



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



ISABELA APARECIDA DIVINO

**CARACTERIZAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
CAMUNDONGOS PARKIN^{-/-} NA MEIA IDADE**

LIMEIRA
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



ISABELA APARECIDA DIVINO

**CARACTERIZAÇÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
CAMUNDONGOS PARKIN^{-/-} NA MEIA IDADE**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do
título de Mestra em Ciências da
Nutrição e do Esporte e Metabolismo*

Orientador: Prof. Dr. Igor Luchini Baptista.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ISABELA APARECIDA DIVINO, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. IGOR LUCHINI BAPTISTA

LIMEIRA
2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

D642c Divino, Isabela Aparecida, 1995-
Caracterização do músculo esquelético de camundongos Parkin nocaute na meia idade / Isabela Aparecida Divino. – Limeira, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Igor Luchini Baptista.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Músculo esquelético. 2. Atrofia. I. Baptista, Igor Luchini, 1984-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Skeletal muscle characterization of middle-aged parkin knockout mice

Palavras-chave em inglês:

Skeletal muscle

Atrophy

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Igor Luchini Baptista [Orientador]

Jose Rodrigo Pauli

João Guilherme de Oliveira Silvestre

Data de defesa: 24-01-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7007-7842>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1722473575767739>

Folha de Aprovação

Autora: Isabela Aparecida Divino

Título: Caracterização do músculo esquelético de camundongos Parkin^{-/-} na meia idade

Natureza: Dissertação

Área de Concentração: Ciências nutricionais e metabolismo

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 24 de janeiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Igor Luchini Baptista
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. João Guilherme de Oliveira Silvestre
Faculdade Alvorada Saúde

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico essa Dissertação primeiramente à Deus, pois sem ele, eu nada seria. À minha família e amigos sinceros, que acompanharam minha trajetória até aqui, e não só observaram, como tiveram importante papel me incentivando. Dedico também a todos os integrantes do Laboratório de Biologia celular e Tecidual da UNICAMP, o qual me orgulho de fazer parte e agradeço imensamente a cada minuto doado em minha ajuda e orientação.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição e do esporte e metabolismo - CNEM

À Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo
– FAPESP, financiamento nº 2019/016675 e 19/122365

Ao Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico-
CNPq

À toda comunidade científica Unicamp

À meus pais, orientador, amigos e colegas de laboratório

EPÍGRAFE

“Tenho dito e gosto de afirmar que a minha história é uma história perigosa, como é a história de quem sai das classes populares, de uma subalternidade, e consegue galgar outros espaços. ”

Conceição Evaristo

RESUMO

O Parkinson é uma doença crônica que atinge os neurônios dopaminérgicos levando a morte dos mesmos e causando sintomas como: bradiscinesia, rigidez postural e tremor de repouso. A doença ocorre normalmente na fase idosa, mas quando atinge pessoas mais jovens, é denominada de início precoce, e têm causalidade em sua maioria por mutações no gene PARK2, que codifica a proteína Parkin. Sabe-se que, além dos sintomas citados, a sarcopenia também pode aparecer ao decorrer da doença, e esse distúrbio está relacionado com desregulações no turnover proteico e disfunções mitocondriais, como no processo de mitofagia. Mitofagia é a autofagia seletiva de mitocôndrias disfuncionais, que pode ocorrer pela via PINK1 e Parkin. Estudos confirmam que os animais Parkin^{-/-} possuem mitofagia prejudicada, e, no tecido muscular, podem ser afetados em regeneração e contração. Diante disso, o trabalho apresentado objetivou analisar o tecido muscular esquelético de camundongos Parkin^{-/-} na meia-idade (10 meses), investigar vias de síntese proteica e funcionamento mitocondrial, em dois diferentes músculos: sóleo e tibial. Observamos que os animais Parkin^{-/-} na meia-idade não apresentam perda de capacidade ou de locomoção motora, mas têm um pequeno déficit no equilíbrio. Vimos que o músculo sóleo desses animais é menor em massa e também no diâmetro de miofibras. Além disso, a capacidade respiratória mitocondrial do sóleo diminui na meia-idade nos animais Parkin^{-/-}. Observamos adicionalmente, que a via de síntese proteica sofre alterações com a idade em ambos os músculos, quando analisamos as proteínas AKT e 4E-BP1. Em conclusão, observamos que camundongos Parkin^{-/-} apresentam alterações na via de síntese proteica muscular na meia-idade, independente do tipo de miofibras, e que têm atrofia e disfunção mitocondrial precocemente nas miofibras oxidativas.

Palavras-chave: Parkin, Músculo esquelético, atrofia.

ABSTRACT

Parkinson's is a chronic disease that affects dopaminergic neurons, leading to their death and causing symptoms such as bradykinesia, postural rigidity and resting tremor. The disease usually occurs in the elderly, but when it affects younger people, it is called early onset, and is mostly caused by mutations in the PARK2 gene, which encodes the Parkin protein. It is known that, in addition to the aforementioned symptoms, sarcopenia can also appear during the course of the disease, and this disorder is related to dysregulations in protein turnover and mitochondrial dysfunctions, such as in the process of mitophagy. Mitophagy is the selective autophagy of dysfunctional mitochondria, which can occur via the PINK1 and Parkin pathway. Studies confirm that Parkin^{-/-} animals have impaired mitophagy, and in muscle tissue, regeneration and contraction may be affected. In view of this, the present work aimed to analyze the skeletal muscle tissue of Parkin^{-/-} mice at middle age (10 months), to investigate protein synthesis pathways and mitochondrial functioning in two different muscles: soleus and tibialis. We observed that middle-aged Parkin^{-/-} animals do not show loss of motor capacity or locomotion, but have a small deficit in balance. We saw that the soleus muscle of these animals is smaller in mass and also in the diameter of myofibers. Furthermore, the mitochondrial respiratory capacity of the soleus decreases in middle age in Parkin^{-/-} animals. We additionally observed that the protein synthesis pathway changes with age in both muscles, when we analyzed the AKT and 4E-BP1 proteins. In conclusion, we observed that Parkin^{-/-} mice show changes in the muscle protein synthesis pathway in middle age, regardless of the type of myofiber, and that they have mitochondrial atrophy and dysfunction early in oxidative myofibers.

