

Maria Rita de Camargo Rodrigues

**Efeitos da inibição farmacológica de MuRF1 em associação a
eletroestimulação neuromuscular na massa e força do músculo esquelético**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2023

Maria Rita de Camargo Rodrigues

**Efeitos da inibição farmacológica de MuRF1 em associação a
eletroestimulação neuromuscular na massa e força do músculo esquelético**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica

do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Camargo Rodrigues, Maria Rita
Efeitos da inibição farmacológica de MuRF1 em
associação a eletroestimulação neuromuscular na massa
e força do músculo esquelético / Maria Rita de
Camargo Rodrigues; orientador Anselmo Sigari
Moriscot. -- São Paulo, 2023.
86 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. músculo esquelético. 2. MuRF1. 3. atrogenes.
4. hipertrofia. 5. eletroestimulação neuromuscular.
I. Sigari Moriscot, Anselmo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Rita de Camargo Rodrigues

Título da Dissertação/Tese: Efeitos da inibição farmacológica de MuRF1 em associação a eletroestimulação neuromuscular na massa e força do músculo esquelético

Orientador: Anselmo Sigari Moriscot

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE MURF-1 EM ASSOCIAÇÃO COM A ELETROESTIMULAÇÃO NEUROMUSCULAR NA MASSA E FORÇA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO", protocolada sob o CEUA nº 6422160920 (ID 001601), sob a responsabilidade de **Anselmo Sigari Moriscot e equipe; Maria Rita de Camargo Rodrigues** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 16/10/2020.

We certify that the proposal "SMALL-MOLECULE INHIBITION OF MURF-1 IN ASSOCIATION WITH NEUROMUSCULAR ELETROSTIMULATION", utilizing 200 Isogenics mice (200 males), protocol number CEUA 6422160920 (ID 001601), under the responsibility of **Anselmo Sigari Moriscot and team; Maria Rita de Camargo Rodrigues** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 10/16/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 10/2020 a 10/2024 (48 meses) Área: **Anatomia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

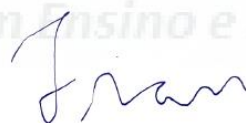
Peso ou idade: **7 a 8 semanas** N: **200**

Linhagem: **C57BL/6**

São Paulo, 07 de julho de 2023



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dedico esse trabalho a José Lourenço Pires, Luiz Gonzaga de Camargo Soares,
Annette Cardinali, Miakotyng Gennady e Inácio Pereira dos Santos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe, Maria Angelica, e meu irmão Luiz Fernando por todo apoio e incentivo. Com certeza sem vocês todo esse processo seria muito mais difícil. Ao meu tio Joe por ter me incentivado a entender como as coisas funcionam.

Agradeço ao meu orientador Anselmo Sigari Moriscot por toda paciência e respeito. Mesmo sem ter o perfil clássico de aluna de pós-graduação em ciências básicas, o prof. Anselmo abriu as portas do seu laboratório e me concedeu uma oportunidade única na minha carreira. Sou muito grata por todos os ensinamentos e conversas (de ciência ao ciclismo!).

Muito obrigada a meus colegas de laboratório Fernando Ribeiro e Mirella Bento por todo suporte, tanto técnico como emocional! Também agradeço a Paulinha, (que teve uma paciência gigantesca comigo no meu período de estágio) ao André Cruz, Afonso Martim, Matheus, Any, William e Luiz.

Agradeço a todos os funcionários e meus colegas de departamento Denival Júnior, Wenddy Sougey, Elia Vedda, Heloisa Matiello, Tábattha de Oliveira e a todos que fizeram com que essa jornada fosse menos solitária. Obrigada também ao Luiz Bechara pelas conversas sobre carreira científica e por sempre estar disponível para ajudar!

Também agradeço ao meu técnico Marcos Cardoso, aos meus colegas de treino e toda a equipe técnica do Esporte Clube Pinheiros. Eu sabia que não seria uma tarefa simples retornar ao esporte competitivo junto com um mestrado em uma área tão desafiadora como a Biologia Celular, mas graças a vocês isso foi possível!

Agradeço ao meu amigo e colega de equipe “menino-Finlândia” Gunnar Gräsbeck, que nessa reta final do mestrado foi essencial para manter motivada, tanto com a pesquisa quanto nos treinos de esgrima. Obrigada por todas as conversas sobre carreira e pesquisa ao redor do mundo, por me ensinar tanto sobre aprendizagem motora, pelos *sparrings* e pelas sessões de Super Smash Bros.

Obrigada a minha “mãe-esportiva” Camila Rodrigues por me acolher e me aconselhar desde quando era apenas uma criança. Você sempre me incentivou a

seguir trabalhando duro para alcançar os meus sonhos, sejam eles uma classificação para os Jogos Panamericanos ou “para entender melhor as mitocôndrias”.

Também agradeço aos meus colegas dos tempos de EEFE, Fabio Fabregas, Luccas de Faria, Amanda Drezza, Thomas Costa, Pedro Palma e André Casanova. E ao Pedro Henrique Santos, que tive a felicidade de conhecer durante a pós-graduação e que me aguentou por meses reclamando dos experimentos que não estavam dando certo.

Por fim, gostaria de agradecer aos professores Guilherme Artioli, Julio César Batista Ferreira, Patricia Chakur Brum, Emerson Franchini e Soraia Chung Saura. Todos foram uma inspiração ou incentivaram a me aventurar na ciência. Sem o exemplo e a orientação de vocês eu jamais estaria aqui.

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Também agradeço as seguintes agências de fomento, pelo financiamento parcial desse trabalho:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2015/04090-0 e 2021/03066-9);
- e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 313274/2018-5).

This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

Carl Sagan

RESUMO

De Camargo Rodrigues, M. R. Efeitos da inibição farmacológica de MuRF1 em associação a eletroestimulação neuromuscular na massa e força do músculo esquelético. [dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2022

O estímulo mecânico é essencial para a manutenção da saúde muscular, sendo oferecido principalmente por meio da realização de exercícios físicos, em particular através dos resistidos. Entretanto em alguns quadros clínicos a realização dessas atividades é comprometida, sendo necessária a aplicação de tratamentos auxiliares para mitigar a perda de massa muscular como é o caso da estimulação elétrica neuromuscular (NMES). Na ausência desses estímulos ocorre o processo de perda de massa muscular, orquestrado principalmente por enzimas ligadoras de ubiquitina (conhecidas como E3-ligases) como é o caso da MuRF1. A pequena molécula inibidora de MuRF1, MyoMed-205, emergiu como uma nova estratégia farmacológica capaz de atenuar o processo de atrofia muscular e manter a função contrátil desse tecido, em modelos notadamente conhecidos por promover a perda de massa. O presente trabalho se propôs a investigar uma outra linha: o MyoMed-205 como uma estratégia farmacológica para a promoção do ganho de massa muscular e força. Inicialmente investigamos se haveria um efeito aditivo na hipertrofia e força promovida pela NMES associando-a com a utilização do MyoMed-205. Entretanto nossos dados apontam que a utilização do MyoMed-205 por si só (portanto, sem a associação com a NMES), gera o aumento de aproximadamente 20% da área de secção transversal (AST) das fibras musculares dos músculos tibial anterior e sóleo. Além disso detectamos um incremento de aproximadamente 40% no número de mionúcleos das fibras musculares do tibial anterior e uma elevação de 40% na carga máxima relativa nos indivíduos tratados com MyoMed-205. Esses dados demonstram que não há um efeito aditivo da utilização da pequena molécula em associação com a NMES. Na

segunda etapa do trabalho buscamos caracterizar o efeito da pequena molécula na hipertrofia e prevalência de diferentes tipos de fibra muscular (MHC I e MHC II) e na proliferação de células satélite (Pax7 e MyoD). A utilização do MyoMed-205 gerou o aumento de 28% na AST de fibras MHC I e 12% em fibras MHC II, sem alterações relativas à prevalência desses dois tipos de fibra. Já em relação a quantidade de mionúcleos positivos para Pax7 e MyoD, observamos que indivíduos tratados com MyoMed-205 apresentaram um aumento, respectivamente, de 66% e 92% dessas populações de células satélite. A partir desses dados concluímos que a pequena molécula inibidora de MuRF1 *per se* é capaz de promover a hipertrofia, observada pelo aumento da AST tanto de fibras MHC I quanto MHC II, aumento da quantidade de células satélite e força.

Palavras-chave: músculo esquelético, MuRF1, atrogenes, hipertrofia, eletroestimulação neuromuscular

ABSTRACT

De Camargo Rodrigues, M. R. Small-molecule inhibition of MuRF1 in association with neuromuscular electrostimulation – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2022

Mechanical overload is essential for maintaining muscular health, being offered mainly through resistance exercise. However, in some clinical conditions, the performance of these activities is compromised, requiring the application of auxiliary treatments to mitigate muscle wasting such as neuromuscular electrical stimulation (NMES). In the absence of these stimuli, the process of muscle loss occurs, controlled mainly by ubiquitin-binding enzymes (known as E3-ligases), such as MuRF1. The small molecule MuRF1 inhibitor, MyoMed-205, has emerged as a new pharmacological strategy capable of lowering the process of muscle wasting and maintaining the contractile function of this tissue, in models notably known for promoting muscle atrophy. The present work aimed to investigate another line: MyoMed-205 as a pharmacological strategy for promoting hypertrophy and muscle strength increase. Initially, we investigated whether there would be an additive effect on muscle mass gain and strength promoted by NMES by associating it with an animal chow enriched with MyoMed-205. However, our data indicate that the use of MyoMed-205 itself (therefore, without association with NMES), generates an increase of approximately 20% in the cross-sectional area (CSA) of the muscle fibers of the tibialis anterior and soleus muscles. Furthermore, we detected an increase of approximately 40% in the number of myonuclei in the tibialis anterior muscle fibers and a 40% improve in the maximum relative load in individuals treated with MyoMed-205. These data demonstrate that there is no additive effect of using the small molecule in association with NMES. In the second stage of the work, we sought to characterize the effect of the small molecule on the hypertrophy and prevalence of different types of muscle fiber (MHC I and MHC II) and on the proliferation of satellite cells (Pax7 and MyoD). The use of MyoMed-205 generated an increment of 28% in MHC I fibers CSA and 12% in MHC II fibers CSA, without changes in the prevalence of these two types of fiber. Regarding the number

of myonuclei positive for Pax7 and MyoD, we observed that individuals treated with MyoMed-205 showed an accretion, respectively, of 66% and 92% of these satellite cell populations. From these data we conclude that the small molecule inhibitor of MuRF1 *per se* can promote hypertrophy, observed by the raise in both MHC I and MHC II fibers CSA, an increase in the number of satellite cells and strength gain.

Keywords: skeletal muscle, MuRF1, atrogenes, hypertrophy, neuromuscular electrostimulation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura básica do sarcômero. Adaptado de Mukund & Subramanian (2020).....25
- Figura 2** - Representação dos diversos estímulos capazes de inicializar o processo de síntese proteica no músculo estriado. Adaptado de Schiaffino e colaboradores (2013).....27
- Figura 3** - Processo de ubiquitinação. A ação de enzimas ativadoras, carreadoras e ligadoras de ubiquitina resultam na marcação de proteínas-alvo, que posteriormente serão degradadas pelo proteassoma 26S. Ilustração produzida pela autora por meio do site <https://www.biorender.com>29
- Figura 4** - Esquema simplificado das vias atuantes no músculo esquelético reguladas pelos fatores de transcrição FoxO. Uma vez que a Akt é reduzida, FoxO é transportada para o interior do núcleo, onde induzirá a expressão de genes atrofícos relacionados ao sistema ubiquitina-proteassoma e autofágico-lisossomal. Ilustração produzida pela autora utilizando o website Biorender.com. Adaptado de Sandri (2013) e Yin e colaboradores (2021).30
- Figura 5** - Linha do Tempo do experimento. Ilustração produzida pela autora através do website <https://www.biorender.com>.....41
- Figura 6** - (A) Representação do aparato de eletroestimulação. 1: eletrodo de input é introduzido no ponto motor do tibial anterior; 2: eletrodo de output introduzido na inserção distal do tibial anterior; 3: fio (6 PA) fixado na porção distal do membro inferior esquerdo do animal (utilizado somente nos testes de força. Detalhes adiante); 4: polia; 5: cinto de fixação do corpo do animal; 6. Trava estabilizadora do tornozelo. (Ilustração: André Cruz)42

Figura 7 - (A) Detalhe do posicionamento do eletrodo na pata esquerda do animal, em uma sessão de eletroestimulação. O eletrodo input é identificado pela cor preta enquanto o output é de cor vermelha. (B) Camundongos durante sessão de eletroestimulação. É possível realizar o treinamento em quatro camundongos de maneira simultânea.44

Figura 8 - Vista lateral do aparato demonstrando os ângulos das articulações e as distâncias do membro inferior esquerdo do camundongo, da polia e da carga. (Ilustração: André Cruz)45

Figura 9 - (A) Média da massa corporal dos animais antes da intervenção (Pré) e após (Pós); (B) Evolução da massa corporal nos 35 dias de experimento. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (SEM); ** $p < 0,005$ vs. Pré; *** $p < 0,0005$ vs. Pré; $n = 8-9$ animais/grupo50

Figura 10 - (A) Medida absoluta da massa da carcaça dos animais. (B) Medida relativa da massa da carcaça dos animais normalizada pela massa corporal total. Os valores estão expressos em média \pm SD. ** $p < 0,005$ vs. CTR; \$ $p < 0,05$ vs. 205. $n = 8-9$ animais/grupo.....51

Figura 11 - (A) Medida absoluta da massa gorda dos animais. (B) Medida relativa da massa gorda dos animais normalizada pela massa corporal total. Os valores estão expressos em média \pm SD.51

Figura 12 - (A) Medida do comprimento naso-anal. (B) Medida do comprimento da tíbia. Os valores estão expressos em média \pm SD. $n = 8-9$ animais/grupo52

Figura 13 - (A) Medida absoluta da massa úmida do TA; (B) Medida relativa da massa úmida do TA, normalizada pela massa corporal; ** $p < 0,005$; os valores estão expressos em média \pm SD. $n = 8-9$ animais/grupo.....53

Figura 14 – (A) Medida absoluta da massa úmida do sóleo; (B) Medida relativa da massa úmida do sóleo, normalizada pela massa corporal; os valores estão expressos em média \pm SD. n=8-9 animais/grupo54

Figura 15 - Resultados dos Testes de Força. O primeiro teste foi conduzido 48h antes do início do tratamento com MyoMed-#205 ou com a ração controle. Já o segundo teste foi realizado após 33 dias do início da intervenção. (A) Carga absoluta erguida pelos animais. (B) Carga Relativa do Teste Máximo, normalizada pela massa corporal total dos camundongos. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. **** p < 0,0001 vs. CTR; \$\$ p < 0,005 vs. #205; & p < 0,05 vs. NMES. n=8-9 animais/grupo55

Figura 16 - Resultados da análise histológica do TA. (A) Fotomicrografias representativas do TA dos grupos CTR, #205, NMES e NMES+#205. Aumento 200x; (B) Histograma de frequência da AST das fibras do TA; (C) Média da AST das fibras analisadas do TA. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. **** p < 0,0001 vs. CTR. Foram analisadas em média 1600 fibras musculares por grupo57

Figura 17 - Resultados da análise histológica do sóleo. (A) Fotomicrografias representativas do sóleo dos grupos CTR e #205. Aumento 200x; (B) Histograma de frequência da AST das fibras presentes no sóleo; (C) Média da AST das fibras do músculo sóleo. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. **** p < 0,0001 vs. CTR. Foram analisadas em média 1600 fibras musculares por grupo58

Figura 18 - Resultados da análise por imunofluorescência do músculo TA. (A) Fotomicrografias representativas do TA dos grupos CTR, #205, NMES e NMES+#205. Em branco está marcada a laminina e em azul, DAPI. Aumento 200x; (B) Média do número de mionúcleos por fibra muscular. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,001 vs. CTR.60

Figura 19 – Resultados da área de secção transversal das fibras musculares positivas para MHC I e II do músculo sóleo. (A) Fotomicrografias representativas do sóleo dos

grupos CTR e #205. Em vermelho temos a marcação de fibras MHC I positivas, em verde fibras MHC II positivas e em branco, laminina. Aumento 200x; (B) Média da AST das fibras MHC I positivas do músculo sóleo; (C) Média da AST das fibras MHC II positivas do músculo sóleo. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$ vs. CTR.62

Figura 20 - Resultados da prevalência de fibras musculares positivas para MHC I e II do músculo sóleo. (A) Fotomicrografias representativas do sóleo dos grupos CTR e #205. Em vermelho temos a marcação de fibras MHC I positivas, em verde fibras MHC II positivas e em branco, laminina. Aumento 50x; (B) Porcentagem das fibras MHC I positivas do músculo sóleo; (C) Porcentagem das fibras MHC II positivas do músculo sóleo. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média.....63

Figura 21 – Resultado da quantificação de mionúcleos Pax7⁺ no músculo TA. (A) Demonstração do ensaio de imunofluorescência para a determinação dos mionúcleos positivos para Pax7⁺. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Os mionúcleos contabilizados estão indicados pelas setas amarelas, onde é possível observar a colocalização com Pax7 resultando na cor rosa. Só foram quantificados os núcleos que se situavam abaixo da lâmina basal. Aumento 400x; (B) Média do número de mionúcleos Pax7⁺ a cada 100 fibras. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs. CTR; *** $p < 0,001$ vs. CTR.65

Figura 22 – Resultado da quantificação de mionúcleos MyoD⁺ no músculo TA. (A) Demonstração do ensaio de imunofluorescência para a determinação dos mionúcleos positivos para MyoD⁺. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Os mionúcleos contabilizados estão indicados pelas setas amarelas, onde é possível observar a colocalização com MyoD resultando na cor rosa. Só foram quantificados os núcleos que se situavam abaixo da lâmina basal. Aumento 400x; (B) Média do número de mionúcleos MyoD⁺ a cada 100 fibras. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,005$ vs. CTR.....67

Figura 23 – (A) Medidas do consumo (média individual) de ração ao longo dos 35 dias de experimento. (B) Consumo médio de ração dos grupos experimentais durante o

experimento. Os valores estão expressos em média \pm SD. \$ p < 0,05 vs. #205. n=8-9
animais/grupo.....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
ACSM	<i>American College of Sports Medicine</i>
Akt	<i>Protein kinase B</i>
ANOVA	Análise da Variância
AST	Área de secção transversal
ATP	Adenosina Trifosfato
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilidol
DGC	<i>Dystrophin-glycoprotein complex</i> , Complexo Distrofina-Glicoproteína
DGK ζ	<i>Diacylglycerol kinase-zeta</i> , Diacilglicerol quinase zeta
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
FoxO	<i>Forkhead Box O</i>
GABARAP	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase-3 beta</i>
H&E	Hematoxilina & Eosina
HDAC4	<i>Histone deacetylase 4</i>
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>

KO	<i>Knock-out</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i>
MAFbx	<i>Muscle Atrophy F-box</i>
MET	<i>Metabolic Equivalent for Task</i>
MHC	<i>Myosin heavy-chain</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
MuRF	<i>Muscle RING finger</i>
MyoD	<i>Myoblast determination protein 1</i>
NMES	<i>Neuromuscular Eletrostimulation</i>
p70S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
Pax7	<i>Paired box protein Pax-7</i>
PBS-T	<i>phosphate-buffered saline - Tween 20</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
qPCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , espécies reativas de oxigênio
RyR	<i>Ryanodine Receptor</i> , receptor de Rianodina
SARM	<i>Selective androgen receptor modulator</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
TA	Músculo Tibial Anterior

UPS

Ubiquitin-Proteasome System

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Lista de anticorpos primários para marcação de miosinas de cadeia pesada por imunofluorescência46
- Tabela 2** – Lista de anticorpos secundários para marcação de miosinas de cadeia pesada por imunofluorescência.....47
- Tabela 3** – Lista de anticorpos primários para marcação de miosinas de células-satélites por imunofluorescência48
- Tabela 4** – Lista de anticorpos secundários para marcação de células-satélites por imunofluorescência48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Aspectos gerais do músculo estriado-esquelético	24
2.2 Mecanismos de degradação e síntese proteica no músculo estriado-esquelético.....	26
2.3 Stress mecânico e sua importância para manutenção da saúde muscular	30
2.4 Estimulação Elétrica Neuromuscular e sua aplicação na clínica como indutor do processo de contração muscular	32
2.5 Estratégias farmacológicas para promoção de hipertrofia e redução do processo atrofico.....	34
2.6 Composto MyoMed-205: um novo inibidor seletivo de MuRF1 para mitigar quadros atroficos.....	34
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 Objetivo geral.....	38
4.2 Objetivos Específicos.....	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Animais e considerações éticas.....	39
5.2 Desenho experimental	39
5.3 Protocolo de eletroestimulação	42
5.4 Teste de função	44
5.5 Análise morfológica quantitativa.....	45
5.6 Imunofluorescência para marcação de miosina de cadeia pesada (MHC)	46
5.7 Imunofluorescência para marcação de células satélites	47
5.7 Quantificação de mionúcleos	48
5.8 Análise dos Resultados.....	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1 Medidas Morfométricas.....	49
6.3 Teste de Função Muscular.....	54
6.4 Medida de Área de Secção Transversal	56
6.5 Número de Mionúcleos	59

6.6 Medida de Área de Secção Transversal Específica e de prevalência de fibras MHC I e MHC II.....	61
6.7 Quantificação de células-satélite.....	64
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÕES.....	75
9. REFERÊNCIAS.....	76
10. ANEXOS	85
10.1 Anexo 1: Consumo de ração.....	85
10.2 Anexo 2: Composição básica e tabela nutricional da ração Rhosterlab Manutenção	86

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas a comunidade científica tem se debruçado sobre questões envolvendo o exercício físico a fim de compreender seus impactos para a saúde humana e animal. Atualmente sabemos que o exercício físico é reconhecido como uma estratégia não farmacológica para o manejo de doenças crônicas, tais como diabetes, hipertensão e obesidade (1). Ademais, a realização de atividades físicas de maneira consistente durante a vida é correlacionada com maior autonomia e qualidade de vida na terceira idade (2–5).

O exercício físico, ou seja, a prática sistemática de atividades físicas, é capaz de desencadear uma série de respostas bioquímicas ao organismo, tais como aumento de captação de glicose pelo tecido muscular, liberação das chamadas miocinas (citocinas secretadas pelo músculo capazes de mediar a comunicação entre esse tecido com outros órgãos e o tecido adiposo), aumento da mobilização e oxidação de ácidos graxos, biogênese mitocondrial e maior capilarização (6,7).

