S., Croci, G. L., Papini, N., Riboni, M., Zanchetti, G., Ballabio, A., Preti, A., Tettamanti, G., Venerando, B. e Borsani, G. (2004). Molecular cloning and characterization of neu4, the fourth member of the human sialidase gene family. *Genomics* 83(3): 445-453.

Monti, E., Bonten, Erik, D'Azzo, A., Bresciani, R., Venerando, B., Borsani, G., Schauer, R. e Tettamanti, G. (2010). Sialidases in vertebrates. 64: 403-479.

Monti, E., Preti, A., Rossi, E., Ballabio, A. e Borsani, G. (1999). Cloning and characterization of neu2, a human gene homologous to rodent soluble sialidases. *Genomics* 57(1): 137-143.

Monti, E., Preti, A., Venerando, B. e Borsani, G. (2002). Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochem Res* 27(7-8): 649-663.

Mulvihill, M. J., Cooke, A., Rosenfeld-Franklin, M., Buck, E., Foreman, K., Landfair, D., O'Connor, M., Pirritt, C., Sun, Y., Yao, Y., Arnold, L. D., Gibson, N. W. e Ji, Q. S. (2009). Discovery of osi-906: A selective and orally efficacious dual inhibitor of the igf-1 receptor and insulin receptor. *Future Med Chem* 1(6): 1153-1171.

Nakae, J., Kido, Y. e Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and igf-i receptors. *Endocr Rev* 22(6): 818-835.

Navab, R., Pedraza, C., Fallavollita, L., Wang, N., Chevet, E., Auguste, P., Jenna, S., You, Z., Bikfalvi, A., Hu, J., O'Connor, R., Erickson, A., Mort, J. S. e Brodt, P. (2008). Loss of responsiveness to igf-i in cells with reduced cathepsin l expression levels. *Oncogene* 27(37): 4973-4985.

Neves, J., C., Rizzato, V. R., Fappi, A., Garcia, M. M., Chadi, G., van de Vlekkert, D., d'Azzo, A. e Zanoteli, E. (2015). Neuraminidase-1 mediates skeletal muscle regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1852(9): 1755-1764.

Noda, T., Isogai, K., Katunuma, N., Tarumoto, Y. e Ohzeki, M. (1981). Effects of cathepsin b, h, and d in pectoral muscle of dystrophic chickens (line 413) of in vivo administration of e-64-c (n-[n-(l-3-transcarboxyoxirane-2-carbonyl)-l-leucyl]-3-methyl-butylamine). *J Biochem* 90(3): 893-896.

Okuyama, H., Shimahara, Y., Kawada, N., Seki, S., Kristensen, D. B., Yoshizato, K., Uyama, N. e Yamaoka, Y. (2001). Regulation of cell growth by redox-mediated extracellular proteolysis of platelet-derived growth factor receptor beta. *J Biol Chem* 276(30): 28274-28280.

Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L., Cirillo, P. F., Gilmore, T., Graham, A. G., Grob, P. M., Hickey, E. R., Moss, N., Pav, S. e Regan, J. (2002). Inhibition of p38 map kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol* 9(4): 268-272.

Patti, M. E. e Kahn, C. R. (1998). The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9(2-4): 89-109.

Pattison, S., Pankarican, M., Rupar, C. A., Graham, F. L. e Igdoura, S. A. (2004). Five novel mutations in the lysosomal sialidase gene (neu1) in type ii sialidosis patients and assessment of their impact on enzyme activity and intracellular targeting using adenovirus-mediated expression. *Hum Mutat* 23(1): 32-39.

Pshezhetsky, A. V. e Hinek, A. (2011). Where catabolism meets signalling: Neuraminidase 1 as a modulator of cell receptors. *Glycoconj J* 28(7): 441-452.

Pshezhetsky, A. V., Richard, C., Michaud, L., Igdoura, S., Wang, S., Elsliger, M. A., Qu, J., Leclerc, D., Gravel, R., Dallaire, L. e Potier, M. (1997). Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis. *Nat Genet* 15(3): 316-320.

Rottier, R. J., Bonten, E. e d'Azzo, A. (1998). A point mutation in the neu-1 locus causes the neuraminidase defect in the sm/j mouse. *Hum Mol Genet* 7(2): 313-321.

Rusciani, A., Duca, L., Sartelet, H., Chatron-Colliet, A., Bobichon, H., Ploton, D., Le Naour, R., Blaise, S., Martiny, L. e Debelle, L. (2010). Elastin peptides signaling relies on neuraminidase-1-dependent lactosylceramide generation. *PLoS One* 5(11): e14010.

Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D. e Brodt, P. (2007). The role of the igf system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights. *Endocr Rev* 28(1): 20-47.

Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)* 23: 160-170.

Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R. e Miyagi, T. (2002). Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int J Cancer* 97(2): 180-185.

Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B. e Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 280(17): 4294-4314.

Schwartz, W. e Bird, J. W. (1977). Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins b and d. *Biochem J* 167(3): 811-820.

Sehat, B., Andersson, S., Girnita, L. e Larsson, O. (2008). Identification of c-cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-i receptor with distinct roles from mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis. *Cancer Res* 68(14): 5669-5677.