Keywords: Parkin, Skeletal Muscle, Atrophy

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO 1: OBJETIVOS	16
CAPÍTULO 2: METODOLOGIA	18
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	22
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO.....	26
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

INTRODUÇÃO

Parkin e Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa crônica, que ocorre maioritariamente por razões idiopáticas em pessoas com idade superior a 65 anos, mas também pode acometer indivíduos com 45 anos ou menos, sendo então referida como de início precoce¹. Últimos dados da OMS em 2019 relataram que 8,5 milhões de pessoas no mundo são portadoras da doença, e que desde o ano de 2000, mais de 300 mil mortes acometidas por Parkinson foram registradas.

Já é bem evidenciado que a morte das células nervosas dopaminérgicas é a causa dos sintomas motores característicos da doença, como por exemplo a bradicinesia, rigidez muscular, tremor no repouso e instabilidade postural. Tais características começam e permanecem o decorrer da doença, atingindo primeiramente um único hemisfério, e com passar dos anos, torna-se bilateral^{2,3}. Ainda não se sabe a fundo sobre essa lateralidade, mas é bem evidenciado que o hemisfério contralateral ao do começo dos sintomas é mais afetado, com maior perda de dopamina ⁵³.

Fatores genéticos, tóxicos, reações neuro inflamatórias e disfunções do sistema ubiquitina-proteassoma são algumas das razões etiológicas da doença, e diversos modelos animais têm sido criados para estudar melhor o Parkinson⁴. Mutações genéticas correspondem até 10% dos casos da doença, e mais de 10 genes foram identificados. O gene PARK2 (Parkin) é alvo de muitos estudos, pois suas mutações correspondem até 50% dos casos da patologia de início precoce. Parkin codifica uma proteína de 465 aminoácidos, da classe E3 ubiquitina ligase, que tem importante papel na manutenção da integridade mitocondrial, através do processo de mitofagia. Animais Knockout PARK2 mostram acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, o que indica um importante papel da proteína na função celular⁴.

Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela responsável pela geração de energia (ATP),

produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e também de antioxidantes, e tem papel crucial no fornecimento de energia celular, além de intervir em funções apoptóticas. Um processo de extrema importância para controle de qualidade mitocondrial é denominado Mitofagia, uma autofagia seletiva que remove mitocôndrias disfuncionais¹¹. A mitofagia pode ocorrer por mecanismos dependentes de receptores e de ubiquitina. Na mitofagia dependente de receptores, proteínas como BNIP3, NIX/BNIP3L, FUNDC1, BCL2-L-13 e FKBP8 são relacionadas. O foco de nosso presente estudo é a Mitofagia dependente de Parkin, que como citado acima, age como uma E3 ubiquitina ligase. Parkin é ativada via PINK1 e então ubiquitina proteínas da membrana externa da mitocôndria, como VDAC e Tom20 para dar início ao processo de mitofagia. As cadeias de ubiquitinas deixadas por Parkin são reconhecidas por receptores autofágicos (p62/SQSTM1), que ao se ligarem à LC3 I e II formam a membrana do autofagossomo. Por fim, a mitocôndria é degradada com a fusão do autofagossomo ao lisossomo¹³⁻¹⁶.

A disfunção da mitofagia mediada por Parkin pode ser componente de diversos quadros patológicos: doenças neurodegenerativas, distúrbios em órgãos endócrinos, coração e doenças musculares, além de ser uma característica do envelhecimento normal. Fibras musculares de indivíduos acima dos 90 anos possuem deficiência na cadeia respiratória mitocondrial²⁶. As deficiências funcionais na mitocôndria relacionadas à idade levam a um aumento de estresse oxidativo, através de uma elevada produção de ROS. Há também um desequilíbrio em redutores, como o NADH, e consequentemente essas alterações levam à perda de função do músculo esquelético, e à perda de massa muscular²⁷.

Tecido Muscular Esquelético e síntese proteica

O tecido muscular esquelético é o mais abundante nos vertebrados, e além de ser um determinante de força, desempenho e resistência, está envolvido em outras funções importantes, como a captação de glicose. Também possui alta capacidade regenerativa, por ser altamente suscetível a lesões²⁸. O músculo esquelético possui diferentes tipos de miofibras, que são divididas em: contração lenta “vermelha” – I e IIa

e contração rápida “branca” – IIb e IIx. Não só a morfologia das miofibras é diferente, como o metabolismo também: as fibras vermelhas utilizam mais dos lipídios como obtenção de energia, e são mais ricas em mitocôndrias. Já as miofibras brancas, utilizam em sua maioria a glicose como substrato energético²².

A estruturação da massa muscular esquelética, bem como o tamanho da fibra é reflexo do equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas nesse tecido, o também chamado turnover proteico. Esse processo, no entanto, pode ser afetado diretamente pela fusão de células satélites, perda ou adição de mionúcleos, já que a fibra muscular é uma estrutura multinucleada. A redução do volume muscular, também chamada de atrofia, ocorre com a desregulação desse turnover, mas pode responder de maneiras diferentes, a depender do estímulo⁶. Como exemplo, a desnervação do músculo diafragma do rato leva à atrofia das miofibras tipo IIx e IIb, ao mesmo passo em que, as miofibras IIa não sofrem alterações e as miofibras do tipo I, sofrem uma leve hipertrofia⁷. Num outro caso, de privação de nutrientes, os músculos de contração lenta como o sóleo, tem menos sensibilidade em comparação aos músculos de contração rápida⁸. A diferença nessa resposta pode refletir ao fato de que a atividade contrátil, relativamente maior em fibras tipo I e IIa, opõem-se ao processo de atrofia, via coativador transcricional PPAR- γ coativador-1 α (PGC-1 α)⁹.