Uma das respostas mais notáveis ao exercício físico diz respeito ao *turnover proteico*, o balanço entre síntese e degradação de proteínas. Em particular, o exercício de força (ou exercício resistido, da tradução a partir de *resistance exercise*) é uma valiosa ferramenta capaz de modular o turnover proteico do músculo, além de promover outras adaptações celulares como aumento do conteúdo de mionúcleos, células-satélite e melhorar a eficácia e capacidade traducional (8).

No exercício resistido, o estímulo mecânico é convertido em sinais químicos capazes de induzir a ativação de vias moleculares que culminarão com o aumento da síntese de novas proteínas musculares, aumentando a área de secção transversal das fibras musculares com concomitante melhoria da capacidade de geração de força e potência (9). Destaca-se que o desenvolvimento de capacidades físicas como essas não é de valia apenas para atletas de alto rendimento, como também para indivíduos não-atletas em especial quando lidamos com o envelhecimento (1–3).

Apesar de todos os benefícios do exercício, existem indivíduos que apresentam dificuldades em incorporar sua prática no dia a dia, seja por razões relacionadas a limitações físicas, econômicas e socioculturais (10,11). Alguns grupos como pacientes acamados, com membros imobilizados e indivíduos com lesão

medular são exemplos de populações com restrições físicas parciais e até mesmo total (como no caso de pessoas com lesões medulares com perda total de movimento) para a realização de exercício físico. Esses indivíduos apresentam os denominados atrogenes, mais expressos principalmente nos períodos iniciais da indução da inatividade muscular (12). Atrogenes (ou *atrogins*) é um termo utilizado por Lecker e colaboradores em 2004 para se referir a um conjunto de genes que apresentam um perfil transcripcional comum em resposta a diferentes condições atroficas (13,14). Dentre esses estão MuRF1 e MAFbx/atrogin-1, agentes que se encontram com expressão aumentada em diferentes condições atroficas (15–17).

A eletroestimulação neuromuscular (NMES) é uma das ferramentas utilizadas na prática clínica para o manejo desses quadros, pois são capazes induzir o processo de contração muscular (18). Assim, vias anabólicas, tais como o complexo 1 da mTOR (mTORC1), são expressas com a expectativa de reduzir a atividade de vias associadas à proteólise (19).

Pequenas-moléculas (*small molecules*) atualmente são utilizadas no tratamento de doenças, em especial no tratamento de cânceres, por conta de algumas vantagens quando comparadas a fármacos constituídos por macromoléculas (20). Dentre essas vantagens podemos destacar aspectos relacionados a farmacocinética (drogas feitas a partir de pequenas-moléculas penetram facilmente pela membrana plasmática devido a seu peso molecular diminuto), facilidade na administração, adesão dos pacientes ao tratamento, armazenamento dos fármacos e custos (20).

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a compreender os efeitos da utilização de uma pequena-molécula desenhada para atuar em um aspecto particular da atividade do atrogene MuRF1 (21,22). No caso, trata-se da inibição de sua dimerização, que é fundamental para sua ação em proteínas miofibrilares, como no caso da titina (23). A titina é uma proteína sarcomérica gigante responsável por mediar a interação com outras proteínas miofibrilares, garantindo a manutenção da estrutura do sarcômero (24). A região COOH-terminal A168 – 170 da titina interage com MuRF1, afetando a estabilidade da linha-M e desta forma, perturbando a organização dos miofilamentos (25,26).

Nosso grupo de pesquisa e nossos colaboradores têm empregado essa pequena-molécula capaz de realizar a inibição seletiva de MuRF1, denominada

MyoMed-205, em estudos envolvendo modelos notadamente conhecidos por promover a atrofia do músculo com resultados positivos na preservação da massa e da função, sem apresentar efeitos colaterais conhecidos (21).

Não sabemos até o momento se a inibição parcial de MuRF1 seria também capaz de promover hipertrofia e se teria alguma interação com modelos notadamente conhecidos por gerar aumento de massa muscular e de função contrátil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do músculo estriado-esquelético

O músculo esquelético é um dos tecidos mais plásticos e dinâmicos do nosso organismo. Em humanos, ele compreende aproximadamente 40% da nossa massa corporal total e contém aproximadamente 50 a 75% das nossas proteínas corporais. É de fundamental importância para proporcionar a movimentação dos organismos. Os músculos são fixados ao esqueleto e convertem energia química em energia mecânica capaz de gerar a força, produzindo movimentos. Ademais, esse tecido possibilita a realização de mecanismos essenciais tais como a respiração, alimentação e a homeostase de aminoácidos, glicose e lipídios (27).

As células musculares (miócitos) têm aspecto cilíndrico, e apresentam múltiplos núcleos. São constituídas por subunidades denominadas miofibrilas, que se organizam na estrutura celular básica que possibilita o processo de contração muscular: o sarcômero, compondo a região miofibrilar do miócito (Figura 1). Os sarcômeros apresentam uma distribuição muito particular de filamentos finos e grossos, que correm em um eixo paralelo de maneira longitudinal, visualizados por meio de microscopia eletrônica (28,29). A interação entre os filamentos finos e grossos possibilita o processo de contração muscular.

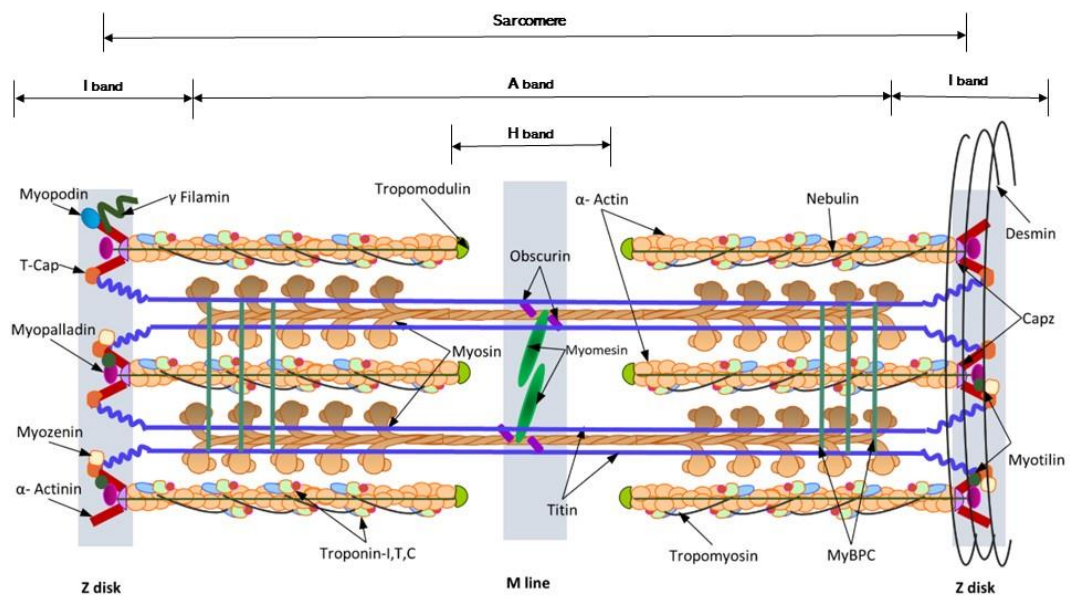


Figura 1 - Estrutura básica do sarcômero. Adaptado de Mukund & Subramanian (2020)

Filamentos finos são compostos majoritariamente por alfa-actina que se associam a outras proteínas que facilitam o processo de contração, tais como troponina (e suas subunidades TNN-I, TNN-C e TNN-T), tropomiosina, tropomodulina e nebulina. Filamentos grossos por sua vez são compostos por miosina associada a outras proteínas tais como *miosin binding proteins* (MyBPs), que apresentam função majoritariamente estrutural (30).

Além dessas proteínas, filamentos grossos também são compostos por uma proteína de alto peso molecular (> 3MDa) denominada titina. A titina se estende por meio sarcômero, correspondendo a região que abrange ao disco-Z à linha-M (31). Tem importância particular por atuar modulando forças passivas no sarcômero, devido ao seu componente elástico capaz de modular a tensão ativa. Ademais, a titina também é responsável por mediar a interação com outras proteínas miofibrilares e com diversos outros mecanismos, tais como ligação a proteínas chaperonas, íons de cálcio e promovendo modificações pós-traducionais (24).

Para além das miofibrilas, as células musculares também possuem outros componentes em seu citoplasma (sarcoplasma, no caso dessas células). Dentre eles estão os túbulos T e o retículo sarcoplasmático, cujos papéis estão relacionados, respectivamente, à condução do sinal nervoso para o interior do miócito e no estoque,

lançamento e captação de Ca^{2+} , essenciais para que ocorra o processo de contração muscular (30).

Outras organelas de destaque no músculo estriado esquelético são as mitocôndrias, que formam redes no interior da fibra muscular. Essas estruturas são fundamentais para suprir a demanda energética que o tecido exige, que encontra-se aumentada quando há atividade contrátil (6). Atualmente sabemos que a disfunção mitocondrial está relacionada à perda muscular observada em doenças como câncer, diabetes, obesidade e na sarcopenia (32).

O tecido muscular estriado-esquelético também possui uma característica muito particular: sua capacidade de regeneração. Esse processo é possível graças a presença de células-satélites, que são células pluripotentes localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema, confinadas em estruturas denominadas nichos. Elas permanecem em estado quiescente, porém quando são ativadas (quando existe uma lesão, por exemplo) rapidamente se proliferam e se diferenciam. Células-satélites ativas são caracterizadas pela elevada expressão de Pax7 e de *myogenic regulation factors* (MRFs), como MYOG1 e MyoD (29).

2.2 Mecanismos de degradação e síntese proteica no músculo estriado-esquelético

O músculo esquelético é mantido por mecanismos de degradação e síntese proteica, caracterizando um dos aspectos da plasticidade muscular. Esses processos resultam respectivamente na atrofia e hipertrofia do músculo. Dada essa plasticidade, o tecido muscular é um interessante modelo para o estudo do crescimento celular dentro do campo da Biologia Celular (33).

A hipertrofia é o aumento da massa muscular, usualmente mensurada através da massa (úmida e em alguns casos, seca) ou da área de secção transversal (*cross-sectional area* ou AST). A AST pode ser medida tanto de maneira macroscópica através de técnicas ressonância magnética e ultrassonografia ou microscópica, por meio da medição da AST individual das fibras musculares que compõe o músculo (33).

Atualmente sabemos que o processo de hipertrofia muscular decorre em resposta a estímulos mecânicos, hormonais e nutricionais. Ela ocorre quando a taxa

de síntese proteica excede a taxa de degradação proteica. As duas principais vias de sinalização celular envolvidas no crescimento celular pós-embriônico são a *insulin-like growth factor 1–Akt/protein kinase B–mammalian target of rapamycin* (IGF1–Akt–mTOR), que atua como um regulador positivo do crescimento muscular (34). A representação dessas vias encontra-se esquematizada na figura 2.

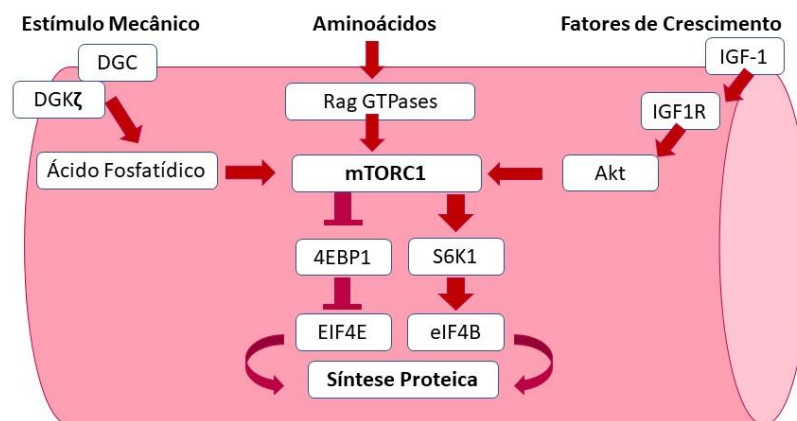


Figura 2 - Representação dos diversos estímulos capazes de inicializar o processo de síntese proteica no músculo estriado. Adaptado de Schiaffino e colaboradores (2013)

Na via IGF-1-Akt-mTOR a taxa de síntese proteica é controlada por uma cascata de sinalização envolvendo fatores de crescimento tais como IGF-1, que promove ativação de fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K) e Akt, que por sua vez ativa o complexo 1 de mTOR (mTORC1). mTORC1 estimula a síntese proteica através da fosforilação de *eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins* (4EBP) e *ribosomal S6 protein kinase 1* (S6K1). Entretanto, mTORC1 também pode ser ativada por outros fatores tais como aminoácidos, por meio de Rag GTPases, e pelo ácido fosfatídico sintetizado pela diacilglicerol quinase zeta (DGKζ) em resposta ao stress mecânico, dentre outros que se encontram em processo de caracterização pela comunidade científica (33).

Dentre os mecanismos de degradação temos o sistema autofágico/lisossomal, proteassomal (gerido pelo sistema ubiquitina-proteassoma, ou em inglês *ubiquitin-proteasome system*, chamado pela sigla UPS), sistema proteolítico dependente de cálcio (cuja a ação é dependente de calpaínas) e caspases (ligado ao processo de apoptose celular) (29). Os sistemas autofágico/lisossomal e UPS em particular são conhecidos como dois dos maiores sistemas de controle de qualidade celular, eliminando proteínas e organelas disfuncionais. Enquanto o sistema autofágico é responsável por degradar grandes estruturas citosólicas e agregados celulares, o UPS lida majoritariamente com cadeias polipeptídicas (35).

No Sistema Ubiquitina-Proteassoma o processo de degradação proteica é orquestrado pelo proteassoma 26S (Figura 3). Para que o alvo seja reconhecido pelo proteassoma é necessária a sucessiva marcação de pequenas proteínas denominadas ubiquitinas (Ub). Essa ação é mediada pelas enzimas E1, E2 e E3 (E3 ligases). As E1 são as enzimas ativadoras de ubiquitina, já as E2 são as conjugadoras, responsáveis por carregar as ubiquitinas para que sejam ligadas pelas enzimas E3 (as ligases de ubiquitina) ao alvo (16). É importante destacar que o processo ubiquitinação de uma proteína não necessariamente resulta em sua degradação. Dependendo de resíduos de serina associados as ubiquitinas diferentes tipos de cadeia são gerados, cujos papéis biológicos são distintos. É o chamado “Código das Ubiquitinas” (*ubiquitin code*) (36). Em relação aos destinos possíveis para proteínas poliubiquitinadas temos as vias de degradação, que podem ser tanto mediadas pelo proteassoma (detalhado mais a diante) quanto também em vias associadas ao sistema autofágico lisossomal (35).

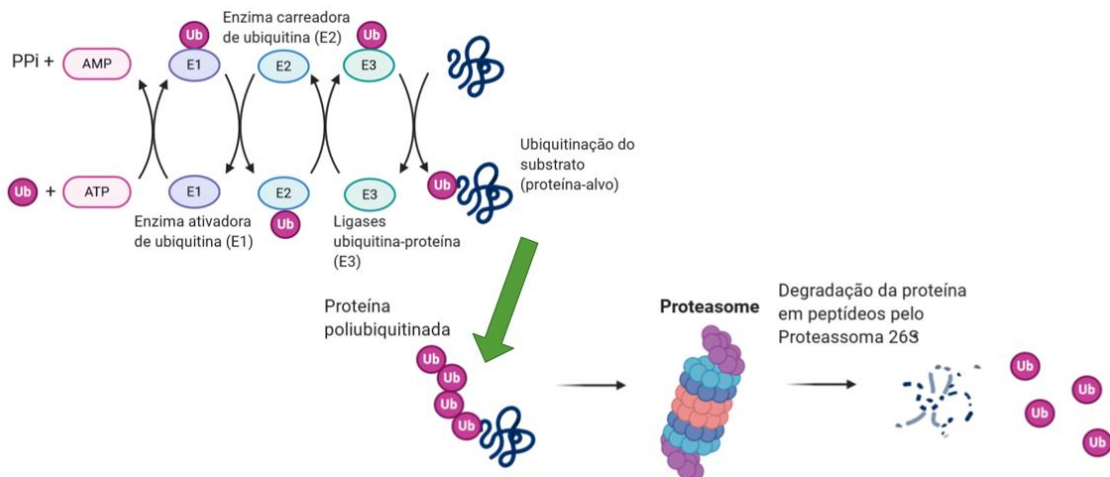


Figura 3 - Processo de ubiquitinação. A ação de enzimas ativadoras, carreadoras e ligadoras de ubiquitina resultam na marcação de proteínas-alvo, que posteriormente serão degradadas pelo proteassoma 26S. Ilustração produzida pela autora por meio do site <https://www.biorender.com>

Em estudos passados realizados em roedores, observou-se o aumento anormal da expressão de mRNA de duas E3 ligases quando esses animais foram submetidos a modelos notadamente capazes de gerar atrofia muscular, como imobilização e denervação. Atualmente sabemos que essas duas E3 ligases apresentam grande destaque para a degradação proteica no músculo estriado. São elas: MAFbx/atrogin-1 e *muscle RING-finger protein 1* (MuRF1). A expressão dessas E3 ligases dependem da ativação dos fatores de transcrição FoxO, que por sua vez são regulados pela via Akt-mTOR. Quando há uma redução da atividade da Akt-mTOR, os fatores de transcrição FoxO são transportados para o núcleo e induzem a transcrição não apenas dos genes atrofícos MuRF1 e atrogin-1, como também genes ligados ao sistema autofágico-lisossomal como Bnip3 e LC3 (34,37,38). Para representação através de um diagrama, observar figura 4.

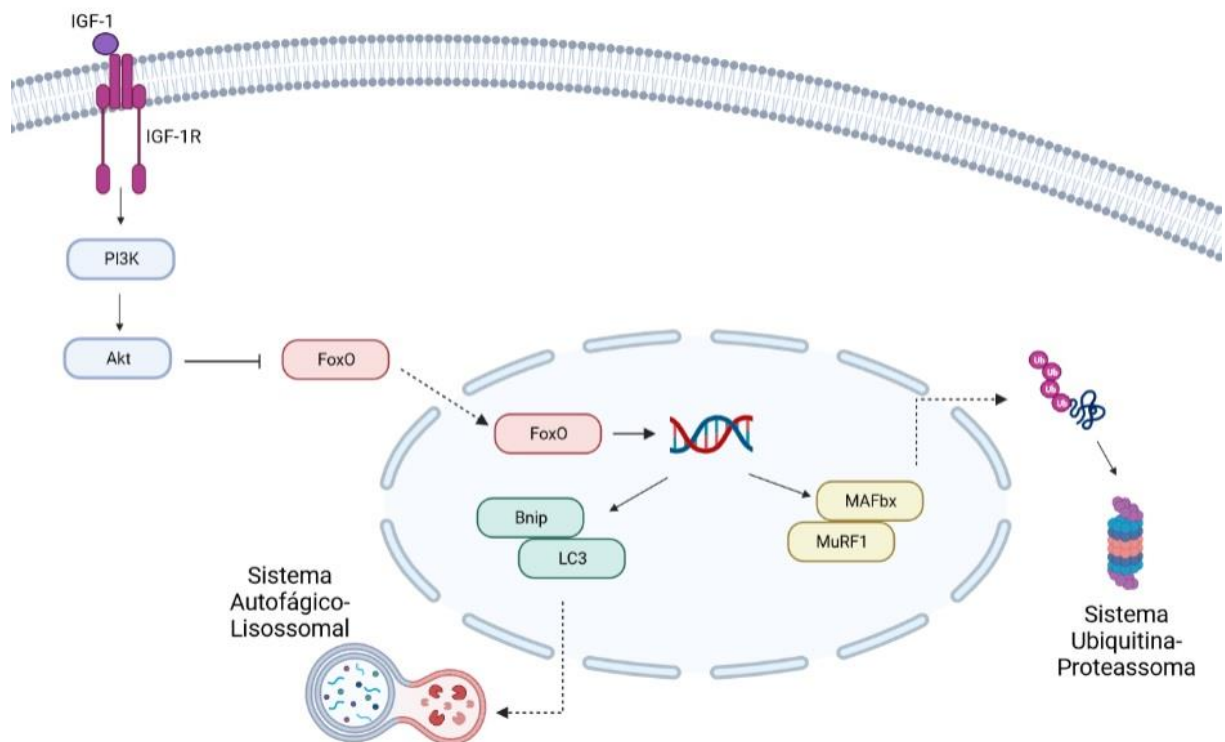


Figura 4 - Esquema simplificado das vias atuantes no músculo esquelético reguladas pelos fatores de transcrição FoxO. Uma vez que a Akt é reduzida, FoxO é transportada para o interior do núcleo, onde induzirá a expressão de genes atrofícos relacionados ao sistema ubiquitina-proteassoma e autofágico-lisossomal. Ilustração produzida pela autora utilizando o website Biorender.com. Adaptado de Sandri (2013) e Yin e colaboradores (2021).

MAFbx/atrogin-1 e MuRF1 tem a capacidade de poliubiquitar proteínas que serão degradadas pelo proteassoma 26S (17, 23). Em condições saudáveis, há um equilíbrio entre síntese e degradação proteica. Entretanto, com estabelecimento algumas doenças, imobilização e queimaduras há um desbalanceamento: as vias atrofícas são mais expressas, levando a perda progressiva de massa muscular (39). Em condições de degradação proteica exacerbada, percebe-se uma expressão aumentada dos atrogenes MuRF1 e MAFbx/atrogin-1 (16).

2.3 Stress mecânico e sua importância para manutenção da saúde muscular

A realização de exercícios resistidos são a principal maneira de promover o aumento de síntese proteica e a hipertrofia muscular. Regimes de treinamento que incorporam esses exercícios são capazes de modular não apenas o desempenho

nessas atividades como também a regulação de genes e proteínas que controlam a plasticidade do músculo esquelético. Essas atividades envolvem a rápida disponibilização de cálcio e ativação de intracelulares, notadamente a via Akt-mTOR. Uma vez ativada, a mTOR aciona seus dois complexos (mTORC1 e mTORC2) que relacionam-se com a tradução de mRNA, biogênese ribossomal e metabolismo de nutrientes. Neste contexto, as principais proteínas fosforiladas pelo complexo 1 da mTOR são a p70S6K e a 4EBP1, que são fundamentais para a sinalização dos processos que resultarão na tradução de proteínas que irão promover o aumento de síntese proteica e conseqüentemente a hipertrofia muscular (29).