Sepp-Lorenzino, L. (1998). Structure and function of the insulin-like growth factor i receptor. *Breast Cancer Res Treat* 47(3): 235-253.

Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Hassan, J. A., Morales, C. R. e Pshezhetsky, A. V. (2004). Neu4, a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells. *J Biol Chem* 279(35): 37021-37029.

Smutova, V., Albohy, A., Pan, X., Korchagina, E., Miyagi, T., Bovin, N., Cairo, C. W. e Pshezhetsky, A. V. (2014). Structural basis for substrate specificity of mammalian neuraminidases. *PLoS One* 9(9): e106320.

Song, X. B., Liu, G., Liu, F., Yan, Z. G., Wang, Z. Y., Liu, Z. P. e Wang, L. (2017). Autophagy blockade and lysosomal membrane permeabilization contribute to lead-induced nephrotoxicity in primary rat proximal tubular cells. *Cell Death Dis* 8(6): e2863.

Thomas, G. H. (2001). *Disorders of glycoprotein degradation: A-mannosidosis, β-mannosidosis, fucosidosis, and sialidosis*. The online metabolic and molecular bases of inherited disease >. David Valle, A. L. B., Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler, Stylianos E. Antonarakis, Andrea Ballabio, K. Michael Gibson, Grant Mitchell, McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC.

Tornkvist, M., Natalishvili, N., Xie, Y., Girnita, A., D'Arcy, P., Brodin, B., Axelson, M. e Girnita, L. (2008). Differential roles of ss18-ssx fusion gene and insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 368(3): 793-800.

Troib, A., Landau, D., Youngren, J. F., Kachko, L., Rabkin, R. e Segev, Y. (2011). The effects of type 1 igf receptor inhibition in a mouse model of diabetic kidney disease. *Growth Horm IGF Res* 21(5): 285-291.

Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., Kato, K., Sakuraba, H. e Miyagi, T. (2009). Contribution of sialidase neu1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta4. *Oncogene* 28(9): 1218-1229.

Vasilcanu, D., Weng, W. H., Girnita, A., Lui, W. O., Vasilcanu, R., Axelson, M., Larsson, O., Larsson, C. e Girnita, L. (2006). The insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor ppp produces only very limited resistance in tumor cells exposed to long-term selection. *Oncogene* 25(22): 3186-3195.

Vinogradova, M. V., Michaud, L., Mezentsev, A. V., Lukong, K. E., El-Alfy, M., Morales, C. R., Potier, M. e Pshezhetsky, A. V. (1998). Molecular mechanism of lysosomal sialidase deficiency in galactosialidosis involves its rapid degradation. *Biochem J* 330 (Pt 2): 641-650.

Waltenberger, J., Uecker, A., Kroll, J., Frank, H., Mayr, U., Bjorge, J. D., Fujita, D., Gazit, A., Hombach, V., Levitzki, A. e Bohmer, F. D. (1999). A dual inhibitor of platelet-derived growth factor beta-receptor and src kinase activity potently interferes with motogenic and mitogenic responses to pdgf in vascular smooth muscle cells. A novel candidate for prevention of vascular remodeling. *Circ Res* 85(1): 12-22.

Wang, Y., Yamaguchi, K., Wada, T., Hata, K., Zhao, X., Fujimoto, T. e Miyagi, T. (2002). A close association of the ganglioside-specific sialidase neu3 with caveolin in membrane microdomains. *J Biol Chem* 277(29): 26252-26259.

Yamaguchi, K., Hata, K., Koseki, K., Shiozaki, K., Akita, H., Wada, T., Moriya, S. e Miyagi, T. (2005). Evidence for mitochondrial localization of a novel human sialidase (neu4). *Biochem J* 390(Pt 1): 85-93.

Yin, S., Girnita, A., Stromberg, T., Khan, Z., Andersson, S., Zheng, H., Ericsson, C., Axelson, M., Nister, M., Larsson, O., Ekstrom, T. J. e Girnita, L. (2010). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor by picropodophyllin as a treatment option for glioblastoma. *Neuro Oncol* 12(1): 19-27.

Yogalingam, G., Bonten, E. J., van de Vlekkert, D., Hu, H., Moshiach, S., Connell, S. A. e d'Azzo, A. (2008). Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. *Dev Cell* 15(1): 74-86.

Yoshiji, H., Noguchi, R., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Yoshii, J., Yanase, K., Namisaki, T., Kitade, M., Masaki, T. e Fukui, H. (2005). Imatinib mesylate (sti-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(5): G907-913.

Zanchetti, G., Colombi, P., Manzoni, M., Anastasia, L., Caimi, L., Borsani, G., Venerando, B., Tettamanti, G., Preti, A., Monti, E. e Bresciani, R. (2007). Sialidase neu3 is a peripheral membrane protein localized on the cell surface and in endosomal structures. *Biochem J* 408(2): 211-219.

Zanoteli, E., van de Vlekkert, D., Bonten, E. J., Hu, H., Mann, L., Gomero, E. M., Harris, A. J., Ghersi, G. e d'Azzo, A. (2010). Muscle degeneration in neuraminidase 1-deficient mice results from infiltration of the muscle fibers by expanded connective tissue. *Biochim Biophys Acta* 1802(7-8): 659-672.