Uma via indispensável para crescimento e sobrevivência celular que se mostra alterada no processo de atrofia, é a IGF-1/PI3K/AKT/mTOR. Após a ativação através da fosforilação de PDK1 por PI3K, AKT ativa Ikka, que fosforila e ativa mTORC1. Nessa cascata, duas proteínas são bem estabelecidas como efetoras: eIF4E e 4E-BPs. A eIF4E é dependente da translocação de cap para iniciar a tradução. Para isso, a fosforilação de 4EBP é indispensável. No final da via, ocorre a inibição da fosforilação de 4ebp, inibindo eIF4E estimulando a síntese proteica¹⁰. Além disso, O IGF-1 aumenta os níveis de proteína de β -catenina (um fator de transcrição envolvido no crescimento do músculo esquelético) pela fosforilação da glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β), que previne a atrofia e pode até induzir hipertrofia em ratos tratados com dexametasona³⁶.

Mitocôndria, tecido muscular e Parkin

Sabe-se que na atrofia muscular, há aumento da produção de ROS, prejuízo na produção de ATP e disfunção do poro de transição da permeabilidade mitocondrial regulador da apoptose (mPTP)¹¹. Pesquisas apontam a importância da proteína Parkin na integridade das mitocôndrias, e na saúde do músculo esquelético. Animais Parkin^{-/-} mostram-se com função mitocondrial prejudicada, além de apresentarem comprometimento em contração muscular¹⁷⁻¹⁸. Um estudo mostrou que a falta de Parkin potencializa a perda de massa muscular induzida pelo jejum em camundongos, regulando positivamente genes catabólicos²⁹. Um outro estudo apontou que a superexpressão de Parkin no músculo tibial de camundongos envelhecidos atenua a perda de massa muscular decorrente da idade, e melhora atividades de enzimas mitocôndrias, além de aumentar a força³⁰. Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que camundongos Parkin^{-/-} apresentam prejuízo em regeneração após lesão do músculo tibial anterior¹⁹.

Parkin também está envolvido em outras patologias, como na Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Um estudo em células epiteliais pulmonares de camundongos modelos da doença, concluiu que a superexpressão da proteína recupera a mitofagia prejudicada e mitiga a progressão da DPOC⁴³. Além disso, outro estudo observou que pacientes com Sarcopenia relacionada à DPOC tinham menor expressão de parkin no músculo, e maior acúmulo de MURF-1, uma proteína relacionada à atrofia muscular. Adicionalmente, observaram em miotubos C2C12 que o Knockdown de Parkin levou a um aumento na produção de ROS no tratamento com extrato de cigarro⁴⁴. Parkin também está relacionado com as disfunções mitocondriais da Diabetes tipo 2. Uma revisão enfatizou o papel da mitofagia na doença, e revela que modelos animais e humanos da doença tem redução da expressão de PARK2 acompanhados de um aumento de ROS em células β pancreáticas⁴⁵. Em conjunto, esses dados nos revelam que a proteína está relacionada com a mitofagia em diversos tecidos, e que a diminuição de sua expressão aparece em diversos quadros patológicos, em conjunto a falhas na respiração mitocondrial.

Está claro que a proteína Parkin exerce importante papel na saúde muscular, e que a perda ou disfunção da mesma, leva à desordens no tecido. Porém há escassez de dados em modelos animais de meia-idade. Não está claro quando as disfunções advindas da falta de Parkin começam ou são acentuadas, e de qual maneira elas se iniciam e afetam o músculo esquelético e suas diferentes fibras. Diante disso, tivemos como foco principal analisar o músculo esquelético de camundongos Parkin-/- na idade de 10 meses, enfatizando funcionamento mitocondrial e síntese proteica em diferentes músculos. Nossa hipótese inicial, era de que os animais Parkin-/- na meia idade apresentassem precocemente alterações musculares relacionadas à perda de massa muscular natural da idade avançada, e que essas alterações seriam diferentes entre os tipos de fibras musculares.

CAPÍTULO 1: OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi apontar as características morfológicas e biomoleculares do músculo esquelético de animais Parkin-/- na meia-idade

Capítulo 1.1 Objetivos específicos

Avaliar capacidade de equilíbrio de animais na meia-idade. Aqui, realizamos o protocolo de Walking beam test, onde mensuramos pegadas, tempo de percurso, empurrões e escorregões dos animais WT e Parkin-/- na idade de 10 meses.

Analisar a locomoção motora dos animais nos diferentes genótipos e idades. A fim de observarmos se os animais Parkin-/- apresentam mudanças na locomoção motora, medimos a movimentação, em centímetros, no teste de Open Field

Avaliar capacidade motora e potência máxima. Aqui, realizamos o teste em esteira de potência máxima e o teste de spider mice, a fim de observarmos se a capacidade de realização de tais testes tem influência de genótipo e/ou idade.

Analisar massa corporal e muscular. Antes da coleta dos tecidos, os animais foram pesados em balança de precisão. Após eutanásia, os músculos: sóleo e tibial anterior foram coletados e pesados. A escolha de tais músculos se deu por apresentarem tipos de fibras distintas.

Examinar a morfologia das fibras musculares. A fim de observarmos a estrutura da fibra muscular, após coloração de hematoxilina e eosina (no músculo tibial) e atividade atpásica da miosina (ATPase - no músculo sóleo), utilizamos o software *ImageJ* para mensurar a área de secção transversal através da medida de mínimo diâmetro de Feret. No sóleo, o diâmetro foi mensurado por tipo de fibra.

Verificar capacidade de respiração mitocondrial dos músculos. Tibiais e sóleos de animais com 10 meses de idade tiveram a capacidade de respiração mitocondrial mensurada através do protocolo de Oroboros, a fim de verificar a função da organela.

Investigar proteínas relacionadas à síntese proteica. Para observarmos o Turnover proteico, através de Western Blot, analisamos a expressão de marcadores de síntese proteica.

CAPÍTULO 2: METODOLOGIA

Animais

Os animais utilizados para o desenvolvimento deste trabalho (CEUA nº 5628-1) foram camundongos machos C57BL/6J (WT) e animais nocaute para Parkin, da linhagem Parkintm1Shn (Parkin-/-), fornecidos pelo Centro multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais de laboratório, CEMIB. Foram mantidos em regime claro/escuro de 12 horas/ 12 horas, em gaiolas dispostas em gabinetes com exaustão de ar e temperatura variando de 20 a 26°C. A umidade foi monitorada entre 40 a 60% no Biotério Central da Faculdade de Ciências Aplicadas. A ração utilizada para alimentação foi do tipo padrão comercial (Nuvilab®) e a água potável e clorada, ambas ad libitum. Os animais foram acompanhados na pesquisa desde os 2 até os 10 meses de idade. Esse trabalho utilizou um total de 120 animais.