O processo de mecanotransdução é essencial para ativação da Akt-mTOR, que constitui a conversão de sinais mecânicos em sinais bioquímicos. Isso ocorre quando o músculo é submetido ao estiramento ou sobrecarga externa (como no caso do exercício resistido) (9,40). Estruturas que conectam a membrana sarcoplasmática com o citoesqueleto são essenciais nesse processo de mecanotransdução, em especial o complexo distrofina-glicoproteína (DGC) e complexo de adesão integrina. Além disso, a literatura aponta alguns candidatos na estrutura do sarcômero que também auxiliariam nesse processo, dentre eles estão os costâmeros, a proteína gigante titina e filamina-C e Bag3 (9,24). Além de proteínas sarcoméricas, o processo de mecanotransdução poderia ser realizado por proteínas que ancoram o mionúcleos ao citoesqueleto, sendo assim a deformação mionuclear também poderia colaborar para a conversão dos sinais (9).

Além de proporcionar o processo de mecanotransdução, atualmente está sendo descrita na literatura a conexão entre o exercício físico e processos de degradação proteica. Como descrito no tópico anterior, em condições de degradação proteica excessiva observa-se o aumento da expressão de atrogenes bem como da atividade do proteassoma, a principal estrutura que orchestra o processo de degradação via UPS. No entanto, em alguns quadros tais como no envelhecimento nota-se o efeito oposto: a diminuição da atividade do proteassoma. Esse fato seria um indicativo de que haveria correlação com a piora do “controle de qualidade celular”, gerando conseqüentemente o acúmulo de proteínas danificadas e organelas disfuncionais (41). Evidências recentes demonstram que o exercício físico é capaz de modificar o processo de ubiquitinação e fosforilação do proteassoma, resultando em maior ativação dessa segunda estrutura e assim contribuindo para a regulação a

eliminação de proteínas disfuncionais e promovendo o processo de remodelamento muscular em resposta ao *stress* imposto (41).

2.4 Estimulação Elétrica Neuromuscular e sua aplicação na clínica como indutor do processo de contração muscular

Uma das principais maneiras de se gerar o estímulo mecânico necessário para suscitar a hipertrofia é através do exercício físico, em especial o treinamento resistido, como vimos anteriormente (9). Todavia, pessoas com lesões medulares, com lesões ortopédicas e pacientes acamados podem apresentar dificuldades (ou até mesmo não conseguir) desempenhar essas atividades. Uma das ferramentas para promover o estímulo mecânico nessas populações é através do uso da eletricidade (42–45) .

A realização de aplicação de eletricidade para produção de movimento foi utilizada pela primeira vez por Luis Galvani, em 1790. O cientista observou que a ocorrência de movimentos após a aplicação de corrente elétrica nas patas de sapos mortos. No início do século XX, Liberson e colaboradores (1961) aplicaram corrente elétrica para estimulação do nervo peroneal em pacientes hemiparéticos pós-ocorrência de AVC, com o objetivo de corrigir o posicionamento dos pés durante a marcha (18).

O uso da estimulação elétrica ganhou espaço na prática clínica, seja para promover analgesia, acelerar processo de regeneração de tecidos, reduzir edemas e recuperar função (18,46–48). Usualmente é empregada de três maneiras. A primeira é na forma de estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS, *transcutaneous electrical nerve stimulation*) e estimulação elétrica neuromuscular (NMES, *neuromuscular electrical stimulation*). TENS é utilizada para analgesia, sendo aplicada em baixas frequências que variam entre 2 e 10Hz. NMES por sua vez emprega frequências elevadas (na clínica aplica-se 20 até 50Hz) gerando contrações musculares e tetania (18).

A utilização da NMES em idosos demonstrou-se eficaz para promoção de função (aumento de força e no desempenho de tarefas) e no aumento de fibras do tipo II, aquelas que notadamente diminuem com o envelhecimento (49).

Em indivíduos jovens e saudáveis, sessões únicas de NMES de baixa e alta frequência foram capazes de gerar um aumento de atividade de mTOR/pmTOR. Já a sessão única de NMES de alta frequência também elevou a expressão de S6K1/pS6K1 (19). Esses dados sugerem que a via mTORC1 é estimulada com a NMES, existindo um efeito dose-resposta: quanto maior a frequência de estimulação, maior a magnitude da resposta molecular (19).

A NMES, no entanto, é amplamente empregada no contexto clínico. Em particular em pacientes que sofreram lesões medulares da medula espinal (em inglês, *spinal cord injury* ou SCI). Elas são caracterizadas por uma lesão primária, geralmente ocasionada por um trauma, que culmina com respostas “em cascata” induzindo danos químicos e celulares ao tecido medular, como desregulações iônicas, edemas, aumento de permeabilidade celular e da sinalização apoptótica, peroxidação de lipídios, desmielinização e inflamação (50). O resultado desse processo é a diminuição drástica da força e em alguns casos paralisia, ocasionando ao paciente um quadro de limitação na realização de movimentos, dependência física, stress psicológico e aparecimento de comorbidades como obesidade, dislipidemia e doenças cardiovasculares (50,51).

Com o desuso, sinais atróficos são disparados na musculatura de pacientes acometidos pela SCI, produzindo perda acelerada de massa muscular, aparecimento de disfunções mitocondriais, mudança do fenótipo das fibras musculares onde observa-se uma conversão de fibras oxidativas para glicolíticas e instauração de fibrose (52,53). Tanto o Sistema Ubiquitina-Proteassoma como a via de sinalização *transform growth factor* (TGF) β /Smad-3, são mais expressas no período que sucede a ocorrência da lesão medular (53). Cronicamente pacientes acometidos pela SCI apresentam menor expressão de E3 ligases, demonstrando que a degradação por meio do proteassoma não é determinante para a manutenção do estado atrófico a longo prazo (54,55). No entanto, a sinalização anabólica nesses indivíduos encontra-se reduzida, com destaque para diminuição dos níveis proteicos de IGF-1, pGSK-3 β , 4E-BP1 e p70S6K (54). Isso demonstra que apesar das vias atróficas não serem superexpressas na SCI crônica a redução da capacidade de se realizar o processo de síntese proteica de forma eficiente mantém esses pacientes com massa muscular deficiente (54).

2.5 Estratégias farmacológicas para promoção de hipertrofia e redução do processo atrófico

Como visto nos tópicos anteriores, o exercício resistido e a eletroestimulação neuromuscular são duas estratégias empregadas para atenuar o processo de perda de massa muscular. No entanto, existe a necessidade de desenvolver ferramentas farmacológicas que possam atuar como linhas complementares de tratamento.

Certas estratégias têm sido desenvolvidas na última década, por exemplo o uso de anticorpos anti-ActRtIIA/ActRtIIB, receptores de miostatina (23,56,57). Porém, o uso de anticorpos para terapia em humanos é extremamente caro de produção lenta. Outras abordagens envolvem tratamentos envolvendo análogos de IGF1, agonistas de β 2-adrenoreceptores, inibidores de fosfodiesterase, utilização de esteroides e moduladores seletivos dos receptores androgênicos, os chamados SARMs (37,39). Entretanto, essas estratégias são potencialmente arriscadas pois podem promover o aumento do risco de arritmias cardíacas, desenvolvimento de neoplasias e resistência à insulina (56).

Nos anos 1990 foi proposta uma outra abordagem proposta por alguns grupos nesse período foi focar na utilização de inibidores competitivos do proteassoma, como é o caso de aldeídos tripeptídeos. Apesar de inibirem o processo de degradação proteica, não se demonstraram eficientes para mitigarem a perda de força que geralmente acompanha o processo de atrofia. Ademais, o proteassoma também é responsável pela degradação de proteínas que mediam diversos processos biológicos. A interrupção de sua atividade pode gerar o acúmulo de agregados proteicos, ocasionando efeitos colaterais (57).

2.6 Composto MyoMed-205: um novo inibidor seletivo de MuRF1 para mitigar quadros atróficos

Pelo fato da expressão de MuRF1 estar diretamente associada com o processo de perda muscular em diversas condições clínicas (16,58), diversas terapias foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos. Recentemente o desenvolvimento de pequenas moléculas pertencentes a classe dos (2-oxo-chromen-7-il)-heterometil-ácidos benzoicos (em inglês, *(2-oxo-chromen-7-yl)-heteromethyl-benzoic acids*)

capazes de inibir a atividade de E3 ligases de MuRFs tem sido encarado como um caminho possível para o desenvolvimento de fármacos capazes de combater quadros de perda muscular (59).

O principal mecanismo envolvido nesses inibidores é o processo de ligar-se e impedir a atividade do domínio *coiled-coil*, da molécula de MuRF, que é responsável pela dimerização da molécula em MuRF1, o que é essencial para sua função como E3 ligase, ou seja, atuando na poliubiquitinação de proteínas, sobretudo as que atuam como componentes contráteis do sarcômero: a miosina, troponina-T e titina (26,60–62). Após vasculhar o banco de dados do EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), Bowen e colaboradores identificaram uma série de compostos eficientes em promover a autoubiquitinação de MuRF1. Ensaios em culturas celulares chegaram ao composto nomeado MCEMBL ID#704946, capaz de inibir a atividade de MuRF1, além de apresentar baixa toxicidade.

Quando testado nos ensaios *in vitro*, células C2C12 tratadas com dexametasona que receberam 10µM de MCEMBL ID#704946 tiveram os diâmetros dos miotubos preservados e a expressão de mRNA de MuRF1 atenuada (60). Na análise posterior *in vivo*, o composto MCEMBL ID#704946 atenuou o processo de atrofia muscular e a disfunção contrátil em camundongos que apresentavam caquexia cardíaca induzida por monocrotalina. Subsequentemente observou-se que o composto MCEMBL ID#704946 foi capaz de minimizar a atrofia do diafragma em animais submetidos a um modelo insuficiência cardíaca (61).

Além da preservação de massa, a função contrátil do diafragma também foi poupada. Finalmente, o MCEMBL ID#704946 normalizou a atividade e expressão de enzimas relacionadas a produção de energia e homeostase mitocondrial, que são extremamente prejudicadas em quadros de insuficiência cardíaca crônica (61). Recentemente, o composto MCEMBL ID#704946 foi aprimorado, com o objetivo de melhorar sua estabilidade biológica. O resultado desse aprimoramento foi a concepção do composto MCEMBL ID#205, que possui maior estabilidade e que continua apresentando baixa toxicidade e equivalência na eficiência de inibição da dimerização de MuRFs. Posteriormente o MCEMBL ID#205 foi renomeado, sendo chamado atualmente de MyoMed-205.

Trabalhos recentes publicados por nosso grupo demonstram a eficácia do MyoMed-205 na atenuação de quadro de atrofia muscular na musculatura periférica em modelos de miopatia diabética, disfunção diastólica e caquexia (22,59,63). Recentemente o novo composto também se demonstrou eficiente na mitigação do processo atrófico do diafragma em quadros iniciais de disfunção diafragmática induzida por desuso (21).

Observando o aspecto molecular, esses trabalhos anteriormente citados demonstram que o novo inibidor seletivo de MuRF1 confere esse efeito protetivo ao músculo estriado por promover a redução da expressão de FoxO1 (proteína total e fosforilada), fosfo (Ser632) HDAC4, MuRF1 e MuRF2, além de reduzir a ubiquitinação total de proteínas musculares (21,22,63). O composto também promove a redução da expressão de marcadores de *stress* oxidativo, tais como Nox2 e nitrotirosina, atua na manutenção do metabolismo energético ao resgatar a atividade da enzima citrato sintase e complexo I mitocondrial (que são comumente diminuídas em quadros de caquexia devido a disfunção mitocondrial associada a esse estado) (22). Além disso, apesar da sua associação com a redução da expressão de alvos moleculares envolvidos com o processo de degradação proteica, o MyoMed-205 é capaz de aumentar a ativação de Akt por meio da sua fosforilação em serina 473. Esse fenômeno por sua vez explica, por exemplo, a redução da expressão de FoxO uma vez que o aumento da expressão de Akt inibe a atividade desse fator de transcrição (64).

Até o momento, essa nova abordagem terapêutica na mitigação de quadros atróficos não tem demonstrado efeitos colaterais. Laudos toxicológicos realizados pela empresa Mérieux NutriSciences Brasil (Piracicaba, São Paulo) indicaram que o composto não apresenta agudamente efeitos colaterais em modelos murinos (protocolos de referência OECD 407 e OECD 42). Ademais, em ensaio de toxicidade aguda não houve qualquer alteração comportamental ou física após a administração de doses elevadas do composto (300 a 2000mg por quilo de massa corporal) em ratos, durante um período de 14 dias (21).

Apesar de não observarmos sinais de toxicidade em animais submetidos ao tratamento com o MyoMed-205 ainda não se sabe o efeito da utilização de pequenas moléculas inibidoras de MuRF1 em indivíduos saudáveis.

Em estudos anteriores roedores *knock-out* (quando ocorre a deleção completa do gene) para MuRF1 (MuRF1-KO) apresentaram um fenótipo agressivo de hipertrofia muscular, comprometendo até mesmo a longevidade desses animais por conta do aumento cardíaco observado nesse modelo (65). Não sabemos até o momento se a inibição parcial de MuRF1 seria também capaz de promover hipertrofia e se teria alguma interação com modelos notadamente conhecidos por gerar aumento de massa muscular e de força, como é o caso treinamento físico utilizando exercícios resistidos e a eletroestimulação neuromuscular.

3. JUSTIFICATIVA

Diante das informações apresentadas, observamos a importância da sobrecarga mecânica para o controle da massa e da função do músculo estriado esquelético. O exercício resistido em particular constitui uma estratégia importante para a manutenção de massa e função muscular sobretudo em idosos (4), implicando diretamente na qualidade de vida. Em indivíduos jovens, uma quantidade adequada de massa muscular garante um melhor desempenho em tarefas cotidianas além de benefícios para a saúde como a manutenção da sensibilidade a insulina e a maior taxa de metabolismo basal, dessa forma evitando quadros como a obesidade e diabetes (66,67). Ademais, o exercício resistido é utilizado para recuperação de quadros que promovem grande perda de massa muscular, como ocorre com a imobilização (68).

Uma outra linha de tratamento empregada no manejo de quadros atroficos, sobretudo em indivíduos com limitações graves de movimento, é a utilização de NMES. No entanto, sabemos que a aplicação de correntes elétricas é algo desagradável ao paciente podendo interferir, por exemplo, em sua adesão ao tratamento. Além disso, apesar de existirem protocolos apropriados para serem realizados em domicílio muitos pacientes não estão recuperados inteiramente para sua execução, outros não dispõem de recursos financeiros para contratação de profissionais que realizam esse tipo de intervenção ou para adquirir os equipamentos necessários.

Nesse sentido, são bem-vindas novas estratégias farmacológicas que auxiliem no manejo de quadros atróficos dado que as empregadas atualmente (como é o caso da utilização de esteroides anabolizantes) podem oferecer riscos aos pacientes a longo prazo (69).

Neste estudo, investigamos se uma inovadora pequena molécula inibidora da atividade de MuRF1 pode ser utilizada como recurso não apenas para mitigar o processo de atrofia muscular (como estudos recentes tem demonstrado), mas como um promotor da hipertrofia. Para isso, comparamos o composto MyoMed-205 com um modelo que notadamente é capaz de induzir o processo hipertrófico, sobretudo em roedores: a NMES. Além de investigar se o inibidor é capaz de promover o ganho de massa muscular, observamos se existiria algum tipo de interação da combinação da utilização desse novo fármaco com a NMES, sob a hipótese de atuar como um potencializador da hipertrofia nessa modalidade de tratamento.

Esse trabalho tem potencial para futura aplicação quadros clínicos que envolvem perda de massa muscular tais como lesões articulares, imobilização de membros, pacientes acometidos por SCI, entre outros.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o impacto do composto MyoMed-205 *per se* e em associação com a estimulação elétrica neuromuscular, no processo de ganho de massa e força do músculo esquelético, em animais jovens e saudáveis.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Investigar os efeitos do composto MyoMed-205, com e sem associação a eletroestimulação, na composição corporal dos animais e na massa úmida dos músculos TA e sóleo;

4.2.2. Verificar os efeitos do MyoMed-205 na força máxima muscular, absoluta e relativa, com e sem associação com a eletroestimulação;

4.2.3. Quantificar a área de secção transversal das fibras musculares do TA e sóleo, e assim observar os efeitos da utilização do MyoMed-205 isoladamente e com associação a eletroestimulação;

4.2.4. Analisar o efeito de MyoMed-205, com e sem associação a eletroestimulação, no número de mionúcleos totais;

4.2.5. Observar os efeitos do MyoMed-205 em função do perfil de fibra muscular (hipertrofia das fibras e prevalência);

4.2.6. Examinar o efeito do MyoMed-205 na atividade de células satélite, Pax7 e *MyoD*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e considerações éticas

Utilizamos camundongos jovens (8-12 semanas, N=32) C57BL/6 machos fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP). Os animais ficaram acomodados no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III-USP), em um ciclo claro-escuro de 12h/12h, com água e ração *ad libidum*. Todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos foram descritos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA Nº: 6422160920).

5.2 Desenho experimental

Para identificar a resposta do inibidor MyoMed-205 em associação com a eletroestimulação separamos os animais em quatro grupos: Controle (CTR, n=8), Eletroestimulado (NMES, n=8), MyoMed-205 (#205, n=9) e Eletroestimulado+MyoMed-205 (NMES+#205, n=8). Os grupos CTR e NMES receberam uma ração controle (Rhoster, Ração Rhosterlab Manutenção RH29586), enquanto o #205 e NMES+#205, a ração enriquecida com o inibidor MyoMed-205 (Rhoster, Ração Rhosterlab Manutenção Modificada – Composto 1g/kg RH29586). A quantidade do composto presente na ração é de 1g/kg, portanto considerando o consumo médio de 5g diários alimento por indivíduo a dosagem diária que cada animal

recebe fica em torno de 160mg/kg/massa corporal, quantidade que se demonstrou eficiente para promover respostas positivas em estudos anteriores (1, 2, 36). Os gráficos de consumo de ração e a tabela nutricional da ração utilizada encontram-se respectivamente nos Anexos 1 e 2.

Os grupos CTR e #205 receberam somente uma simulação do procedimento de eletroestimulação, ou seja, foram anestesiados e acomodados no suporte de eletroestimulação com os eletrodos acoplados na pata esquerda, porém não foi aplicado o estímulo elétrico. Já os grupos NMES e NMES+#205 receberam o estímulo elétrico, a 100Hz.

Os animais passaram por um período de acomodação de sete a dez dias após a chegada no Biotério do Departamento de Anatomia, para ganharem peso e se acostumarem com o novo ambiente. Após esse período, os animais dos grupos NMES e NMES+#205 foram submetidos a um período adaptativo. Essa adaptação envolveu duas sessões com volume e intensidade reduzidas, nas quais os camundongos foram submetidos a metade da voltagem estabelecida para o seu respectivo grupo. Essas sessões possuíam metade do volume total da fase principal do programa de treinamento, ou seja, apenas 5 séries. Os grupos CTR e #205 passaram por um processo semelhante, porém não receberam a eletroestimulação. Essas sessões ocorreram em dois dias, com dois dias de descanso entre cada uma delas. Dois dias após a finalização da curva de adaptação foi conduzido um teste de esforço máximo (detalhado nos itens 5.3 e 5.4). A ração dos animais foi trocada 48h após o final do teste, sendo ela ou a enriquecida com MyoMed-205 ou a controle (do fabricante Rhoster, diferente da oferecida aos animais do Biotério do Departamento de Anatomia). As sessões de eletroestimulação foram conduzidas após 15 dias da troca da ração (Figura 5).

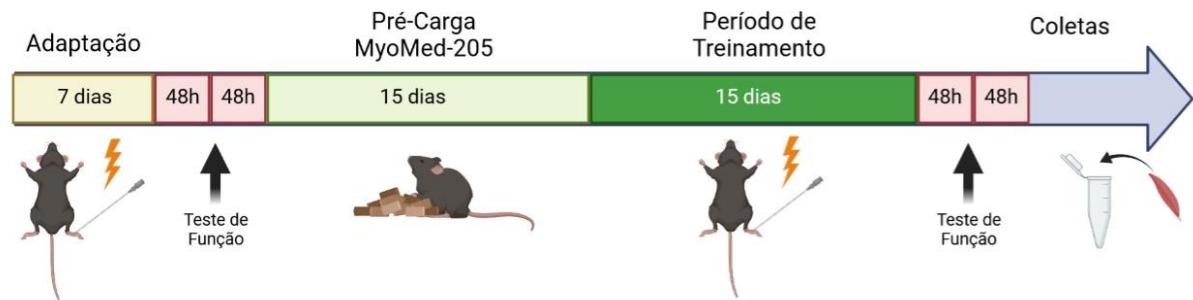


Figura 5 - Linha do Tempo do experimento. Ilustração produzida pela autora através do website <https://www.biorender.com>.

Sendo assim, os camundongos ficaram expostos ao composto MyoMed-205 por 35 dias, tempo que se demonstrou suficiente para observar mudanças relativas a ganho de massa e força (22). Em estudos anteriores conduzidos em nosso laboratório, as duas semanas de treinamento por eletroestimulação foi suficiente para aumentar área de seção transversal das fibras musculares (70). Os animais receberam a eletroestimulação com intervalo de dois dias de descanso (dia sim/dois dias não), totalizando 6 sessões de treinamento. No dia seguinte após a finalização da última sessão de treinamento foi repetido o teste de força máxima e 48 horas depois os animais passaram pelo processo de eutanásia. A ração foi removida 3 horas antes do procedimento, para garantir que todos os animais estejam no mesmo estado nutricional no momento que ocorrer o sacrifício. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os dados de peso e comprimento nasoanal foram mensurados. O músculo tibial anterior (TA) e sóleo esquerdos foram removidos, pesados e cortados na transversal. Uma metade foi imersa durante um minuto em isopentano para criopreservação e análise histológica, e a outra metade foi conservada no -80°C para análise molecular.

Também mensuramos o comprimento da tibia esquerda dos animais, massa adiposa e carcaça dos animais. A massa adiposa foi retirada manualmente, utilizando uma pinça. Removemos manualmente e pesamos a gordura dos coxins retroperitoneal, mesentérico, periepídidimal e inguinal. A massa da carcaça foi obtida após a remoção de todos os órgãos e conteúdo adiposo dos animais.

5.3 Protocolo de eletroestimulação

O protocolo de eletroestimulação utilizado nesse experimento foi estabelecido em um projeto realizado no laboratório de Biologia Molecular e Celular do Músculo Estriado do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (70), com base no modelo de Ambrosio e colaboradores (71). Essas sessões eram conduzidas no período da manhã (entre 8:00 e 10:00).

Os camundongos foram previamente anestesiados com isoflurano (2% de concentração) por via inalatória. Os pelos do membro inferior esquerdo, onde foi fixado o eletrodo, foram raspados delicadamente utilizando uma lâmina. Os animais foram acomodados em decúbito dorsal em um suporte (12,5cm de comprimento e 2cm de altura). O tornozelo esquerdo foi fixado por uma trava para manter o ângulo em relação ao quadril de 180°, ao joelho de 150° e ao tornozelo de 170° (Figura 6).

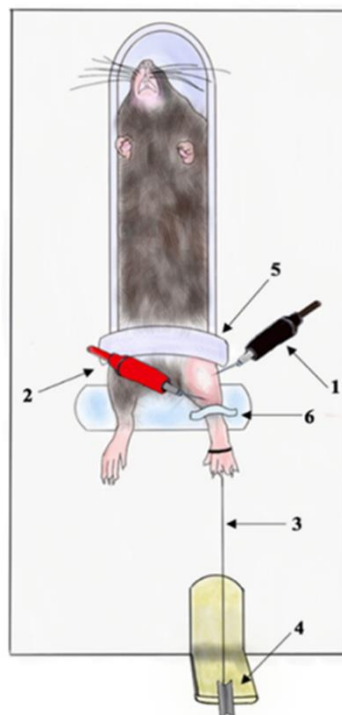


Figura 6 - (A) Representação do aparato de eletroestimulação. 1: eletrodo de input é introduzido no ponto motor do tibial anterior; 2: eletrodo de output introduzido na inserção distal do tibial anterior; 3: fio (6 PA) fixado na porção distal do membro inferior esquerdo do animal (utilizado somente nos testes de

força. Detalhes adiante); 4: polia; 5: cinto de fixação do corpo do animal; 6. Trava estabilizadora do tornozelo. (Ilustração: André Cruz)

As agulhas de eletroestimulação (Tecnident, COD:13X03X0 20C/10 - HTM), devidamente esterilizadas, foram fixadas na porção anterolateral da tíbia esquerda, no ponto motor do músculo, para que o estímulo elétrico promova a contração do tibial anterior. O posicionamento dos eletrodos de *input* e *output* podem ser visualizados nas figuras 6 e 7.

O estímulo foi gerado por um dispositivo *Stimulus Physio* (ANVISA No: 80212480017). O estímulo foi oferecido somente aos indivíduos dos grupos NMES e NMES+#205. Esses animais tiveram suas patas eletroestimuladas a 100Hz, voltagem de 8 volts, durante o período de um minuto. Nesse tempo, e utilizando esses parâmetros, foi possível que os animais realizassem uma série de doze contrações concêntricas. A musculatura é engajada progressivamente durante 1000 milissegundos e permanece em contração por 2000 milissegundos. Em seguida, o estímulo é cessado e ocorre o descanso de 2000 milissegundos. Após o período de descanso, o ciclo se reinicia. Assim, cada ciclo temos 3 segundos de contração, seguido por 2 segundo de descanso, repetido por 12 vezes no período de um minuto. Terminado o tempo de um minuto de eletroestimulação, interrompemos o processo e aguardamos um minuto, para recuperação, antes da próxima série. Foram realizadas 10 séries de eletroestimulação (70).

Os indivíduos dos grupos CTR e #205, por sua vez, não passaram pelo procedimento de eletroestimulação. Nesse caso, assim como descrito anteriormente, também tiveram os eletrodos fixados as patas. No entanto, não foi realizado nenhuma estimulação. Com o intuito de simular o procedimento na sua totalidade, cronometramos o tempo de um minuto de eletroestimulação e um minuto de descanso, durante 10 séries.

Após o procedimento, os animais tinham as agulhas retiradas das patas e limpas com iodopovidona, com o objetivo de realizar a assepsia de possíveis feridas que poderiam se formar. Depois, eram acomodados dentro de suas respectivas caixas e monitorados até que se recuperassem da anestesia.

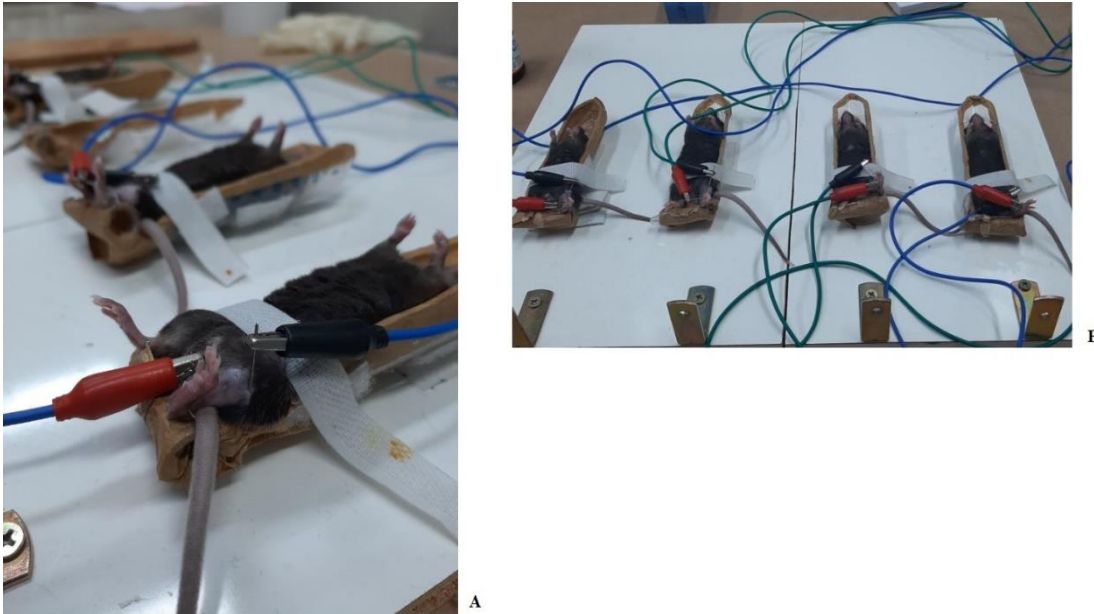


Figura 7 - (A) Detalhe do posicionamento do eletrodo na pata esquerda do animal, em uma sessão de eletroestimulação. O eletrodo input é identificado pela cor preta enquanto o output é de cor vermelha. (B) Camundongos durante sessão de eletroestimulação. É possível realizar o treinamento em quatro camundongos de maneira simultânea.

5.4 Teste de função

O Teste de Função foi desenvolvido por nosso grupo (22), no qual consiste no mesmo procedimento de eletroestimulação descrito anteriormente (tópico 5.3). O tornozelo esquerdo foi fixado por uma trava para manter o ângulo em relação ao quadril de 180° , ao joelho de 150° e ao tornozelo de 170° . Foi oferecida uma carga ao animal, através de pequenas anilhas cada uma com massa variando de 0,9 a 2,9 gramas, amarradas por uma linha de sutura presas a pata do roedor (Figura 8).

Em seguida, os animais foram eletroestimulados com um estímulo elétrico de 100Hz e 8 volts para gerar o movimento de dorsiflexão plantar, igual ao protocolo de eletroestimulação realizado no período de intervenção. Os animais executaram no máximo duas repetições, utilizando a maior carga possível. Só foi considerada uma repetição quando o animal ergueu a carga preservando todo o arco do movimento, ou seja, quando o movimento de dorsiflexão ultrapassava 90° em relação ao suporte. Caso o animal não conseguisse erguer a carga, interrompíamos o teste, diminuíamos a carga em 10% e repetíamos o teste após o período de 5 minutos. Por outro lado, se o animal realizasse mais que duas repetições com uma determinada carga, também

realizamos a interrupção do teste, incrementávamos a carga em 10% e repetíamos o teste após 5 minutos de intervalo.

Todos os grupos executaram o teste em dois momentos: após o período de adaptação e após o término da intervenção.

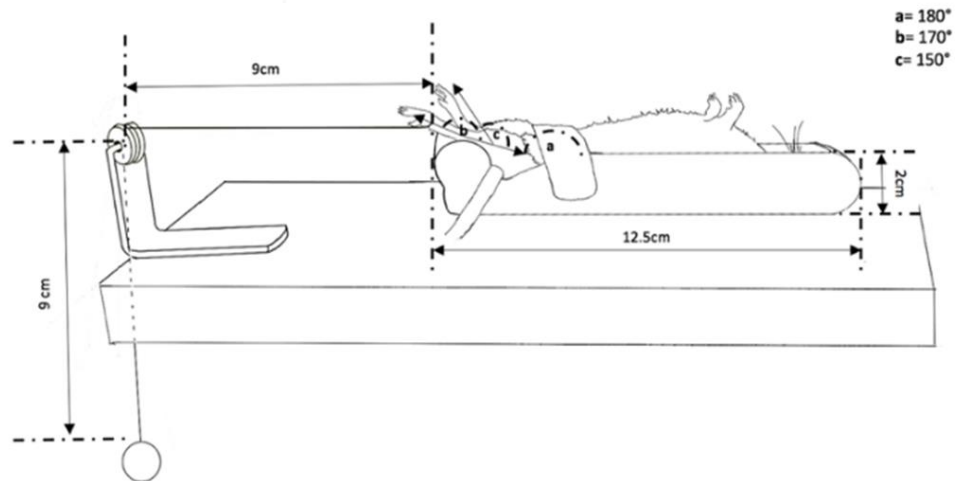


Figura 8 - Vista lateral do aparato demonstrando os ângulos das articulações e as distâncias do membro inferior esquerdo do camundongo, da polia e da carga. (Ilustração: André Cruz)

5.5 Análise morfológica quantitativa

Foram feitos cortes transversais (10 μm) do tibial anterior no criostato a -24°C (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O tecido foi disposto em lâminas (26 x 76 mm) e armazenado a -80°C para o estudo morfológico. O tecido foi tratado com hematoxilina e eosina (H&E) e fechadas com lamínula para análise morfométrica do tecido. As fotomicrografias das fibras musculares foram obtidas utilizando o microscópio óptico Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha) conectado a um computador. A área de secção transversal foi mensurada por meio da ferramenta “Freehand selections” do software ImageJ (v. 1.45s, National Institutes of Health). Foram analisadas aproximadamente 200 – 300 fibras musculares por animal, totalizando 1600-2400 fibras analisadas por grupo.

5.6 Imunofluorescência para marcação de miosina de cadeia pesada (MHC)

As lâminas contendo cortes transversais do músculo tibial anterior (10 µm) foram fixadas em acetona por 10min e em seguida lavadas com TBS em 3 séries de 5 minutos, substituindo o TBS a cada lavagem. Após a lavagem, foram incubadas em solução bloqueadora (TBS-Triton-X 0,3% + BSA 1%) por 25 minutos. Passado esse período, o tecido foi tratado com solução *Mouse-on-Mouse* (M.O.M.® *Blocking Reagent*, *Vector Laboratories*, #MKB-2213-1) diluído em solução bloqueadora, por uma hora. Passado esse período, foram adicionados os anticorpos primários (MHCI, MHCII e laminina. Referências e diluições encontram-se na tabela 1) diluídos em TBS. As lâminas foram mantidas dentro de uma câmara úmida, overnight (4°C). Após isso, as lâminas foram lavadas com TBS, em 3 séries de 5min, substituindo o TBS a cada lavagem. Após esse procedimento, uma solução contendo o anticorpo secundário (definidos de acordo com a matriz específica de cada anticorpo primário utilizado. Ver tabela 2) em solução bloqueadora foi adicionada aos tecidos, que foram mantidos em câmara escura em temperatura ambiente. Passada uma hora, o anticorpo secundário foi removido e as lâminas contendo os tecidos lavadas com TBS (novamente, 3x por 5min) e em seguida foram fechadas utilizando lamínulas e meio de montagem para fluorescência Vectashield com 4',6-diamidino-2-fenilidol (DAPI). As imagens das fotomicrografias foram obtidas pelo microscópio óptico *Axio Scope A1* (*Carl Zeiss Microscopy GmbH*, Göttingen, Alemanha) conectado a um computador. Foram utilizadas ampliações de 50x, 200x e 400x para a aquisição das imagens utilizadas, respectivamente, na quantificação de fibras positivas totais para MHCI e MHCII e na medição da área de secção transversal específica.

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários para marcação de miosinas de cadeia pesada por imunofluorescência

Anticorpo	Host	Diluição	Referência
<i>Monoclonal anti-myosin (Skeletal, Slow)</i>	<i>Mouse</i>	1:400	<i>Sigma-Aldrich</i> , #M8421
<i>Monoclonal anti-myosin (Skeletal, Fast)</i>	<i>Mouse</i>	1:400	<i>Sigma-Aldrich</i> , #M4276
<i>Anti-Laminin</i>	<i>Rabbit</i>	1:1000	<i>Sigma-Aldrich</i> , #L9393

Tabela 2 – Lista de anticorpos secundários para marcação de miosinas de cadeia pesada por imunofluorescência

Anticorpo	Diluição	Referência
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	1:250	Jackson ImmunoResearch, 715-545-150
Cy™3 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:250	Jackson ImmunoResearch, 711-165-152

5.7 Imunofluorescência para marcação de células satélites

As lâminas contendo cortes transversais do músculo tibial anterior (10 µm) foram fixadas em PFA 4% por 10min e em seguida lavadas com TBS-T (TBS+Triton-X 0,3%) em 3 séries de 5 minutos, substituindo o TBS-T a cada lavagem. Após a lavagem, foram incubadas na solução bloqueadora composta por TBS-T + *Donkey Serum* 1% pelo período de uma hora. Depois do período de bloqueio, foram adicionados os anticorpos primários para marcação de Pax7, MyoD e laminina (referência na tabela 3) diluídos em solução bloqueadora. As lâminas foram mantidas dentro de uma câmara úmida, overnight (4°C). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS-T, em 3 séries de 5min, substituindo o TBS-T a cada lavagem. Incubamos as lâminas com os anticorpos secundários (ver tabela 4) e DAPI (3:1000, #422801, BioLegend) diluídos em solução bloqueadora e as mantivemos em câmara escura a temperatura ambiente. Depois de uma hora, removemos os anticorpos secundários e lavamos as lâminas em TBS-T (novamente, 3x por 5min). Com o objetivo de reduzir o *background*, o tecido foi tratado com Sudan Black por 10 minutos, e lavado em 8 séries de 5 minutos com TBS. As lamínulas foram fechadas utilizando meio de montagem composto por glicerol e n-propilglicol. As imagens das fotomicrografias foram obtidas pelo microscópio óptico Axio Scope A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha) conectado a um computador. Foi utilizada ampliação de 40x para a quantificação de células Pax7 e MyoD positivas.

Tabela 3 – Lista de anticorpos primários para marcação de miosinas de células-satélites por imunofluorescência

Anticorpo	Host	Diluição	Referência
<i>Polyclonal anti-MYOD1</i>	<i>Rabbit</i>	1:100	<i>Proteintech, #18943-1-AP</i>
<i>Polyclonal anti-PAX7</i>	<i>Rabbit</i>	1:50	<i>abcam, #ab187339</i>
Laminin beta-2/gamma-1 Monoclonal Antibody (A5)	<i>Rat</i>	1:200	Invitrogen, #MA1-06100

Tabela 4 – Lista de anticorpos secundários para marcação de células-satélites por imunofluorescência

Anticorpo	Diluição	Referência
Cy™5 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L)	1:250	Jackson ImmunoResearch, 712-175-153
Cy™3 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:250	Jackson ImmunoResearch, 711-165-152

5.7 Quantificação de mionúcleos

A contagem de mionúcleos por fibra foi obtido por meio de contagem manual, utilizando ampliação de 20x utilizando o software ImageJ. Um núcleo é classificado como mionúcleo se apresentar uma das seguintes condições: (1) se está inserido dentro da borda da lâmina basal (marcada pela laminina); (2) se está no limite da lâmina basal, voltado para o interior da fibra; ou (3) se apresenta 50% da sua área dentro do limite da lâmina basal. O número de fibras foi mensurado após a contagem dos mionúcleos dentro de uma mesma fotomicrografia para expressar o número médio de mionúcleos por fibra (72).

5.8 Análise dos Resultados

Os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão (SD) ou então média \pm erro padrão da média (SEM). As análises foram realizadas no software GraphPad Prism v.9 (San Diego, CA, USA). Para comparar dois ou mais grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste recomendado. Quando necessário foi utilizado o teste *t* de Student para comparação entre médias. No caso de dados não-paramétricos, empregamos o teste de Mann-Whitney. Para todas as

análises foi adotado um intervalo de confiança de 95% e significância estatística representada pelo p-valor $< 0,05$

6. RESULTADOS

6.1 Medidas Morfométricas

O primeiro objetivo do estudo foi avaliar o impacto do composto #205 e de sua associação com a eletroestimulação neuromuscular na caracterização da composição dos animais. Para isso mensuramos a massa corporal, massa da carcaça, massa gorda, comprimento naso-anal e da tíbia.

Em relação a evolução no ganho de massa corporal observamos um ganho significativo de peso após 35 dias (Figura 9), identificado pela análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de múltiplas comparações de Bonferroni, para comparação do período pré com o pós-intervenção. Identificamos um ganho de 6% na média da massa corporal em CTR ($22,5 \pm 2,8$ g pré vs. $24,1 \pm 2,9$ g pós; p-valor=0,0013), 8% em 205 ($21,7 \pm 2,2$ g pré vs. $23,5 \pm 1,5$ g pós; p-valor=0,0004), 5% em NMES ($24,0 \pm 1,5$ g pré vs. $25,4 \pm 2,2$ g pós; p-valor=0,0093) e 7% em NMES 205 ($25,1 \pm 0,9$ g pré vs. $26,9 \pm 1,3$ g pós; p-valor=0,0005).

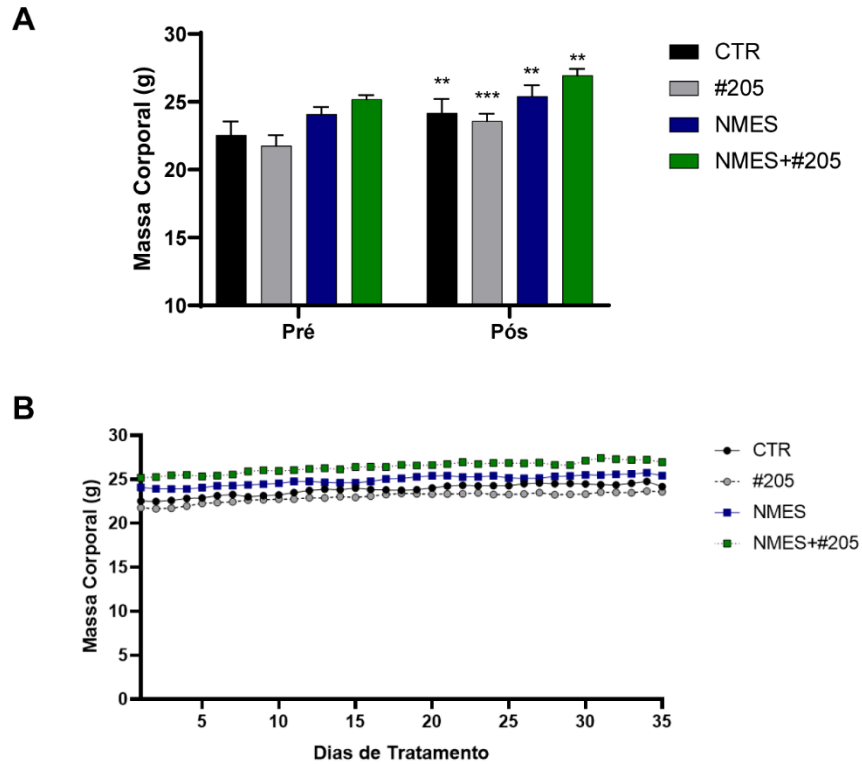


Figura 9 - (A) Média da massa corporal dos animais antes da intervenção (Pré) e após (Pós); (B) Evolução da massa corporal nos 35 dias de experimento. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (SEM); ** $p < 0,005$ vs. Pré; *** $p < 0,0005$ vs. Pré; $n = 8-9$ animais/grupo

Para tentar discriminar se houve aumento de massa muscular dos animais, realizamos a medida de carcaça (Figura 10). Em relação a massa da carcaça, encontramos diferença estatisticamente significativa no grupo NMES+#205 em relação aos grupos CTR ($19,8 \pm 0,82g$ vs. $17,3 \pm 2,20g$; $p\text{-valor} = 0,0102$) e #205 ($19,8 \pm 0,82g$ vs. $17,4 \pm 0,88g$; $p\text{-valor} = 0,0090$). Porém, quando normalizamos esse dado utilizando a massa corporal total, não encontramos diferenças significativas entre os grupos na análise relativa da massa da carcaça.

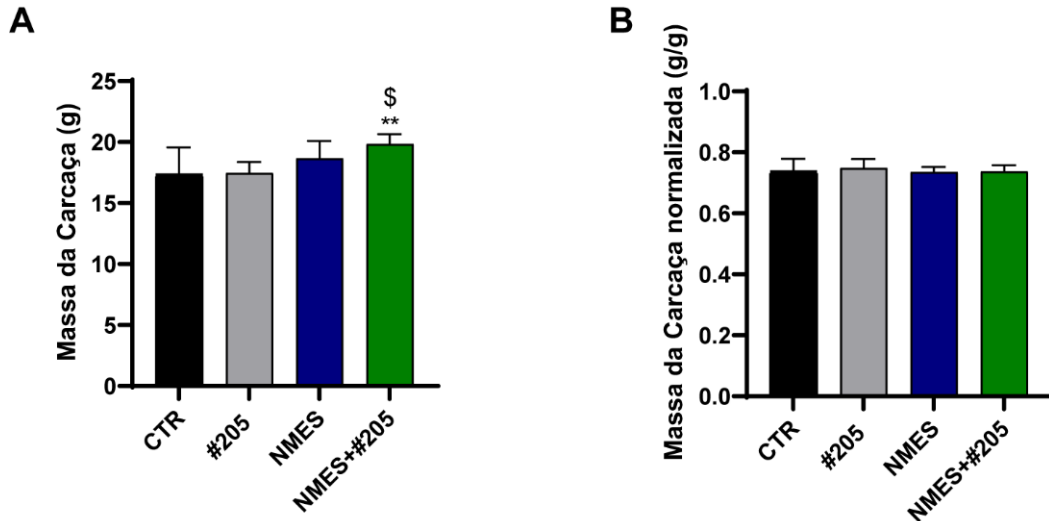


Figura 10 - (A) Medida absoluta da massa da carcaça dos animais. (B) Medida relativa da massa da carcaça dos animais normalizada pela massa corporal total. Os valores estão expressos em média \pm SD. ** $p < 0,005$ vs. CTR; \$ $p < 0,05$ vs. 205. $n=8-9$ animais/grupo

Em relação a massa gorda não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, tanto na medida absoluta quanto na normalizada pela massa corporal total (Figura 11).