Os animais estavam sendo sempre observados quanto à sinais de dor e estresse, e, para evitar os desconfortos, o manipulador se apresentava livre de odores artificiais (perfumes e afins), utilizando corretamente os EPIs (máscara, touca, luvas, propés e jaleco).

Os animais agrupados desde a sua chegada ao biotério não foram reagrupados em outras caixas, e se mantinham em cinco animais por gaiola. A mesma foi frequentemente trocada, com maravalha limpa e livre de umidade. As garrafinhas de água foram higienizadas a cada troca. A eutanásia ocorreu por superdose de anestésico. Aplicamos por via intraperitoneal uma dosagem de 240 mg/kg de cetamina e 30mg/kg de xilazina.

Sobre o desenho experimental da pesquisa, utilizamos as duas linhagens descritas (WT e Parkin-/-) em duas idades diferentes:

Walking beam test

O teste foi realizado no período da tarde, às 14:00 horas. Nesse protocolo, os camundongos de meia-idade WT e Parkin-/- foram treinados para atravessar três vigas

de diâmetros diferentes e comprimento de 80 centímetros. No teste mensuramos número de pegadas, escorregões com as patas traseiras e tempo de percurso. As vigas ficaram a 50 centímetros do chão, na direção horizontal. Cada viga tinha 1 metro de comprimento e os diâmetros de: 6 milímetros, 12 milímetros e 18 milímetros. O percurso analisado foi de 80 centímetros, sendo que, nos 10 centímetros iniciais da viga, os camundongos foram colocados, e nos 10 centímetros finais foram retirados. Os camundongos foram primeiramente vivenciados em dois dias consecutivos, no mesmo horário. O teste foi filmado e a câmera foi posta de maneira que se possa enxergar o começo e o final de cada viga. Os camundongos foram submetidos a caminhar 1x em cada viga, começando do maior diâmetro para o menor.

Open-field

O teste foi realizado no período da manhã, às 10:00 horas. Com uma arena de formato circular de 60 centímetros de diâmetro e 48 centímetros de altura, o teste de campo aberto (open field) foi realizado nos camundongos machos WT e Parkin-/- nas idades de 3 e de 10 meses. O protocolo objetivou-se em analisar a atividade locomotora dos animais dentro da arena, que é dividida em 19 quadrantes, e tem sua parte superior aberta. Durante 10 minutos os camundongos permaneceram na arena, sendo os 5 minutos iniciais de reconhecimento e adaptação, e nos 5 minutos seguintes houve a gravação e a avaliação da ambulação total.

Teste de potência máxima

O teste foi realizado no período da tarde, às 14:00 horas. Os animais foram previamente adaptados numa esteira (AVS projetos) no dia anterior ao teste. O mesmo consistiu na verificação da potência máxima de corrida dos animais. Os camundongos foram colocados na esteira, que aumentava de velocidade a cada 3 minutos. A velocidade inicial é de 12 metros por minuto. O estímulo de choque fazia com que os camundongos continuassem a atividade e a fadiga era atingida quando os mesmos não respondiam mais ao choque. Então, eram retirados da esteira, e o tempo de percurso, velocidade e distância eram anotados.

Spider mice

O teste foi realizado no período da manhã, às 10:00 horas. Os camundongos foram previamente adaptados, numa grade de 45 centímetros x 45 centímetros, com quadrados de 1 centímetro x 1 centímetro, nos quais os animais se agarravam, de maneira a ficar suspensos acima de um tambor com água. A adaptação consiste em deixá-los pendurados e depois, direcioná-los à água, por três vezes. O teste se inicia após a adaptação, e, um por um, os animais são colocados na grade e é verificado o tempo em que permanece agarrado, de ponta cabeça, até que caia na água. Todos os animais passaram no teste por três vezes, e a média dos tempos foi utilizada.

Coloração Hematoxilina e Eosina

O músculo tibial anterior foi coletado, e preservado em Isopentano e OCT, e armazenado em Freezer. O corte dos tecidos ocorreu em criostato, tamanho de 9µm e cada lâmina apresentava um total de 4 cortes do mesmo tecido. 4 lâminas de cada animal foram direcionadas à coloração de hematoxilina e eosina, da seguinte maneira: álcool 95% para fixar o tecido, por 2 minutos. Retiramos o álcool e acrescentamos hematoxilina por 90 segundos, e na sequência, eosina por 1 minuto. Após isso, as lâminas passaram por banhos de álcool 70%, 80% e 95%, cada um com 3 minutos de duração. O álcool absoluto foi usado na sequência, por 3 minutos em 3 banhos, para então, ocorrer 3 lavagens com xilol. Após secas, as lâminas foram fechadas com lamínulas e entellan.

ATPase

Os tipos de fibras (I e II) do músculo sóleo foram mensurados a partir da técnica de ATPase descrita em “Bancroft’s Theory and Practice of histological techniques”. Após preservação, o tecido foi seccionado em cortes de 8µm. Para cada animal, utilizamos 2 lâminas: uma para coloração com tampão básico (pH 9,4) e uma para tampão ácido (pH 4,6). A mensuração dos resultados foi feita via Imagej, através da medida de Ferret’s, de maneira cega.

Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio mitocondrial (pmol s⁻¹ mL⁻¹) foi determinado utilizando o Oroboros O2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria), e analisado no DatLab 7 (Oroboros Instruments). Músculos sóleo e tibial dos animais foram coletados e levados

à câmara O2k, em meio Mir05 em um volume total de 2 mL por câmara. Foram adicionados os substratos para análise da atividade de oxidação de ácidos graxos (FAO), Complexo I (CI) e Complexo II (CII). O protocolo foi adaptado do descrito em <https://wiki.oroboros.at/index.php/SUIT-017>. A adição dos substratos foi feita na seguinte concentração: Malato (0,5mM), Octanoylcarnitina (0,2mM), ADP (2.5mM), Glutamato (10mM), Succinato (10mM) e ADP (5mM). A via de oxidação de ácidos graxos foi estimulada com Malato e Octanoylcarnitina, e ao adicionar ADP, a via de fosforilação oxidativa foi ativada, utilizando-se de ácidos graxos com o substrato. Em seguida, o complexo I foi estimulado ao adicionarmos Glutamato e a atividade do complexo II com adição de Succinato. Por fim, a segunda adição de ADP estimulou novamente a via de fosforilação oxidativa na presença de substratos do complexo I e II.