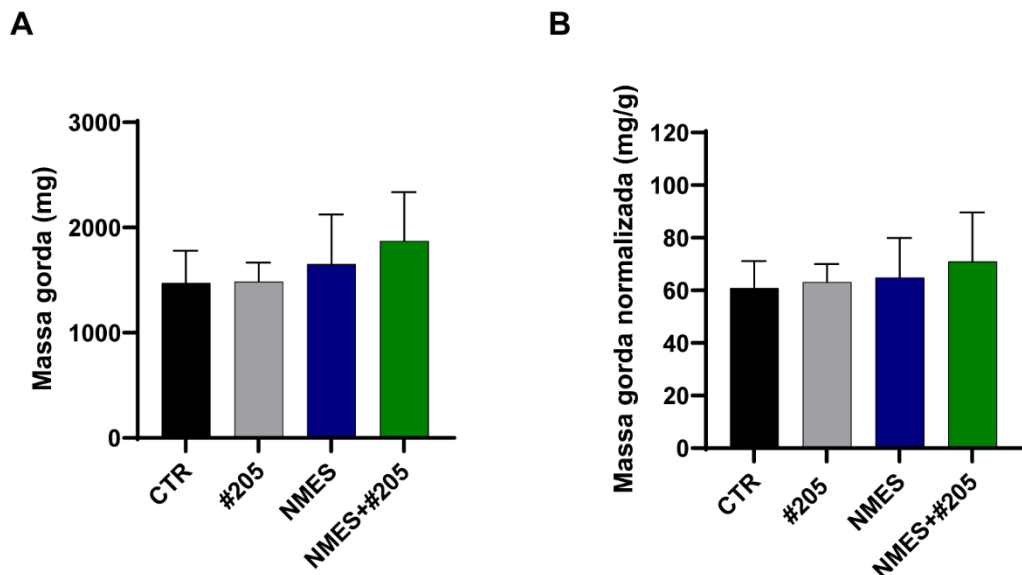


Figura 11 - (A) Medida absoluta da massa gorda dos animais. (B) Medida relativa da massa gorda dos animais normalizada pela massa corporal total. Os valores estão expressos em média \pm SD.

Também realizamos medidas relacionadas ao esqueleto dos animais, comprimento naso-anal e da tíbia. Não encontramos diferença entre os grupos nessas análises (Figura 12).

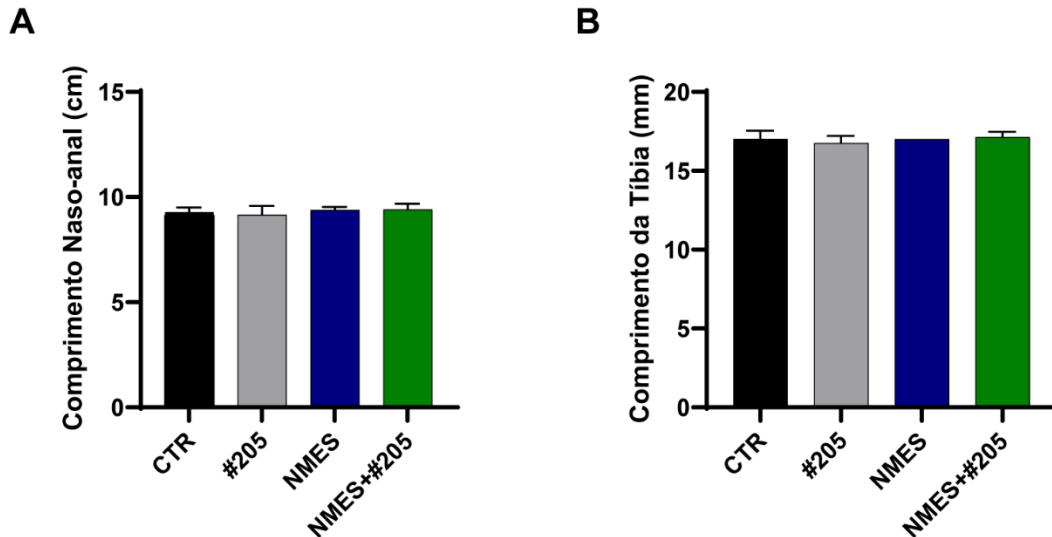


Figura 12 - (A) Medida do comprimento naso-anal. (B) Medida do comprimento da tíbia. Os valores estão expressos em média \pm SD. n=8-9 animais/grupo

Após as análises morfométricas gerais, o próximo passo foi avaliar o efeito da suplementação com MyoMed-205, combinada ou não com a aplicação da eletroestimulação neuromuscular, na massa úmida da musculatura periférica. Para isso utilizamos o músculo TA e o sóleo.

Na figura 13 podemos observar os resultados referentes a massa úmida do TA. Na medida absoluta verificamos uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo NMES+#205 e o controle ($48,1 \pm 3,35\text{g}$ vs. $42,5 \pm 1,4\text{g}$; p-valor=0,0079). Entretanto, normalizando essas medidas pela massa corporal dos animais para a obtenção da medida relativa, deixamos de observar essa diferença. Sendo assim, concluímos que não houve efeito do composto MyoMed-205, nem da NMES e da combinação entre os dois na massa úmida do TA.

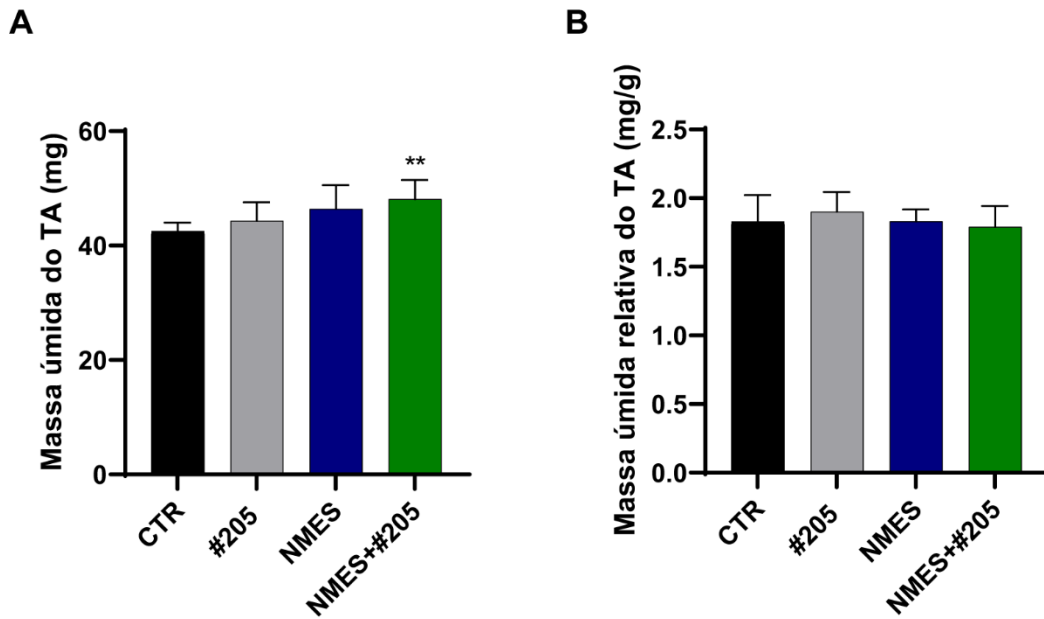


Figura 13 - (A) Medida absoluta da massa úmida do TA; (B) Medida relativa da massa úmida do TA, normalizada pela massa corporal; ** $p < 0,005$; os valores estão expressos em média \pm SD. $n = 8-9$ animais/grupo

Na análise do músculo SO realizamos a comparação somente entre os grupos CTR e #205, já que nos grupos eletroestimulados esse músculo não foi afetado. Para essa análise empregamos teste de Mann-Whitney (alternativa para dados não paramétricos ao teste t de Student), para a comparação dos dois grupos. Os resultados podem ser visualizados na figura 14.

Novamente, assim como o TA não observamos diferenças estaticamente significativas entre esses dois grupos, mesmo quando normalizamos a massa do músculo pela massa corporal do animal.

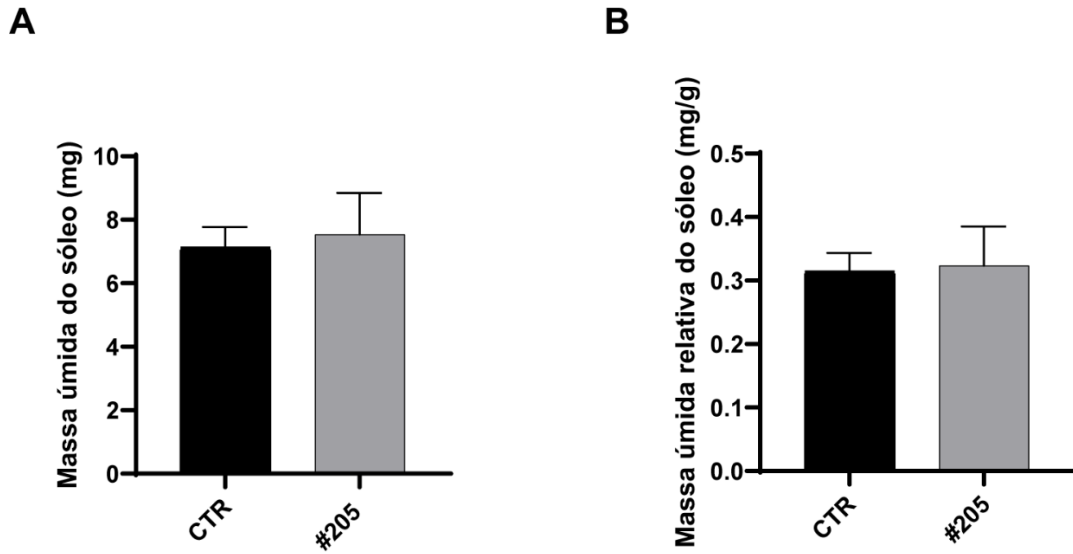
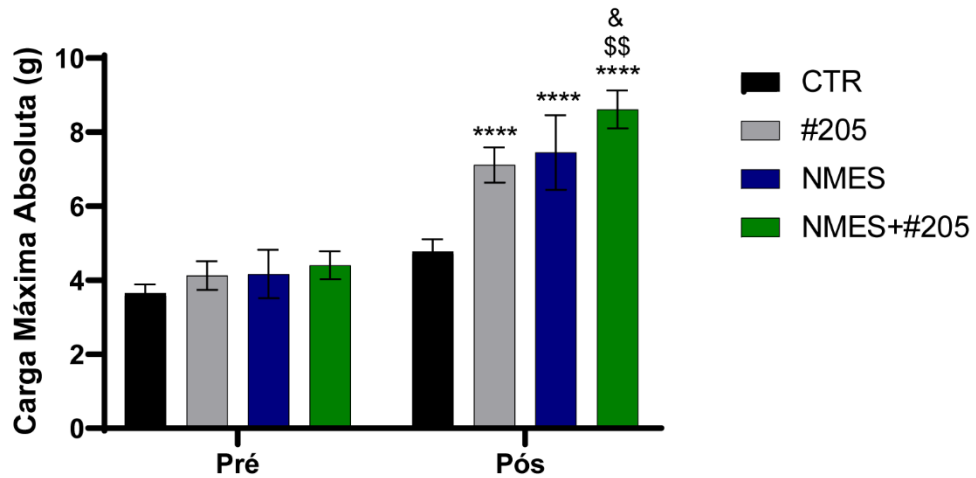


Figura 14 – (A) Medida absoluta da massa úmida do sóleo; (B) Medida relativa da massa úmida do sóleo, normalizada pela massa corporal; os valores estão expressos em média \pm SD. n=8-9 animais/grupo

6.3 Teste de Função Muscular

Para avaliar o ganho de função muscular utilizamos o teste descrito na seção 5.4. (Figura 15). A vantagem desse teste é a possibilidade de realizarmos um acompanhamento longitudinal das intervenções propostas. Ademais, tem elevada especificidade uma vez que o movimento realizado pelos animais é o mesmo que aquele realizado durante as sessões de eletroestimulação.

A



B

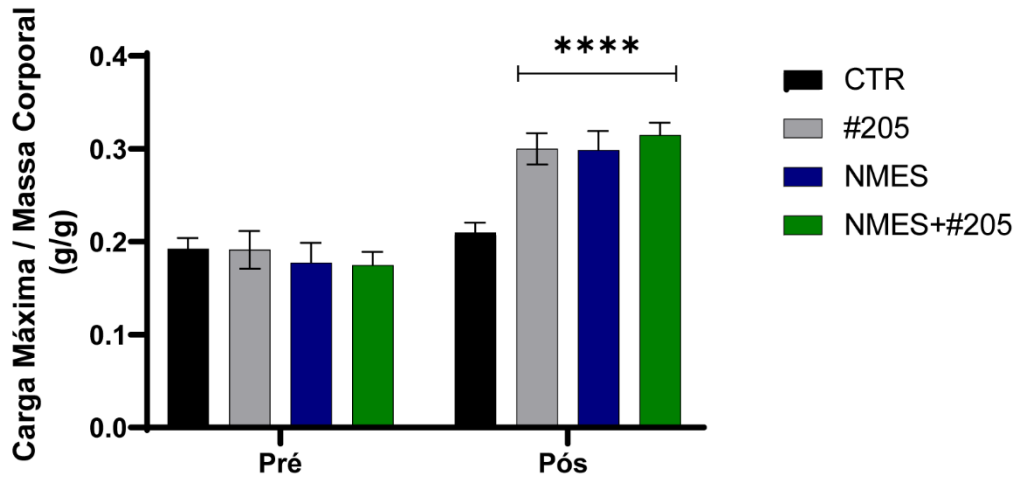


Figura 15 - Resultados dos Testes de Força. O primeiro teste foi conduzido 48h antes do início do tratamento com MyoMed-#205 ou com a ração controle. Já o segundo teste foi realizado após 33 dias do início da intervenção. (A) Carga absoluta erguida pelos animais. (B) Carga Relativa do Teste Máximo, normalizada pela massa corporal total dos camundongos. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. **** $p < 0,0001$ vs. CTR; \$\$\$ $p < 0,005$ vs. #205; & $p < 0,05$ vs. NMES. $n=8-9$ animais/grupo

Em relação as medidas absolutas (Figura 15A), os grupos #205 e NMES ergueram aproximadamente 50% mais cargas em relação ao CTR ($7,1 \pm 0,4g$ vs. $4,7 \pm 0,3g$, p -valor $< 0,0001$ e $7,4 \pm 1,0g$ vs. $4,7 \pm 0,3g$, p -valor $< 0,0001$, respectivamente). Já o grupo NMES+#205 ergueu 82% mais carga em relação ao

CTR ($8,6\pm 0,5\text{g}$ vs. $4,7\pm 0,3\text{g}$, p-valor $< 0,0001$), e apresentou também diferenças quando comparado a #205 (21% mais carga; $8,6\pm 0,5\text{g}$ vs. $7,1\pm 0,4\text{g}$, p-valor = $0,0032$) e NMES (16% mais carga; $8,6\pm 0,5\text{g}$ vs. $7,4\pm 1,0\text{g}$, p-valor = $0,0245$).

Na análise das medidas relativas (Figura 15B) os grupos #205, NMES e NMES+#205 apresentaram um incremento semelhante quando comparados com o CTR, de aproximadamente 40%. #205 apresentou 42% de diferença em relação ao CTR ($0,30\pm 0,016\text{g/g}$ vs. $0,21\pm 0,010\text{g/g}$, p-valor $< 0,0001$). Em NMES e NMES+#205 observamos respectivamente 38% ($0,29\pm 0,020\text{g/g}$ vs. $0,21\pm 0,010\text{g/g}$, p-valor $< 0,0001$) e 47% ($0,31\pm 0,013\text{g/g}$ vs. $0,21\pm 0,010\text{g/g}$, p-valor $< 0,0001$) de diferença em relação a CTR. Não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre #205, NMES e NMES+#205.

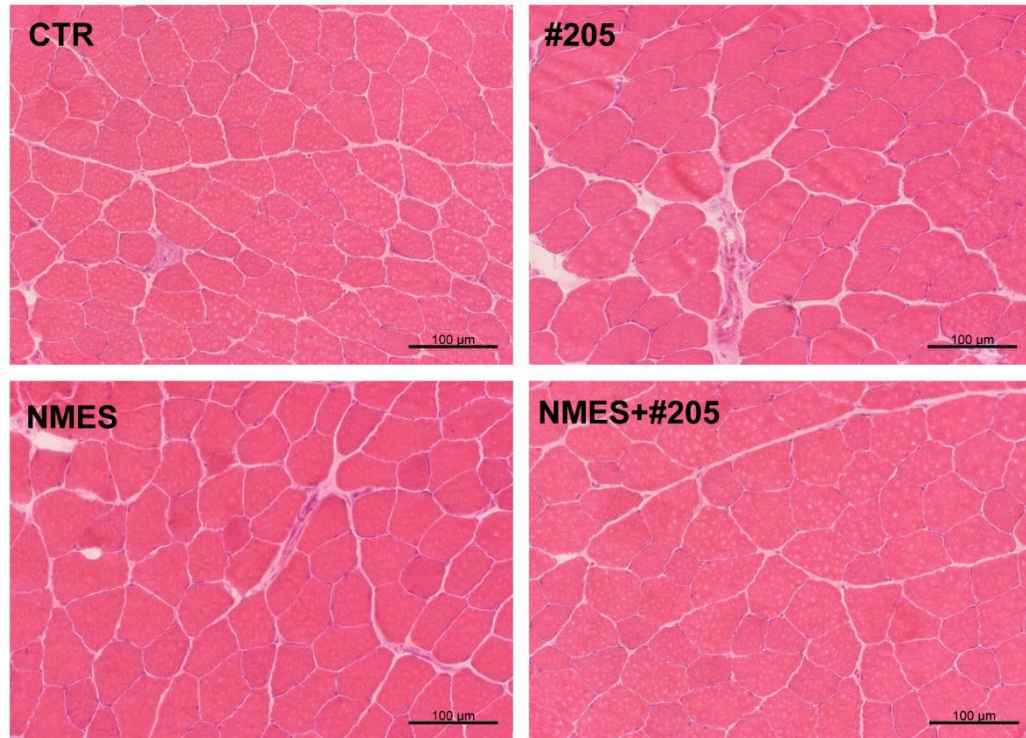
6.4 Medida de Área de Secção Transversal

Dada a diferença na carga máxima nos animais que sofreram alguma forma de intervenção (tratamento com MyoMed-205 e/ou eletroestimulação) o próximo passo foi verificar se esse aumento de força foi acompanhado de hipertrofia das fibras musculares. Para isso realizamos a medição da área de secção transversal das fibras do músculo TA, dado que foi o músculo-alvo da intervenção por eletroestimulação neuromuscular.

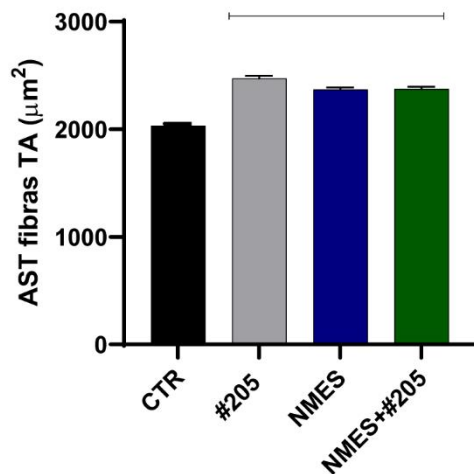
Os grupos que suplementaram e/ou realizaram o treinamento por eletroestimulação apresentaram maiores medidas de AST no músculo TA, quando comparados com CTR. #205 apresentou fibras 21% mais calibrosas ($2472\pm 993,9\mu\text{m}^2$ vs. $2034\pm 774,9\mu\text{m}^2$, p-valor $< 0,0001$) em relação ao controle. Em NMES e NMES+#205, a AST média foi 16% maior (respectivamente, $2368\pm 837,2\mu\text{m}^2$ vs. $2034\pm 774,9\mu\text{m}^2$, p-valor $< 0,0001$; $2374\pm 881,9\mu\text{m}^2$ vs. $2034\pm 774,9\mu\text{m}^2$, p-valor $< 0,0001$) em relação ao grupo CTR. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos #205, NMES e NMES+#205 (Figura 16B). A figura 16A traz fotomicrografias representativas dos quatro grupos experimentais, onde é possível observar visualmente as diferenças evidenciadas na análise estatística.

Na Figura 16C é possível observar maior prevalência de fibras mais calibrosas (maiores que $2000\mu\text{m}^2$) em #205, NMES e NMES+#205, dado o comportamento das curvas desses grupos, que se deslocam para direita. O grupo CTR por sua vez, apresenta maior ocorrência de fibras de aproximadamente $1500\mu\text{m}^2$.

A



B



C

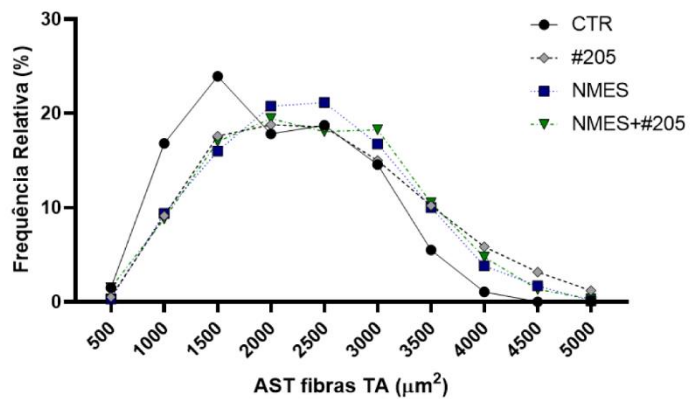


Figura 16 - Resultados da análise histológica do TA. (A) Fotomicrografias representativas do TA dos grupos CTR, #205, NMES e NMES+#205. Aumento 200x; (B) Histograma de frequência da AST das fibras do TA; (C) Média da AST das fibras analisadas do TA. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$ vs. CTR. Foram analisadas em média 1600 fibras musculares por grupo

Devido ao resultado do aumento da área de secção transversal das fibras musculares do grupo #205, ou seja, que apenas consumiu o composto MyoMed-205, optamos por realizar a medida de outro músculo cujo perfil na constituição de suas fibras fosse diferente ao TA. O TA de camundongos é um músculo notadamente conhecido por ser rico em fibras MHC II, enquanto o sóleo por sua vez, apresenta um perfil misto (com presença tanto de fibras MHC I quando MHC II) (73).

Para a observação do efeito da utilização do MyoMed-205 no músculo sóleo utilizamos somente os animais CTR e #205. Nessa análise foi realizado o teste de Mann-Whitney (alternativa para dados não paramétricos ao teste *t* de Student).

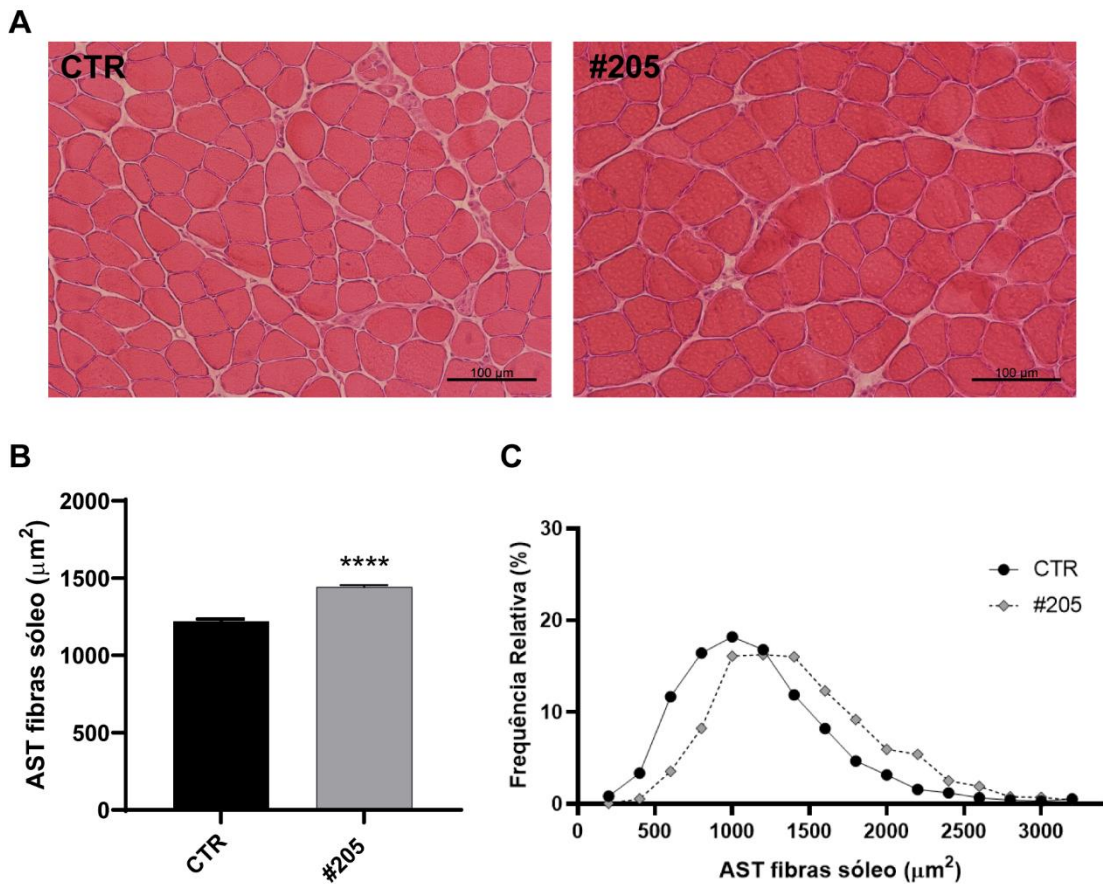


Figura 17 - Resultados da análise histológica do sóleo. (A) Fotomicrografias representativas do sóleo dos grupos CTR e #205. Aumento 200x; (B) Histograma de frequência da AST das fibras presentes no sóleo; (C) Média da AST das fibras do músculo sóleo. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$ vs. CTR. Foram analisadas em média 1600 fibras musculares por grupo

Assim como no TA, também observamos uma hipertrofia significativa no sóleo, como pode ser observado no gráfico presente na figura 17B. Os animais do grupo #205 apresentaram aumento estatisticamente significativa área de secção média das fibras estatisticamente maior que o CTR, aproximadamente 18% maior ($1441 \pm 530 \mu\text{m}^2$ vs. $1220 \pm 630 \mu\text{m}^2$; p-valor $< 0,0001$). Na análise do histograma contendo a distribuição de frequência de acordo com o tamanho da área de secção transversal foi possível visualizar a diferença de prevalência das fibras de maior calibre no grupo tratado com MyoMed-205 (Figura 17C). Portanto, observamos que os animais que consumiram o composto apresentaram fibras tanto do músculo TA quanto sóleo, em torno de 20% maiores do que o controle.

6.5 Número de Mionúcleos

O próximo passo foi certificar se a hipertrofia significativa também gerou aumento no número de mionúcleos e de mionúcleos centralizados nas fibras musculares. Acredita-se que cada mionúcleo é capaz de controlar o processo de expressão gênica e síntese proteica de apenas uma porção finita do citoplasma. Portanto, de acordo com a Teoria do Domínio Mionuclear espera-se que mudanças no tamanho da fibra muscular sejam acompanhadas de alterações no domínio mionuclear, no número de mionúcleos ou então a combinação de ambos (74).

Dada que a hipertrofia observada foi de aproximadamente 20% nos grupos #205, NMES e NMES+#205 é esperado que ocorra também um aumento do número de mionúcleos. Nossos resultados demonstraram que os três grupos experimentais apresentaram um aumento significativo do número de mionúcleos em comparação ao controle, no músculo TA (Figura 18B).

O grupo #205 apresentou 38% mais mionúcleos em comparação ao controle ($0,6266 \pm 0,09494$ mionúcleos/fibra vs. $0,4219 \pm 0,08907$ mionúcleos/fibra; p-valor = $0,0048$), enquanto NMES e NMES+#205 esse aumento foi respectivamente 36% ($0,6163 \pm 0,08893$ mionúcleos/fibra vs. $0,4219 \pm 0,08907$ mionúcleos/fibra; p-valor = $0,0108$) e 47% ($0,6674 \pm 0,08754$ mionúcleos/fibra vs. $0,4219 \pm 0,08907$ mionúcleos/fibra; p-valor = $0,0005$).

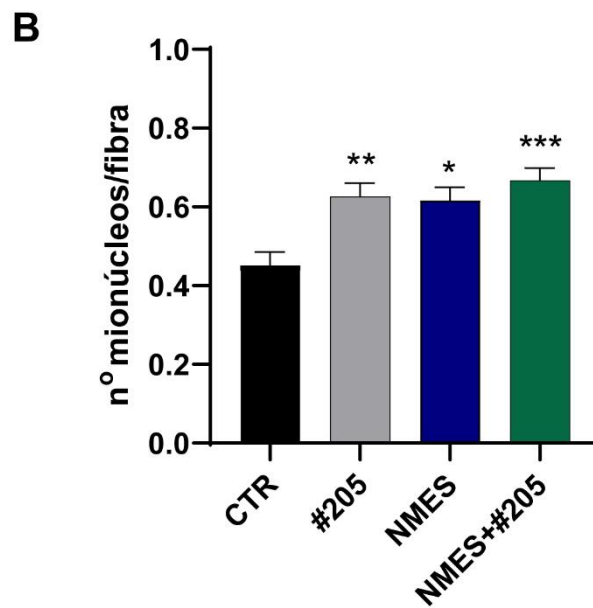
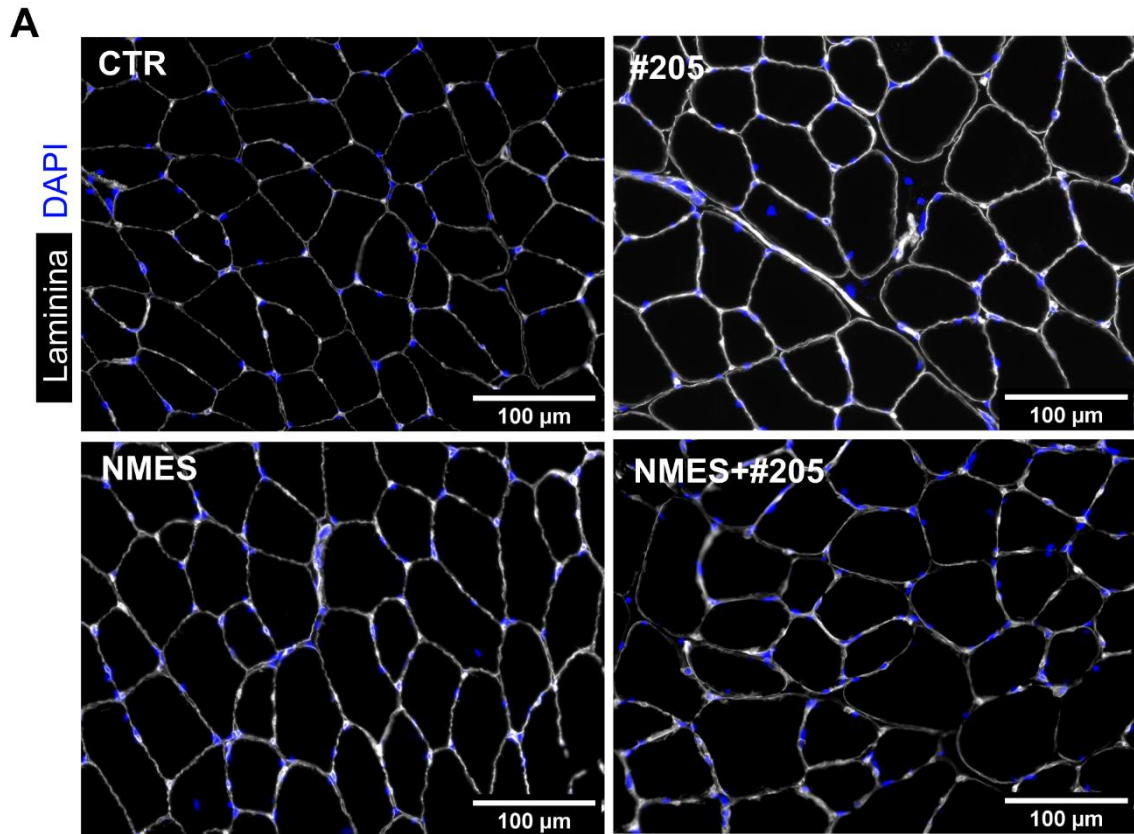


Figura 18 - Resultados da análise por imunofluorescência do músculo TA. (A) Fotomicrografias representativas do TA dos grupos CTR, #205, NMES e NMES+#205. Em branco está marcada a laminina e em azul, DAPI. Aumento 200x; (B) Média do número de mionúcleos por fibra muscular. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ vs. CTR.

6.6 Medida de Área de Secção Transversal Específica e de prevalência de fibras MHC I e MHC II

Os dados observados na H&E de sóleo sugerem que o composto MyoMed-205 promove hipertrofia tanto em fibras positivas para MHC I e II, dado que esse músculo possui uma distribuição mais equilibrada desses dois tipos de fibras quando comparado ao TA. No entanto, foi necessária uma análise mais apurada para observar a magnitude dessa hipertrofia em cada uma dessas fibras. Para isso utilizamos a técnica de imunofluorescência, onde foi possível marcar as duas diferentes isoformas de MHC e a laminina, proteína presente na membrana basal, para que assim fosse possível identificar com maior precisão os limites de cada uma das fibras musculares para a realização das medidas de área de secção transversal.

Para essa análise utilizamos somente os grupos experimentais CTR e #205, dado que nosso principal objetivo foi compreender o efeito do composto inibidor de MuRF1 de acordo com o fenótipo das fibras musculares. Por isso não realizamos as medidas com animais eletroestimulados. Além disso, por termos realizados nossas análises utilizando o músculo sóleo não observaríamos o efeito da eletroestimulação nos diferentes tipos de fibra muscular, uma vez que o músculo-alvo da intervenção foi o TA.

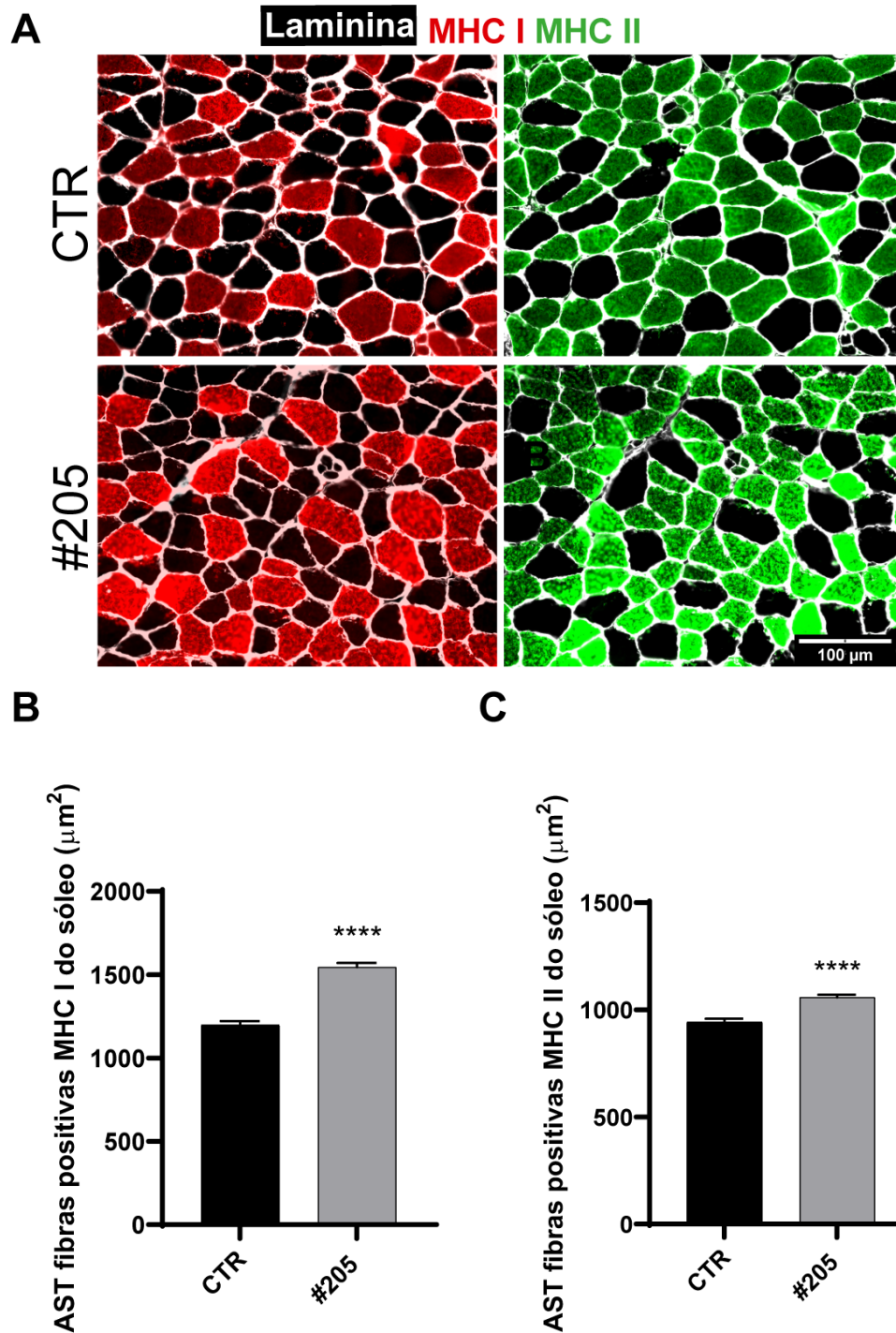


Figura 19 – Resultados da área de secção transversal das fibras musculares positivas para MHC I e II do músculo sóleo. (A) Fotomicrografias representativas do sóleo dos grupos CTR e #205. Em vermelho temos a marcação de fibras MHC I positivas, em verde fibras MHC II positivas e em branco, laminina. Aumento 200x; (B) Média da AST das fibras MHC I positivas do músculo sóleo; (C) Média da AST das fibras MHC II positivas do músculo sóleo. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$ vs. CTR.

Observamos que tanto as fibras positivas para MHC I como para MHC II são responsivas a utilização de MyoMed-205 (Figura 19). Em relação ao controle,

observamos fibras MHC I positivas aproximadamente 28% maiores no grupo #205 ($1546 \pm 216 \mu\text{m}^2$ vs. $1199 \pm 214 \mu\text{m}^2$; p-valor $< 0,0001$). Já as fibras MHC II positivas de #205 foram 12% maiores que o controle ($1058 \pm 177 \mu\text{m}^2$ vs. $943 \pm 198 \mu\text{m}^2$; p-valor $< 0,0001$).

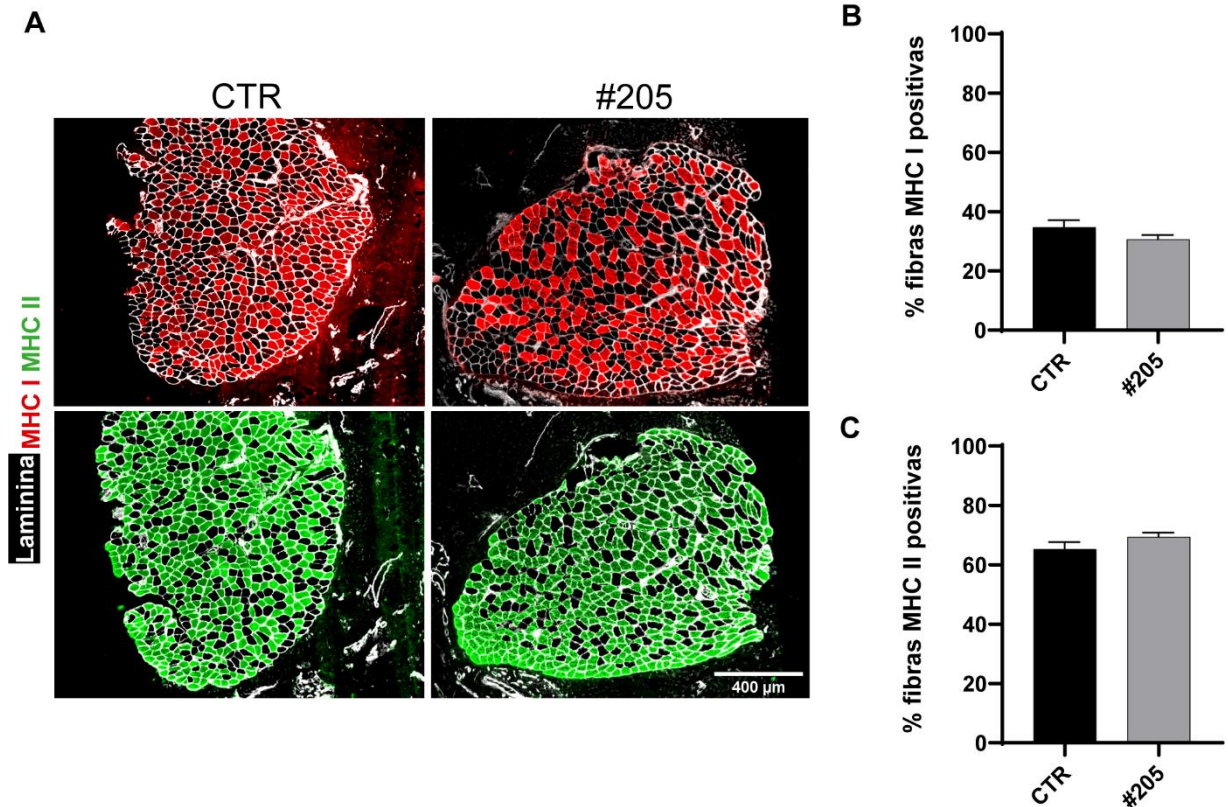


Figura 20 - Resultados da prevalência de fibras musculares positivas para MHC I e II do músculo sóleo. (A) Fotomicrografias representativas do sóleo dos grupos CTR e #205. Em vermelho temos a marcação de fibras MHC I positivas, em verde fibras MHC II positivas e em branco, laminina. Aumento 50x; (B) Porcentagem das fibras MHC I positivas do músculo sóleo; (C) Porcentagem das fibras MHC II positivas do músculo sóleo. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média.

Num segundo momento, avaliamos se o MyoMed-205 seria capaz de alterar a distribuição de fibras MHC I e MHC II positivas. Realizamos a quantificação das fibras por meio de contagem manual, a partir de fotomicrografias panorâmicas de toda a extensão do músculo sóleo (Figura 20A).

Não encontramos diferenças na distribuição das fibras MHC I e II entre os grupos. Como é possível observar nos gráficos das figuras 20B e 20C, tanto CTR como #205 apresentaram aproximadamente 30% fibras positivas (CTR: $34,7 \pm 6,2\%$; #205: $30,6 \pm 3,5\%$; p-valor = $0,2401$) para MHC I e 70% de fibras MHC II (CTR:

65,2±6,2%; #205: 69,3±3,5%; p-valor = 0,2401), condizente com os dados descritos na literatura.

6.7 Quantificação de células-satélite

Dadas as observações realizadas nas fases anteriores do projeto, demos continuidade em caracterizar o efeito anabólico que o composto MyoMed-205 confere a indivíduos saudáveis. Portanto, seguimos caracterizando as alterações observadas no grupo #205 e as comparando com o grupo NMES, cujos animais foram submetidos a uma intervenção que sabidamente leva a hipertrofia da musculatura esquelética.

Para ampliar compreensão do fenômeno observado nas análises de área de secção transversal e força, o próximo passo foi analisar o conteúdo de células-satélite nas fibras musculares. Optamos por analisar as populações de mionúcleos positivos para Pax7 (Pax7⁺) e para MyoD (MyoD⁺) dos grupos CTR, #205 e NMES (Figuras 19 e 20).

Observamos um aumento significativo de mionúcleos Pax7⁺ nos grupos experimentais #205 e NMES em relação ao CTR (Figura 21). Os animais tratados com o composto MyoMed-205 apresentaram cerca de 66% mais mionúcleos Pax7⁺ que CTR (6,06±1,92 mionúcleos Pax7⁺ / 100 fibras vs. 3,64±0,99 mionúcleos Pax7⁺ / 100 fibras; p-valor = 0,0380). Nos animais NMES foi observada uma diferença ainda maior em relação ao CTR: os indivíduos do primeiro grupo apresentaram 123% mais mionúcleos Pax7⁺ (8,12±1,50 mionúcleos Pax7⁺ / 100 fibras vs. 3,64±0,99 mionúcleos Pax7⁺ / 100 fibras; p-valor = 0,0004).