Western Blot

Os músculos foram macerados e diluídos em tampão de extração (0.625% Nonidet P-40, 0.625% [W/V] deoxicolato de sódio; 0.00625M Fosfato de sódio pH 10.7, 2, 1mM EDTA pH 8 e 1 % de inibidores de fosfatase e protease) e centrifugados a 15.000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi então retirado e em seguida encaminhado para a quantificação utilizando o método Bradford (Bio-Rad). O gel de eletroforese foi preparado com gradiente de 4-10% e o de stacking 5% e para eletroforese foram aplicados 40µg de proteínas diluídas em tampão de Laemmli. Antes da incubação com o anticorpo primário a membrana passou por 4 lavagens de 5 minutos com TBS-T (0,1 % tween 20) e pré-bloqueio com solução de 5% de BSA em TBS-T por 1 hora. Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução com 5% de BSA em TBS-T e incubados overnight a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana passou por mais 4 lavagens com TBS-T e foi incubada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, em uma proporção de 1:20.000 em uma solução de TBS-T. Para finalizar, a membrana foi lavada novamente, por 3 vezes, e então revelada utilizando o reagente Luminata Forte Western HRP (EMD Millipore) e fotodocumentador.

Análises estatísticas

Os dados foram comparados como média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas usando o teste ANOVA two Way e Teste T de Student, após a determinação da normalidade dos dados (GraphPad Prism 9), tendo como nível de significância estabelecido em menor de 5%. Análises de área de secção transversal foram realizadas com o software ImageJ. Toda a análise dos testes comportamentais e dos experimentos histológicos foram realizadas de maneira cega

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

Primeiramente, objetivamos analisar como os animais se encontravam com relação à funcionalidade motora. Ao utilizarmos o protocolo de *Walking beam test* pudemos observar se animais *Parkin^{-/-}* em meia idade possuem déficits no equilíbrio. Não encontramos diferenças significativas em números de escorregões, estímulos ou tempo de travessia de feixe entre os grupos (Figura 1 B). Porém, no diâmetro menor (6mm), os animais *Parkin^{-/-}* apresentam um número maior de passos, o que pode indicar adaptações locomotoras perante um desafio (viga estreita). Em seguida, realizamos o teste *Open field*, para avaliarmos a locomoção dos animais. Os animais *Parkin^{-/-}* na meia-idade tinham uma maior ambulação total em relação aos WT na mesma idade e aos dois genótipos mais jovens (Figura 1 C). Por último, para avaliarmos o desempenho motor, utilizamos dois testes: de Potência máxima em esteira e o *Spider mice*. No primeiro, não encontramos diferenças entre os grupos (Figura 1 D). Já no segundo teste, ambos os genótipos aos 10 meses permaneceram

menos tempo pendurados na grade, com relação aos mais jovens. (Figura 1 E)