Entre os animais #205 e NMES, observamos uma tendência de aumento no número de mionúcleos positivos para Pax7 no grupo NMES (#205: 6,06±1,92 mionúcleos Pax7⁺ / 100 fibras vs. NMES: 8,12±1,50 mionúcleos Pax7⁺ / 100 fibras; p-valor = 0,07).

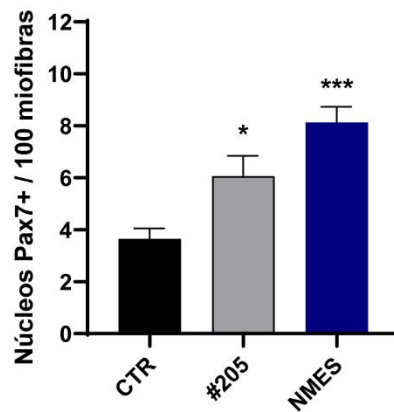
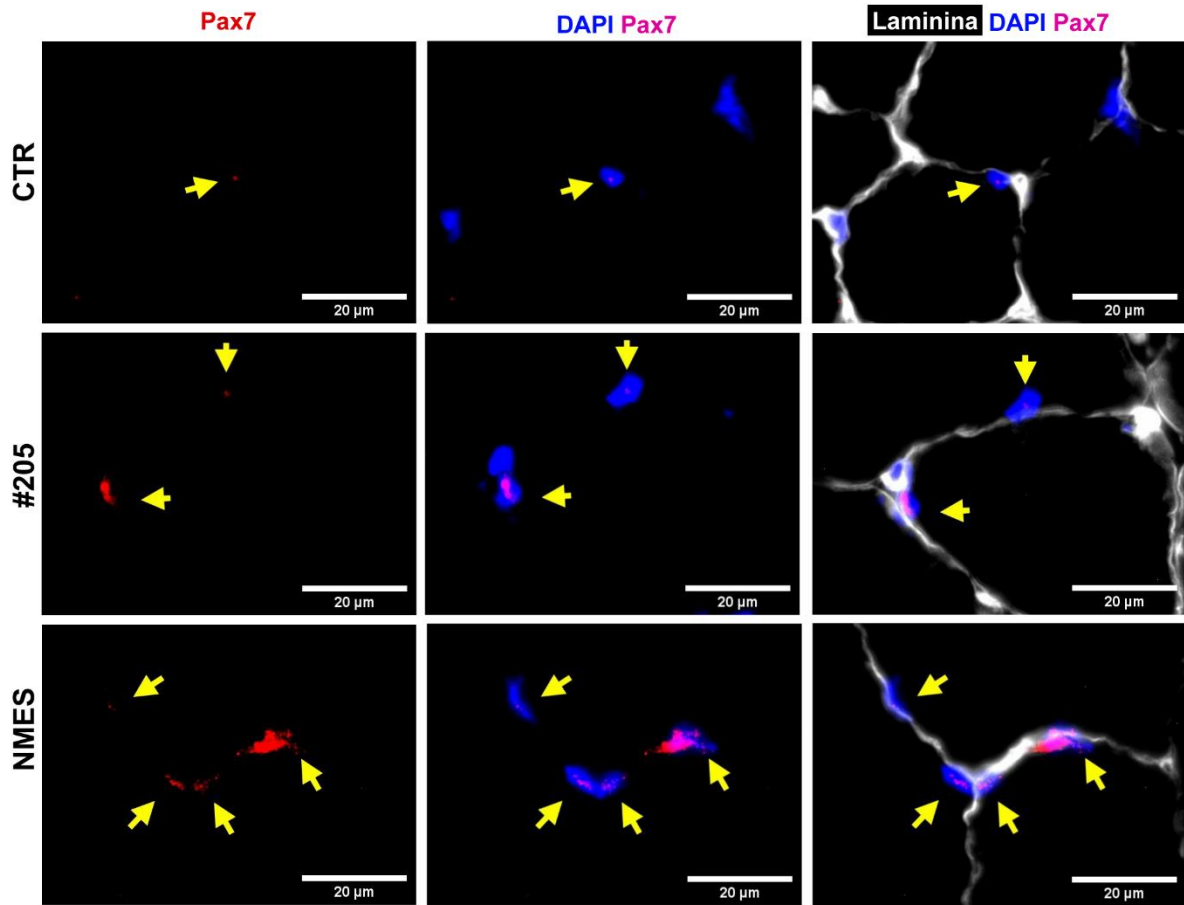


Figura 21 – Resultado da quantificação de mionúcleos Pax7⁺ no músculo TA. (A) Demonstração do ensaio de imunofluorescência para a determinação dos mionúcleos positivos para Pax7⁺. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Os mionúcleos contabilizados estão indicados pelas setas amarelas, onde é possível observar a colocalização com Pax7 resultando na cor rosa. Só foram quantificados os núcleos que se situavam abaixo da lâmina basal. Aumento 400x; (B) Média do número de mionúcleos Pax7⁺ a cada 100 fibras. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs. CTR; *** $p < 0,001$ vs. CTR.

Já na quantificação dos mionúcleos MyoD⁺ também observamos maior ocorrência dessas espécies de células-satélite nos grupos #205 e NMES (Figura 22). #205 apresentou 92% maior conteúdo de myonúcleos MyoD⁺ ($10,87 \pm 1,28$ mionúcleos

MyoD⁺ / 100 fibras vs. 5,61±2,10 mionúcleos MyoD⁺ / 100 fibras; p-valor = 0,0070) e NMES, (11,76±3,26 mionúcleos MyoD⁺ / 100 fibras vs. 5,61±2,10 mionúcleos MyoD⁺ / 100 fibras; p-valor = 0,0022), ambos quando comparado a CTR.

Também não observamos diferenças significativas na comparação entre #205 e NMES (#205: 10,87±1,28 mionúcleos MyoD⁺ / 100 fibras vs. NMES: 11,76±3,26 mionúcleos MyoD⁺ / 100 fibras; p-valor = 0,8227).

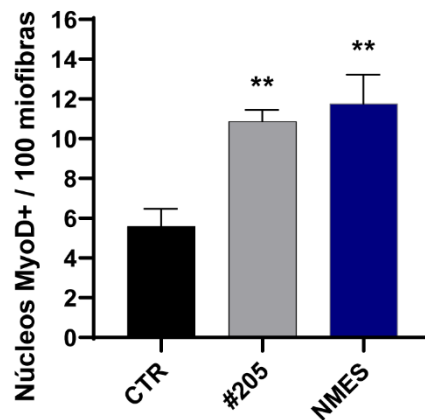
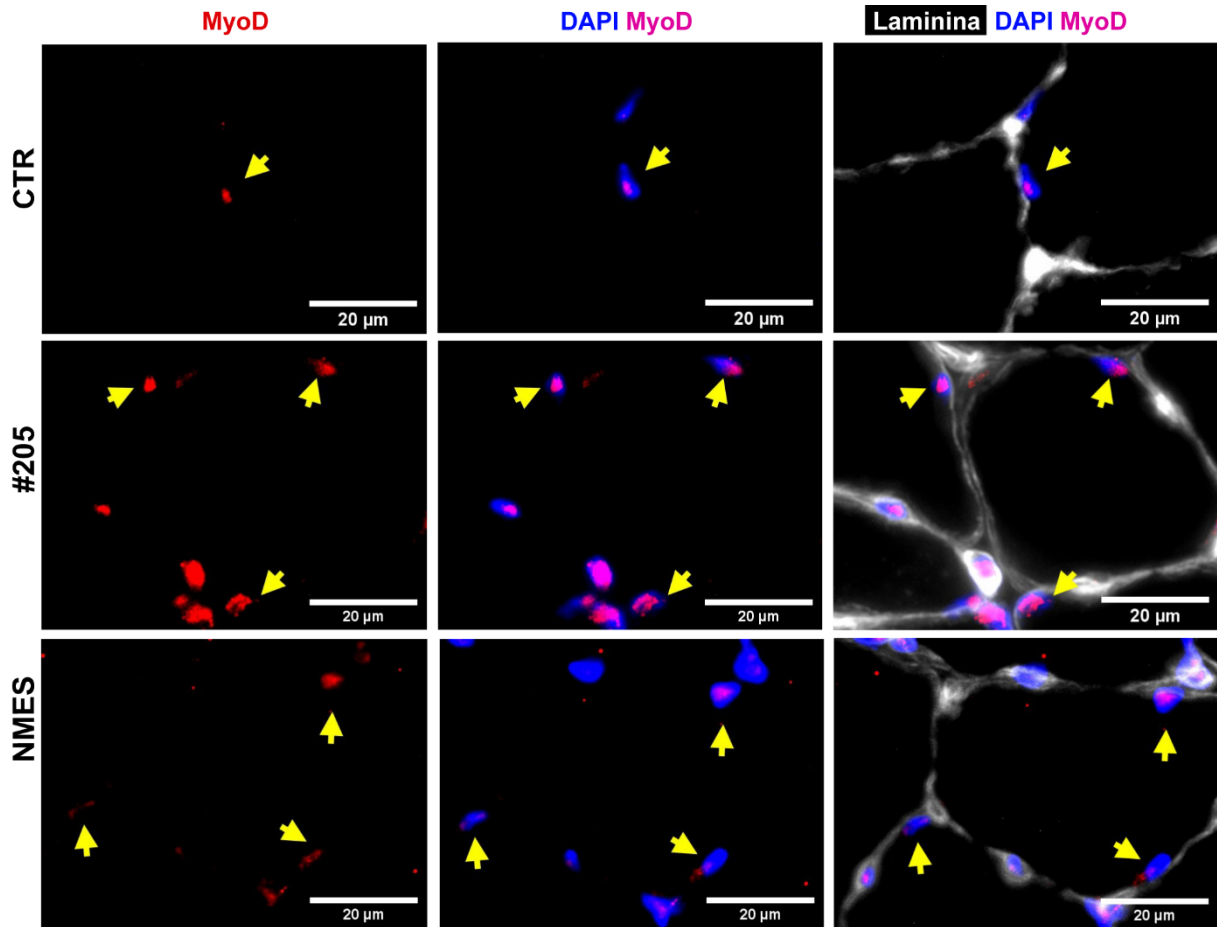


Figura 22 – Resultado da quantificação de mionúcleos MyoD⁺ no músculo TA. (A) Demonstração do ensaio de imunofluorescência para a determinação dos mionúcleos positivos para MyoD⁺. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Os mionúcleos contabilizados estão indicados pelas setas amarelas, onde é possível observar a colocalização com MyoD resultando na cor rosa. Só foram quantificados os núcleos que se situavam abaixo da lâmina basal. Aumento 400x; (B) Média do número de mionúcleos MyoD⁺ a cada 100 fibras. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. **p < 0,005 vs. CTR

7. DISCUSSÃO

Nesse estudo buscamos investigar o papel anabólico da molécula inibidora de MuRF1 e se existe alguma interação com a eletroestimulação neuromuscular, um modelo reconhecidamente capaz de gerar hipertrofia sobretudo em modelos animais. Até então na literatura o composto MyoMed-205 tem sido estudado em modelos de atrofia, mas alguns dados apontavam um potencial efeito anabólico do inibidor seletivo de MuRF1 (22,59,61,75).

Nosso principal objetivo foi caracterizar esse fenômeno e verificar se existe alguma interação com a NMES, um modelo muito empregado para promoção de hipertrofia em modelos animais. A principal vantagem da utilização dessa ferramenta é a possibilidade do estabelecimento de rotinas e protocolos, semelhante ao que ocorre com o treinamento físico resistido.

Apesar desse estudo ter promovido um avanço na compreensão do efeito anabólico do MyoMed-205, ele apresenta a limitação de não ter se aprofundado na elucidação dos aspectos mecanicistas desse fenômeno.

7.1 MyoMed-205 não alterou a composição corporal, nem a massa úmida dos músculos TA e sóleo

No presente trabalho não encontramos diferenças relativas tanto a massa corporal total como a massa da carcaça dos animais do grupo NMES+#205 em relação aos demais. Nossos resultados são diferentes daqueles encontrados no estudo de Adams e colaboradores (2020) onde foi observado um efeito do composto MyoMed-205 na massa corporal total e magra de camundongos, indicando que o inibidor seletivo de MuRF1 promove um aumento de aproximadamente 6% nesses dois parâmetros morfométricos dos animais que consumiram ração enriquecida com a pequena molécula pelo período de 25 dias (22).

Destacamos que nosso modelo experimental é bem diferente daquele empregado no estudo citado. Os camundongos foram manipulados diariamente, seja para a mensuração de massa corporal, quanto para a realização das sessões de eletroestimulação e dos testes de função. Apesar de estarem sedados, trata-se de um estresse imposto aos animais, diferentemente de animais que permaneceram em condições com menor potencial estressor e mais estável.

Nossos resultados não invalidam a importância de futuros estudos que se proponham investigar o efeito do MyoMed-205 em parâmetros relacionados a bioenergética e metabolismo, utilizando outros marcadores e técnicas mais refinadas para mensuração da composição corporal (por exemplo, ressonância magnética).

Em relação a massa dos músculos, notamos um aumento da massa úmida do TA dos animais pertencentes a NMES+205, sugerindo uma possível interação entre o procedimento de eletroestimulação com a utilização do composto. Porém, ao normalizarmos essa medida pela massa corporal, deixamos de observar essa diferença. No caso do sóleo, não observamos diferenças nem nas medidas absolutas da massa desse músculo nem nas relativas.

O trabalho de Adams e colegas (2020), anteriormente citado, nos fornece medidas de massa muscular úmida camundongos com melanoma (22). Nesse caso, tanto o composto MyoMed-205 quanto sua versão antiga, MyoMed-946, foram capazes de atenuar a perda de massa muscular do TA, sóleo e *extensor digitorum longus* (EDL). Porém, destacamos que nosso modelo é totalmente distinto do utilizado por Adams, uma vez que nossos animais eram saudáveis e não foram submetidos a uma intervenção que notadamente induz o processo de atrofia muscular.

Em um trabalho recente envolvendo esse mesmo protocolo de NMES adaptado para camundongos, foi encontrado um ganho de aproximadamente 5% na massa absoluta do TA eletroestimulado comparado com a pata contralateral não estimulada após 16 sessões de treinamento (76). Ou seja, o estudo usou um controle intrasujeito. De fato, para compreender o impacto do protocolo de eletroestimulação na massa úmida a utilização de um controle assim parece mais interessante. Entretanto sabe-se que para a análise do ganho de força/função a utilização da pata contralateral não é vantajoso dada existência do fenômeno neuromuscular da educação cruzada. Além disso, para observar o efeito do MyoMed-205 (principal foco do presente estudo) esse tipo de análise é irrelevante, dado que a inibição seletiva de MuRF1 ocorre de maneira sistêmica.

É importante destacar que as medidas de massa úmida não são tão sensíveis, pois podem ocorrer variações devido a condições ambientais e conteúdo de água intramuscular, por exemplo. Por essa razão, optamos por investigar as diferenças em níveis microscópicos (através das análises histológicas), cujas medidas são mais sensíveis e acuradas. Como exposto na seção 6.4, diferentemente da análise

morfométricas, encontramos diferenças entre os grupos experimentais que serão discutidas mais adiante.

7.2 MyoMed-205 e o protocolo de NMES promoveram aumento de força de maneira similar

Tanto o protocolo de NMES quanto o tratamento com MyoMed-205 foram eficientes para aumentar a força máxima dos animais, observada no teste de função muscular. Uma diferença de 50% na força máxima absoluta de animais tratados com o composto por 24 dias já havia sido descrita por Adams e colaboradores (2020), no qual utilizam o mesmo teste de função (22). No trabalho de Ambrosio e colaboradores (2012) foi observado um incremento de 30% na contração tetânica de camundongos *mdx/SCID* após 20 sessões de eletroestimulação, verificada através do ensaio de contração muscular *in situ* (71). É importante destacar que o ensaio *in situ* não permite o acompanhamento longitudinal dos animais, uma vez trata-se de um experimento invasivo que exige a eutanásia imediata após sua realização.

Em relação ao efeito do MyoMed-205 na força muscular, observamos o mesmo resultado obtido por Adams (que empregou o mesmo modelo de avaliação de força utilizado por nosso grupo), com o aumento de 50% da carga absoluta em #205 e NMES após 35 dias de intervenção. NMES+#205 apresentou uma diferença maior (~80% em relação a CTR), sugerindo um efeito aditivo do MyoMed-205 ao treinamento. Porém, quando observamos a carga normalizada pela massa corporal dos animais temos basicamente a mesma resposta, com o incremento de carga de aproximadamente 40% nos grupos #205, NMES e NMES+#205. Portanto ao observarmos as medidas normalizadas pela massa corporal dos animais, concluímos que a suplementação de MyoMed-205 não apresenta interação aditiva com o exercício. Sua utilização *per se* já geraria um efeito positivo na performance contrátil do músculo.

Trabalhos recentes já apontavam a capacidade protetora que esse inibidor de MuRF1 conferia ao músculo diante de quadros atroficos severos (22,23,60,61). Porém, o presente estudo é o primeiro que demonstra que o MyoMed-205 gera um incremento de força máxima tão significativo quanto a realização de eletroestimulação neuromuscular.

Com base nos nossos resultados, acreditamos que o aumento de força observado se deve ao próprio processo de hipertrofia (que será discutido adiante na

seção 7.3), resultando no aumento de proteínas miofibrilares. Apesar da importância das proteínas contráteis para a geração de força, baseadas na interação actina-miosina, a titina tem sido apontada como uma importante moduladora da tensão passiva no sarcômero, maximizando o trabalho muscular (24).

Tendo em vista que a utilização de MyoMed-205 inibe uma das principais E3-ligases que interage com a titina, uma vez que essa estrutura encontra-se mais preservada e dada sua importância na manutenção da arquitetura do sarcômero ela poderia auxiliar no processo de otimização da contração, o que ajudaria a entender em parte o aumento de força observado no grupo #205 (77).

7.3 MyoMed-205 aumenta a área de secção transversal das fibras musculares e número de mionúcleos

Tendo em vista as hipóteses que as medidas morfométricas levantaram, partimos para análises mais sensíveis para determinar o impacto da utilização do MyoMed-205 no processo de hipertrofia muscular.

Em nossas análises, verificamos que com a utilização da pequena molécula ocorre aumento da área de secção transversal das fibras musculares músculos. No músculo TA constatamos maior calibre das fibras musculares nos grupos #205, NMES e NMES+#205 em relação ao CTR, e sem diferenças significativas entre esses três grupos.

Além do maior calibre das fibras, também observamos aumento do número de mionúcleos nos grupos #205, NMES e NMES+#205, o que corrobora a Teoria do Domínio Mionuclear (78). Ou seja, a hipertrofia resultante da eletroestimulação e da administração do MyoMed-205 promoveu um aumento do domínio mionuclear sendo necessária a acreção de novos mionúcleos a fibra agora hipertrofiada para atender a demanda de síntese proteica.

Em 2017, foi publicado o primeiro trabalho a respeito do inibidor seletivo de MuRF1, porém de sua versão antiga do MyoMed-205 denominada MCEMBL ID#704946 (posteriormente renomeado MyoMed-946). Nesse estudo animais que receberam sucessivas injeções de monocrotalina, um potente alcalóide indutor de caquexia cardíaca. Os roedores que consumiram o composto MyoMed-946 apresentaram menor redução da AST das fibras musculares do TA (60).

Isso mostra o potencial do inibidor em preservar a massa muscular mesmo em quadros atróficos agressivos, de uma maneira semelhante a trabalhos anteriores

envolvendo modelos de deleção de MuRF1, como o feito por Bodine e colaboradores em 2001. Modelos MuRF1 e MuRF2 *knockout* (dKO) descritos na literatura, como o de Witt e colegas (2008), demonstraram que esses animais apresentavam maior AST das fibras do quadríceps quando comparados com camundongos selvagens, o que se alinha com nossos achados (17,65). Por conta da inibição dessa importante E3-ligase a via de degradação proteica orquestrada pela UPS ficaria comprometida. Contudo, Witt não encontrou aumento de expressão de MAFbx/atrogin-1 nos camundongos dKO e, portanto, não ocorreu um mecanismo compensatório para contrabalancear a inibição de MuRF1. Em estudo realizado posteriormente, camundongos idosos MuRF1-KO apresentaram maior expressão de MAFbx/atrogin-1 em comparação aos selvagens (79). Apesar disso, MuRF1-KO não apresentou redução da sua massa muscular esquelética com o envelhecimento, algo que não ocorreu no outro grupo.

Esses dados colaboram para especular que a hipertrofia vista com a utilização da pequena molécula inibidora de MuRF1 ocorreu por conta da redução do *turnover* proteico, ou seja, o processo de síntese superou o de degradação.

7.4 Efeito do MyoMed-205 em fibras MHC I e MHC II positivas

Vista a resposta hipertrófica que o MyoMed-205 promoveu mesmo do músculo TA de animais que não foram eletroestimulados, medimos a AST de outro músculo cuja composição de miosinas de cadeia pesada é distinta: o sóleo.

Diferentemente do TA, o sóleo apresenta maior proporção de miosinas de cadeia pesada (MHCs) do tipo I (73,80). Nossos resultados apontam que as fibras do TA e de sóleo dos grupos #205 apresentaram uma diferença semelhante quando comparadas com o CTR, de aproximadamente 20%. Isso sugere que o efeito anabólico do MyoMed-205 não estaria restrito a somente um tipo de isoformas de MHC.

Para confirmar a hipótese levantada, realizamos os ensaios de imunofluorescência. De fato, após a quantificação da área de secção transversal das fibras positivas para MHC I e MHC II confirmamos que ambas hipertrofiaram de maneira significativa com a administração do MyoMed-205.

É importante destacar que as fibras positivas para MHC I parecem hipertrofiar mais com a administração do MyoMed-205 quando as comparamos com as MHC II. Isso porque em nossos dados observamos as fibras MHC I positivas do grupo #205 foram em média aproximadamente 28% maiores que a do controle, enquanto a

diferença das fibras MHC II positivas foi apenas 12%. Futuros trabalhos poderão realizar uma caracterização mais aprofundada desse fenômeno, utilizando outros sistemas para marcação de miosinas (abrangendo assim outras isoformas) e também analisando outros músculos.

É possível especular os motivos que levaram essa diferença observada na hipertrofia de fibras MHC I e MHC II. Bodine e colegas publicaram no ano de 2021 um trabalho que apresenta o “ubiquitiloma” de MuRF1, obtido através de proteômica quantitativa. Nesse estudo, os pesquisadores demonstraram os principais alvos de MuRF1 e os respectivos resíduos de lisina ubiquitinados pela E3-ligase. Dentre esses alvos listados pelos autores é possível observar a presença de Miosina 1 (Myh1), Miosina 2 (Myh2) e Miosina 4 (Myh4), os respectivos genes responsáveis pela expressão das MHC Ix, Ila e Iib (52,81).

Apesar desses dados não parecerem inicialmente alinhados ao que foi observado nesse trabalho destacamos que o modelo de Bodine é totalmente distinto do nosso, já que envolveu uma “superexpressão” de MuRF1 por um período de 14 dias. Nossos animais eram jovens saudáveis, e com a inibição parcial de MuRF1 verificamos hipertrofia das fibras musculares em especial das fibras MHC I positivas. Nossa hipótese é que fibras de perfil oxidativo (ou seja, as de tipo I e do tipo Ila) parecem ser mais responsivas ao inibidor seletivo de MuRF1, devido a maior densidade e volume mitocondriais nessas fibras (73). É provável que a hipertrofia que observamos nas fibras MHC II positivas seja da subpopulação correspondente a MHC Ila mas que não foi possível a caracterização devido aos anticorpos utilizados nesse trabalho. Trabalhos anteriores sugerem o potencial do MyoMed-205 para a melhoria da eficácia das atividades mitocondriais (22). Além disso, sabe-se que fibras oxidativas apresentam maior abundância do co-ativador transcripcional PGC-1 α que também é um dos reguladores de FoxO3. PGC-1 α é capaz de inibir FoxO3 e assim impedir a transcrição das E3-ligases, em especial MAFbx/Atrogin-1 (52). Nossos resultados apontam para a necessidade de futuros trabalhos que se aprofundem na compreensão e caracterização do impacto do uso da inibição parcial de MuRF1 na atividade mitocondrial e no metabolismo oxidativo.

Em relação a prevalência de fibras MHC I e MHC II positivas, não observamos diferenças entre CTR e #205. No modelo de *knock-out* de MuRF1 utilizado por Moriscot e colaboradores (2010) foi verificada uma maior prevalência de fibras MHC II positivas nos animais MuRF1-KO em relação ao controle. Porém, nesse

experimento foram usados animais com deleção completa desse atrogene, diferentemente do nosso trabalho onde realizamos somente uma inibição parcial.

Portanto, concluímos que nossas análises demonstram que essa inibição parcial não seria suficiente para promover uma mudança no fenótipo das fibras musculares em um período de 35 dias de tratamento.

7.5 MyoMed-205 promoveu o aumento de Pax7 e MyoD

Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com MyoMed-205 apresentaram maior ativação de Pax7 e MyoD, sem diferenças significativas em relação aos animais que passaram pelo processo de eletroestimulação neuromuscular.

Esse dado justifica a observação relativa ao aumento do número de mionúcleos presentes nas fibras musculares dos animais dos grupos experimentais #205, NMES e NMES+#205. Optamos por não realizar as análises das populações de células satélite dos animais NMES+#205, porém dados os resultados dos dois demais grupos experimentais podemos supor que também ocorreu um aumento significativo em relação ao grupo controle.

Na literatura atualmente não temos dados de como a inibição parcial de MuRF1 poderia promover a ativação de células-satélites. Nem mesmo estudos envolvendo animais *knock-out* realizaram essa associação. No entanto, sabemos que mTORC1 está envolvida na transição do estado das células-satélite do quiescente para o ativo (82). Como comentado anteriormente, Ribeiro e colegas (2023) demonstraram aumento da atividade de Akt em ratos tratados agudamente com MyoMed-205 (21). Portanto, uma hipótese é que o MyoMed-205 promova a ativação e proliferação de células-satélites por meio de um aumento da expressão das vias de síntese no músculo esquelético. No entanto, experimentos futuros envolvendo análise de expressão proteica deverão confirmar essa hipótese.

8. CONCLUSÕES

Podemos concluir que o novo composto inibidor seletivo de MuRF1, MyoMed-205, promove hipertrofia do músculo esquelético e aumento de força, de maneira semelhante ao tratamento utilizando eletroestimulação.

Futuros estudos serão necessários para melhor caracterização sob o aspecto molecular, do fenômeno observado. Além disso, destacamos a necessidade da realização de projetos que envolvam modelos de denervação e imobilização a fim de observar o efeito do MyoMed-205 para melhor compreensão do potencial desse inibidor no contexto clínico.

9. REFERÊNCIAS

1. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol*. 2012;2(2):1143–211.
2. Chodzko-Zajko WJ, Proctor DN, Fiatarone Singh MA, Minson CT, Nigg CR, Salem GJ, et al. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(7):1510–30.
3. Nascimento CM, Ingles M, Salvador-Pascual A, Cominetti MR, Gomez-Cabrera MC, Viña J. Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise. *Free Radic Biol Med [Internet]*. 2019;132(June 2018):42–9
4. Zampieri S, Pietrangelo L, Loeffler S, Fruhmans H, Vogelauer M, Burggraf S, et al. Lifelong physical exercise delays age-associated skeletal muscle decline. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(2):163–73.
5. Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR. Exercise Promotes Healthy Aging of Skeletal Muscle. *Cell Metab [Internet]*. 2016;23(6):1034–47
6. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell [Internet]*. 2014;159(4):738–49
7. Charlotte M, Severinsen K, Pedersen BK. Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. :594–609.
8. Brook MS, Wilkinson DJ, Smith K, Atherton PJ. It's not just about protein turnover: the role of ribosomal biogenesis and satellite cells in the regulation of skeletal muscle hypertrophy. *Eur J Sport Sci*. 2019;19(7):952–63.
9. Wackerhage H, Schoenfeld BJ, Hamilton DL, Lehti M, Hulmi JJ. Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. *J Appl Physiol*. 2019;126(1):30–43.
10. Castelo L, Martins G, Venícios M, Lopes DO, Maciel C, Nirla D, et al. The factors related to a sedentary lifestyle : A meta-analysis review. 2021;(October 2020):1188–205.
11. Ginis KAM, Ploeg HP Van Der, Foster C, Lai B, McBride CB, Ng K, et al.

- Physical Activity 2 Participation of people living with disabilities in physical activity : a global perspective. 2021;443–55.
12. Urso ML, Chen YW, Scrimgeour AG, Lee PC, Lee KF, Clarkson PM. Alterations in mRNA expression and protein products following spinal cord injury in humans. *J Physiol*. 2007;579(3):877–92.
 13. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*. 2004;18(1):39–51.
 14. Taillandier D, Polge C. Skeletal muscle atrogenes: From rodent models to human pathologies. *Biochimie*. 2019;166:251–69.
 15. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14440–5.
 16. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx / atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;95616(307):E469–E484.
 17. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal Muscle Atrophy. *Science* (80-). 2001;294(5547):1704–8.
 18. Doucet BM, Lam A, Griffin L. Neuromuscular Electrical Stimulation for Skeletal Muscle Function. *Yale J Biol Med*. 2012;85(2):201–15.
 19. Mettler JA, Magee DM, Doucet BM, Performance H, Marcos S, Therapy O, et al. High-Frequency Neuromuscular Electrical Stimulation Increases Anabolic Signaling. 2018;1540–8.
 20. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2021;6(1).
 21. Ribeiro F, Alves PKN, Bechara LRG, Ferreira JCB, Labeit S, Moriscot AS. Small-Molecule Inhibition of MuRF1 Prevents Early Disuse-Induced Diaphragmatic Dysfunction and Atrophy. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):1–17.

22. Adams V, Gußen V, Zozulya S, Cruz A, Moriscot A, Linke A, et al. Small-Molecule Chemical Knockdown of MuRF1 in Melanoma Bearing Mice Attenuates Tumor Cachexia Associated Myopathy. *Cells*. 2020;9(10):2272.
23. Scalabrin M, Adams V, Labeit S, Bowen TS. Emerging strategies targeting catabolic muscle stress relief. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):1–18.
24. Freundt JK, Linke WA. Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *J Appl Physiol*. 2019;126(5):1474–82.
25. McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol*. 2002;157(1):125–36.
26. Mrosek M, Meier S, Ucurum-Fotiadis Z, Von Castelmur E, Hedbom E, Lustig A, et al. Structural analysis of B-box 2 from MuRF1: Identification of a novel self-association pattern in a RING-like fold. *Biochemistry*. 2008;47(40):10722–30.
27. Sartori R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun [Internet]*. 2021;12(1):1–12.
28. Greising SM, Gransee HM, Mantilla CB, Sieck GC. Systems biology of skeletal muscle : fiber type as an organizing principle. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012;4(5):457-473.
29. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2020;12(1):1–46.
30. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle : A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int*. 2015 Mar;96(3):183-95.
31. Bogomolovas J., Fleming J.R., Franke B., Manso B., Simon B., Gasch A., Markovic M., Brunner T., Knöll R., Chen J., Labeit S., Scheffner M., Peter C., Mayans O.. Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Rep*. 2021 Oct 5;22(10):e48018.

32. Romanello V, Sandri M. The connection between the dynamic remodeling of the mitochondrial network and the regulation of muscle mass. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2021;78(4):1305–28.
33. Schiaffino S, Reggiani C, Akimoto T, Blaauw B. Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy. *J Neuromuscul Dis*. 2021;8(2):169–83.
34. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*. 2013;280(17):4294–314.
35. Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science (80-)*. 2019;366(6467):818–22.
36. Hinnebusch AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem*. 2014;83(2):779–812.
37. Yin L, Li N, Jia W, Wang N, Liang M, Yang X, et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacol Res*. 2021;172(August).
38. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2013;45(10):2121–9.
39. Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: Molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;14(1):58–74.
40. Yarar-Fisher C, Bickel CS, Kelly NA, Windham ST, Mclain AB, Bamman MM. Mechanosensitivity may be enhanced in skeletal muscles of spinal cord-injured versus able-bodied men. *Muscle and Nerve*. 2014;50(4):599–601.
41. Nishimura Y, Musa I, Holm L, Lai YC. Recent advances in measuring and understanding the regulation of exercise-mediated protein degradation in skeletal muscle. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2021;321(2):C276–87.
42. Karamian BA, Siegel N, Nourie B, Serruya MD, Heary RF, Harrop JS, et al. The role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury. *J Orthop Traumatol* [Internet]. 2022;23(1).
43. Toth MJ. Utility of Neuromuscular Electrical Stimulation to Preserve Quadriceps

- Muscle Fiber Size and Contractility Following Anterior Cruciate Ligament Injury and Reconstruction: A Randomized, Sham-Controlled, Blinded Trial. *Physiol Behav* [Internet]. 2018;176(5):139–48.
44. Nonoyama T, Shigemi H, Kubota M, Matsumine A, Shigemi K, Ishizuka T. Neuromuscular electrical stimulation in the intensive care unit prevents muscle atrophy in critically ill older patients: A retrospective cohort study. *Med (United States)*. 2022;101(31):E29451.
 45. Hardy EJ, Hatt J, Doleman B, Smart TF, Piasecki M, Lund JN, et al. Post-operative electrical muscle stimulation attenuates loss of muscle mass and function following major abdominal surgery in older adults: A split body randomised control trial. *Age Ageing*. 2022;51(10):1–8.
 46. Feger MA, Goetschius J, Love H, Saliba SA, Hertel J. Electrical stimulation as a treatment intervention to improve function, edema or pain following acute lateral ankle sprains: A systematic review. *Phys Ther Sport* [Internet]. 2015;16(4):361–9.
 47. Willand MP, Nguyen MA, Borschel GH, Gordon T. Electrical Stimulation to Promote Peripheral Nerve Regeneration. *Neurorehabil Neural Repair*. 2016;30(5):490–6.
 48. Luo R, Dai J, Zhang J, Li Z. Accelerated Skin Wound Healing by Electrical Stimulation. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(16):1–15.
 49. Langeard A, Bigot L, Chastan N, Gauthier A. Does neuromuscular electrical stimulation training of the lower limb have functional effects on the elderly?: A systematic review. *Exp Gerontol* [Internet]. 2017;91:88–98.
 50. Anjum A, Yazid MD, Daud MF, Idris J, Hwei Ng AM, Naicker AS, et al. Spinal cord injury: Pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):1–35.
 51. Bochkezanian V, Newton RU, Trajano GS, Blazevich AJ. Effects of Neuromuscular Electrical Stimulation in People with Spinal Cord Injury. *Med Sci Sports Exerc*. 2018;50(9):1733–9.
 52. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber

- type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2013;45(10):2191–9.
53. Otzel DM, Kok HJ, Graham ZA, Barton ER, Yarrow JF. Pharmacologic approaches to prevent skeletal muscle atrophy after spinal cord injury. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2021;60:193–9.
 54. Léger B, Senese R, Al-Khodairy AW, Dériaz O, Gobelet C, Giacobino JP, et al. Atrogin-1, MuRF1, and FoXo, as well as phosphorylated GSK-3 β and 4E-BP1 are reduced in skeletal muscle of chronic spinal cord-injured patients. *Muscle and Nerve*. 2009;40(1):69–78.
 55. Bickel CS, Slade JM, Haddad F, Adams GR, Dudley GA. Acute molecular responses of skeletal muscle to resistance exercise in able-bodied and spinal cord-injured subjects. *J Appl Physiol*. 2003;94(6):2255–62.
 56. Lach-Trifilieff E, Minetti GC, Sheppard K, Ibebunjo C, Feige JN, Hartmann S, et al. An Antibody Blocking Activin Type II Receptors Induces Strong Skeletal Muscle Hypertrophy and Protects from Atrophy. *Mol Cell Biol*. 2014;34(4):606–18.
 57. Morvan F, Rondeau JM, Zou C, Minetti G, Scheufler C, Scharenberg M, et al. Blockade of activin type II receptors with a dual anti-ActRIIA/IIB antibody is critical to promote maximal skeletal muscle hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(47):12448–53.
 58. Tipton KD, Hamilton DL, Gallagher IJ. Assessing the Role of Muscle Protein Breakdown in Response to Nutrition and Exercise in Humans. *Sport Med* [Internet]. 2018;48(s1):53–64.
 59. Labeit S, Hirner S, Bogomolovas J, Cruz A, Myrzabekova M, Moriscot A, et al. Regulation of glucose metabolism by murf1 and treatment of myopathy in diabetic mice with small molecules targeting murf1. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1–15.
 60. Bowen TS, Adams V, Werner S, Fischer T, Vinke P, Brogger MN, et al. Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(6):939–53.

61. Adams V, Bowen TS, Werner S, Barthel P, Amberger C, Konzer A, et al. Small-molecule-mediated chemical knock-down of MuRF1/MuRF2 and attenuation of diaphragm dysfunction in chronic heart failure. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019;10(5):1102–15.
62. Franke B, Gasch A, Rodriguez D, Chami M, Khan MM, Rudolf R, et al. Molecular basis for the fold organization and sarcomeric targeting of the muscle atrogen muRF1. *Open Biol*. 2014;4(MARCH).
63. Adams V, Schauer A, Augstein A, Kirchhoff V, Draskowski R, Jannasch A, et al. Targeting MuRF1 by small molecules in a HFpEF rat model improves myocardial diastolic function and skeletal muscle contractility. 2022;(March):1565–81.
64. Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*. 2020;9(9):1–25.
65. Witt CC, Witt SH, Lerche S, Labeit D, Back W, Labeit S. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J*. 2008;27(2):350–60.
66. McLeod JC, Stokes T, Phillips SM. Resistance exercise training as a primary countermeasure to age-related chronic disease. *Front Physiol*. 2019 Jun 6;10:645.
67. Zurlo F, Larson K, Bogardus C, Ravussin E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest*. 1990;86(5):1423–7.
68. Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O’Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J*. 2004;18(9):1025–7.
69. Perry JC, Schuetz TM, Memon MD, Faiz S, Cancarevic I. Anabolic Steroids and Cardiovascular Outcomes: The Controversy. *Cureus*. 2020;12(7).
70. Alves PKN, Silvestre JG, Wyllie W, Sougey D, Cruz A, Moriscot A. Improved Electrical Stimulation-Based Exercise Model to Induce Mice Tibialis Anterior

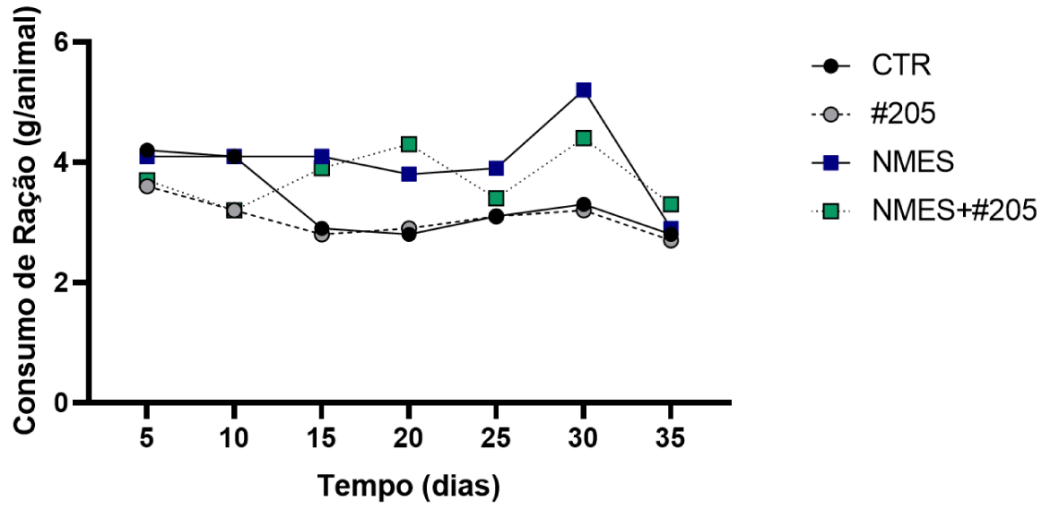
- Muscle Hypertrophy and Function. *Applied Sciences*. 2022; 12(15): 7673
71. Ambrosio F, Kelley Fitzgerald G, Ferrari R, Distefano G, Carvell G. A murine model of muscle training by neuromuscular electrical stimulation. *J Vis Exp*. 2012;(63):1–6.
 72. Liu F, Fry CS, Mula J, Jackson JR, Lee JD, Peterson CA, et al. Automated fiber-type-specific cross-sectional area assessment and myonuclei counting in skeletal muscle. 2013;40536:1714–24.
 73. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011;91(4):1447–531.
 74. Snijders T, Smeets JSJ, van Kranenburg J, Kies AK, van Loon LJC, Verdijk LB. Changes in myonuclear domain size do not precede muscle hypertrophy during prolonged resistance-type exercise training. *Acta Physiol*. 2016;216(2):231–9.
 75. Bowen TS, Adams V, Werner S, Fischer T, Vinke P, Brogger MN, et al. Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(6):939–53.
 76. Lotri-Koffi A, Pauly M, Lemarié E, Godin-Ribuot D, Tamsier R, Pépin JL, et al. Chronic neuromuscular electrical stimulation improves muscle mass and insulin sensitivity in a mouse model. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–10.
 77. Mrosek M, Labeit D, Witt S, Heerklotz H, Castelmur E, Labeit S, et al. Molecular determinants for the recruitment of the ubiquitin-ligase MuRF-1 onto M-line titin. *FASEB J*. 2007;21(7):1383–92.
 78. Hawke TJ. Muscle stem cells and exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*. 2005;33(2):63–8.
 79. Hwee DT, Baehr LM, Philp A, Baar K, Bodine SC. Maintenance of muscle mass and load-induced growth in Muscle RING Finger 1 null mice with age. *Aging Cell*. 2014;13(1):92–101.
 80. Augusto V, Padovani CR, Campos GER. Skeletal Muscle Fiber Types in C57BL6J Mice. *Brazilian J Morphol Sci*. 2004;21(2):89–94.

81. Baehr LM, Hughes DC, Lynch SA, Van Haver D, Maia TM, Marshall AG, et al. Identification of the MuRF1 Skeletal Muscle Ubiquitylome Through Quantitative Proteomics. *Function*. 2021;2(4):1–18.
82. Relaix F, Bencze M, Borok MJ, Der Vartanian A, Gattazzo F, Mademtzoglou D, et al. Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):1–11.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1: Consumo de ração

A



B

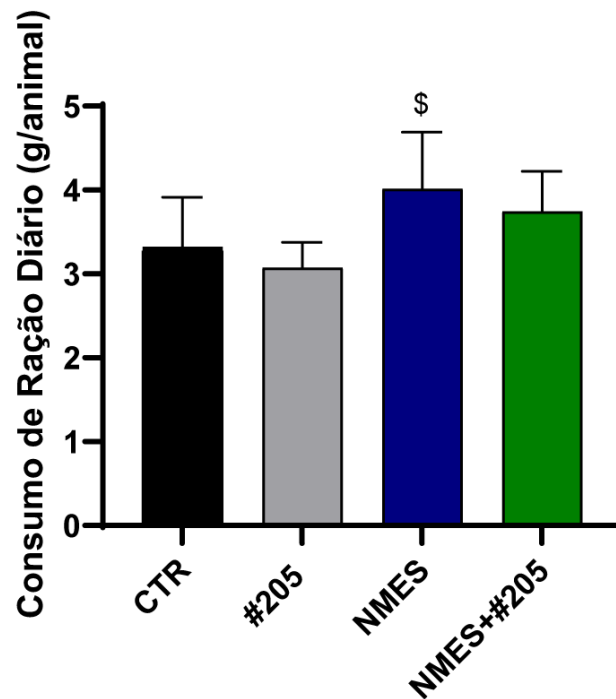


Figura 23 – (A) Medidas do consumo (média individual) de ração ao longo dos 35 dias de experimento. (B) Consumo médio de ração dos grupos experimentais durante o experimento. Os valores estão expressos em média \pm SD. \$ $p < 0,05$ vs. #205. $n=8-9$ animais/grupo

*10.2 Anexo 2: Composição básica e tabela nutricional da ração Rhosterlab
Manutenção*

Ração comercial Rhosterlab para ratos e camundongos em fase experimental (indicação do produto RH29586)

Composição básica do produto: sêmola gritis moída, farelo de soja, caulium, farinha de carne, farelo de arroz, melação, farelo de trigo, DL-metionina, sal refinado, fósforo bicálcico, mix Rhostermix, L-lisina, óleo de soja, sacarose P.A

Níveis de Garantia por kg do produto:

Umidade (máx.)	101g	10,08%
Proteína bruta (min.)	218g	21,79%
Extrato etéreo (máx.)	49g	4,87%
Fibra bruta (máx.)	21g	2,06%
Matéria mineral (min.)	9,1g	9,09%
Cálcio (min./máx.)	15g	1,51%
Fósforo (min.)	12g	1,15%