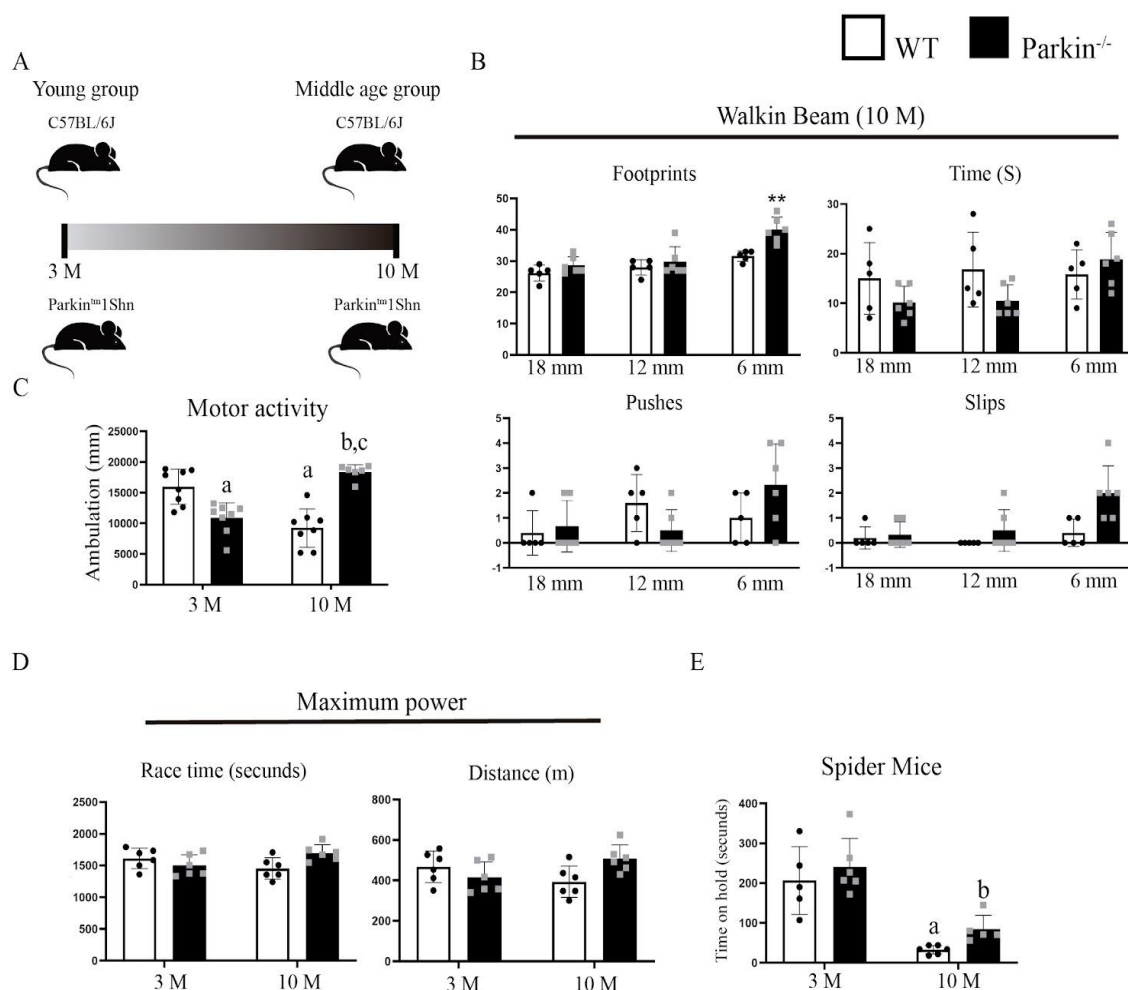


Figura 1- Avaliação de capacidade motora e equilíbrio. A- Desenho experimental. B- Caminhada de Feixe: Análise do tempo de percurso, pegadas, escorregões e empurrões, no teste *Walking beam*, de animais WT e Parkin^{-/-} na idade de 10 meses. (n=6). C- Atividade motora: Análise de ambulação total de animais WT e Parkin^{-/-} nas idades de 3 e 10 meses, através do teste de *Open field*. (n=6) D- Potência máxima: Análise de potência máxima, medindo tempo máximo de permanência em esteira e distância percorrida, progredindo velocidade (n=6). E- Spider mice: Análise do tempo total (em segundos) que os camundongos permaneceram pendurados. Estatísticas realizadas em GraphPad, Teste two-way ANOVA, e post-hoc de Bonferroni. Valor de p<0,05

Em seguida, analisamos a massa corporal total e os músculos dos animais nos diferentes grupos. Observamos que ambos os genótipos, WT e Parkin^{-/-} ganham peso corporal ao decorrer da idade (Figura 2 A). A massa muscular do músculo tibial não sofreu diferenças (Figura 2 B), porém, a massa do sóleo dos animais Parkin^{-/-} foi menor aos 10 meses. (Figura 2 C) Tal medida é complementada ao analisarmos o diâmetro de Feret's, cujo músculo sóleo se encontra menor no grupo Parkin^{-/-} aos 10

meses de idade, no geral e no tipo I de fibra. (Figura 2 E) Em contrapartida, no músculo Tibial, não foram observadas diferenças entre os grupos. (Figura 2 D)

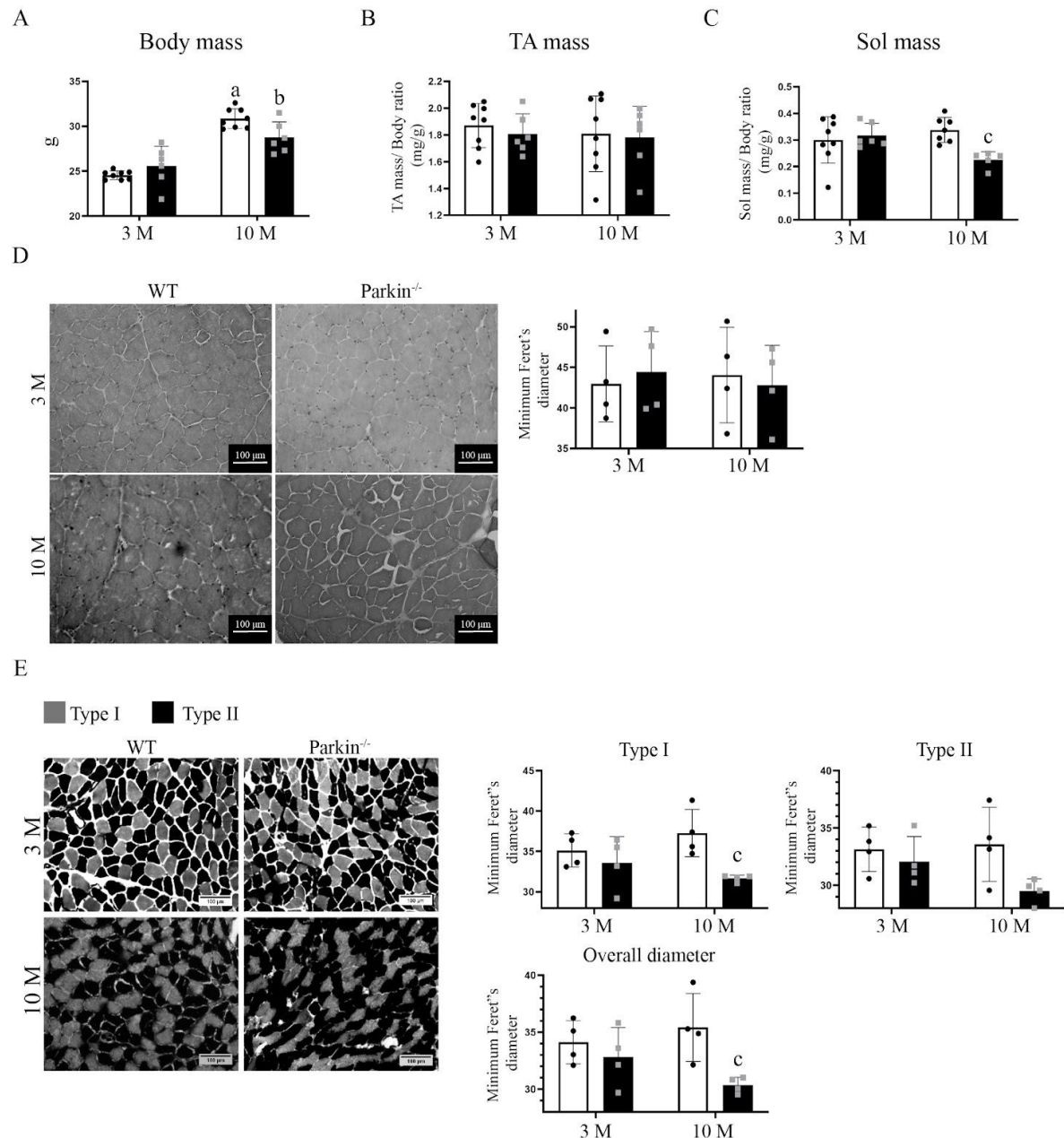


Figura 2- Massa corporal total e massa muscular. A- Massa corporal: Massa corporal total, em gramas, de animais Wt e Parkin^{-/-} aos 3 e 10 meses de idade. (n=6) **B- Massa do Tibial:** Massa do músculo Tibial Anterior, em razão à massa corporal de animais Wt e Parkin^{-/-} aos 3 e 10 meses de idade. (n= 6). **C- Massa do Sóleo:** Massa do músculo Sóleo, em razão da massa corporal de animais Wt e Parkin^{-/-} aos 3 e 10 meses de idade. (n= 6). **D- Diâmetro de Feret's:** Análise de área de secção transversal do músculo Tibial Anterior, medida de Feret, em coloração de Hematoxilina e Eosina, de animais Wt e Parkin^{-/-} aos 3 e 10 meses de idade. (n=4) **E- Diâmetro de Feret's, Tipo I,**

Tipo II e Diâmetro total: Área de secção transversal por tipo de fibra do músculo Sóleo, medida de Feret, em reação de ATPase, de animais Wt e *Parkin*^{-/-} aos 3 e 10 meses. (n=4) Valor de p<0,05

Dando sequência a nosso estudo, observamos o consumo de oxigênio dos músculos tibial e sóleo, nos animais WT e *Parkin*^{-/-} aos 10 meses de idade. Para isso, os músculos foram extraídos e levados ao equipamento *Oroboros O2k*. Nossos achados demonstram que o músculo tibial não sofreu alterações significativas (Figura 3 A), no entanto, o músculo sóleo de animais *Parkin*^{-/-} têm regulação negativa em dois complexos da cadeia respiratória: Complexo II (com a adição de Succinato) e Respiração máxima (com adição de ADP) (Figura 3 B)

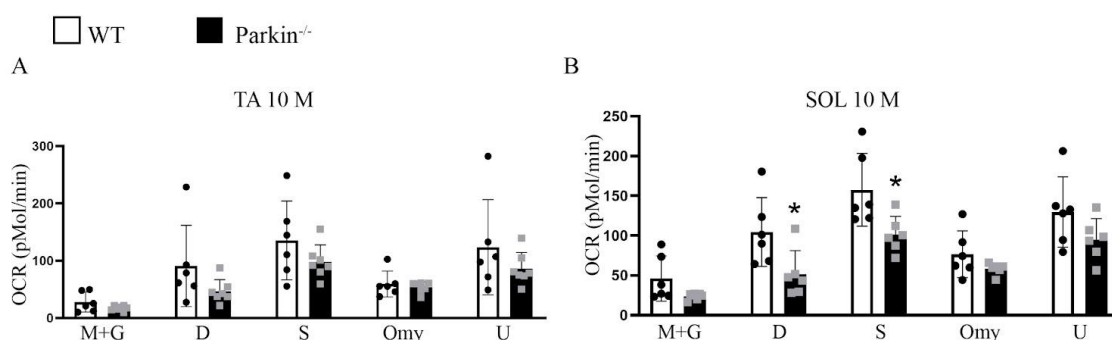


Figura 3- Respiração mitocondrial. A- Músculo tibial: Análise de respiração mitocondrial através da técnica de Oroboros, do músculo tibial anterior de camundongos WT e *Parkin*^{-/-} aos 10 meses de idade. (n=6) **B- Músculo sóleo:** Análise de respiração mitocondrial através da técnica de Oroboros, do músculo sóleo de camundongos Wt e *Parkin*^{-/-} aos 3 meses de idade. Valor de p<0,05

Tendo em vista os resultados anteriores, prosseguimos para a análise de vias síntese proteica dos músculos coletados. Para isso, averiguamos os níveis de AKT (ser473) e 4E-BP1 (TRH70). Curiosamente, no músculo tibial (Figura 4 A), os animais *Parkin*^{-/-} aos 3 meses têm maiores níveis de fosforilação de AKT comparado ao genótipo selvagem, e aos 10 meses, a fosforilação diminui na falta da proteína. Na análise de 4E-BP1 encontramos que os animais *Parkin*^{-/-} têm menores níveis de fosforilação na meia-idade quando comparados aos animais WT. Todavia, no músculo sóleo de

animais $\text{Parkin}^{-/-}$ observamos uma regulação positiva na fosforilação de AKT e 4E-BP1 aos 3 meses, mas não na meia-idade. (Figura 4 B)

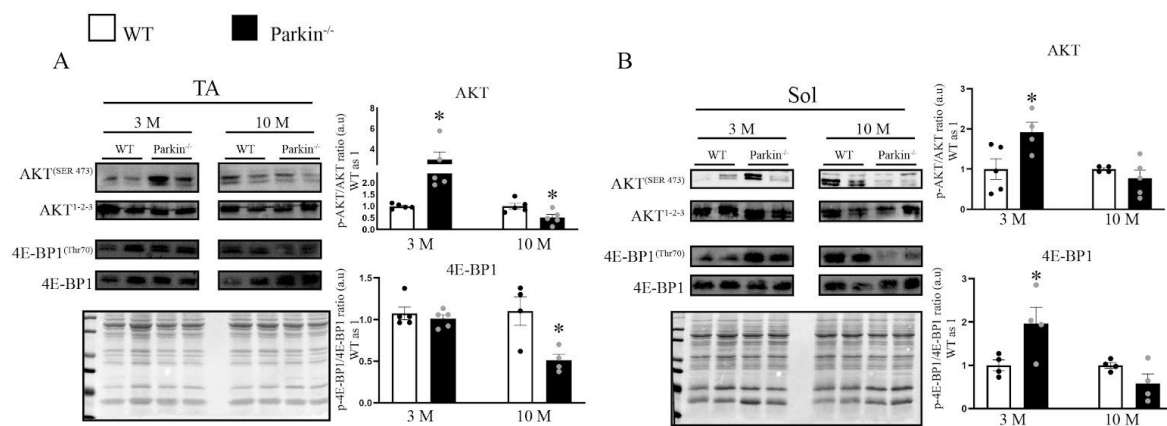


Figura 4- Western Blot. A: Análise de western blot da expressão de atividade de AKT e 4E-BP1, realizada com a razão da expressão total e fosforilada, do músculo tibial anterior de camundongos WT e $\text{Parkin}^{-/-}$ aos 3 e 10 meses de idade. (n=4) **B:** Análise de western blot da expressão de atividade de AKT e 4E-BP1, total e fosforilados, do músculo sóleo de camundongos Wt e $\text{Parkin}^{-/-}$ aos 3 e 10 meses de idade. (n=4) Valor de p<0,05

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO

Nosso estudo observou que a falta de Parkin leva à diminuição no tamanho das miofibras oxidativas e alterações moleculares em vias de síntese proteica em miofibras glicolíticas e oxidativas na meia-idade. Até o momento, não haviam evidências de como a falta da proteína afetava o tecido muscular em diferentes fibras. Também mostramos que a capacidade motora dos animais não é afetada, apesar das modificações histológicas e moleculares.

A medida de desempenho no *Walking beam test* é bastante utilizada para avaliar coordenação motora e equilíbrio em roedores. O teste é capaz de detectar déficits motores relacionados à idade, lesões cerebrais e farmacologia de algumas drogas²¹. Nosso propósito ao utilizarmos o protocolo era identificar déficits no equilíbrio. Observamos que os animais $\text{Parkin}^{-/-}$ possuem déficits no equilíbrio apenas

no diâmetro menor (6mm). Isso nos indica que perante a um desafio (viga estreita), o genótipo apresenta um pior desempenho. Em conjunto com esses dados, observamos no teste de *Open field*, uma maior ambulação total do mesmo grupo. Esse teste visa, além de avaliar a locomoção, analisar parâmetros relacionados à ansiedade, através da exploração de quadrantes do campo. Ao ser colocado no centro do equipamento, normalmente o animal corre para a borda e explora ao seu redor. Quando se habitua ao ambiente, a ansiedade diminui, e ele passa a frequentar mais as regiões centrais do campo³¹. Esse aumento de locomoção pode estar associado a níveis de estresse e ansiedade, porém, para confirmação, seria necessária análises mais sucintas como a permanência no centro e números de groomings. Contudo, o foco era apenas investigar se haviam déficits locomotores e esses pontos não foram observados. Para complementar os testes de equilíbrio e locomoção, realizamos protocolos para averiguar a potência aeróbica muscular e resistência física, através do Teste de potência máxima em esteira e *Spider mice*. A potência máxima nos revelou que idade e genótipo não influenciam no rendimento dos animais, porém no *Spider mice*, ambos genótipos passam menos tempo pendurados na grade. Uma possibilidade é que a massa corporal total influencie nesse teste, já que ambos possuem aumento dessa medida. Por fim, nossos dados, coletivamente, mostram que a falta de Parkin leva à alterações motoras pequenas nos animais na meia-idade, apenas relacionadas à equilíbrio quando postos a um maior desafio.

Concluindo que os animais estão funcionalmente estáveis, seguimos com o estudo e analisamos a massa corporal e muscular esquelética. Mostramos que os camundongos *knockout* para Parkin também aumentam a massa corporal ao decorrer do tempo, como ocorreu com o genótipo selvagem. Ao quantificarmos a massa do músculo sóleo, observamos uma queda nos camundongos Parkin^{-/-} na meia-idade, o que não acontece no tibial anterior. Já foi mostrado anteriormente que Parkin superexpresso em camundongos envelhecidos protege contra a atrofia e aumenta a

expectativa de vida de *Drosophila*⁴⁶. Sabe-se que a atrofia do músculo esquelético pode afetar de maneiras diferentes os tipos de fibra, a depender do processo fisiológico envolvido. O desuso muscular e lesões na medula espinhal levam a diminuição do diâmetro das miofibras do tipo oxidativas, enquanto a caquexia e envelhecimento, acabam atingindo maioritariamente as miofibras do tipo glicolíticas²³. Sugerimos então, que os nossos camundongos *Parkin*^{-/-} estejam sendo afetados maioritariamente nas miofibras do tipo I e IIa, predominantemente oxidativas, do músculo sóleo, e não no músculo tibial que possui uma maior proporção de tipo IIb e IIx sendo predominantemente glicolítico.

Para analisarmos sucintamente as alterações histológicas do tecido muscular, utilizamos o mínimo diâmetro de Feret e observamos que na meia-idade, a falta de *Parkin* leva o músculo sóleo a apresentar menor diâmetro de miofibras comparado ao genótipo WT, o que complementa o achado que descreve menor massa no mesmo músculo. A literatura nos mostra que as miofibras do tipo oxidativas podem ser afetadas em diversos quadros, sofrendo conversão para miofibras do tipo glicolíticas como na obesidade, na lesão da medula e no desuso muscular^{47,48}. Na apneia obstrutiva do sono, essa conversão também acontece, e é acompanhada da regulação negativa de PGC-1 α , um regulador chave da biogênese mitocondrial⁴⁹. Diante disso, a conclusão mais clara é que a falta de *Parkin* já trás disfuncionalidades no músculo esquelético na meia-idade sem intervenções drásticas ou desafios, e que isso prioritariamente, atinge as miofibras oxidativas. Além disso, pode existir uma relação da atrofia específica ao tipo de miofibra com funcionamento mitocondrial.

As mitocôndrias disfuncionais são relacionadas a processos de atrofia muscular. Durante o desuso muscular prolongado, há aumento na produção de ROS e diminuição da capacidade respiratória mitocondrial do músculo esquelético. Embora as espécies reativas de oxigênio sejam sinalizadoras na regulação da homeostasia das

miofibras musculares, os altos níveis de sua produção impactam negativamente na manutenção de massa muscular³⁷. Ao mesmo passo, a produção de ROS também se eleva no processo sarcopênico juntamente à diminuição na produção de ATP³⁸. Sabe-se que a perda de Parkin leva à disfunções mitocondriais no músculo e em neurônios dopaminérgicos, o que leva a atrofia muscular e a perda desses neurônios³⁹. Além disso, um estudo realizado em miotubos C2C12 que realizou um *knockdown* de Parkin mostrou prejuízos na renovação mitocondrial e atrofia desses miotubos *in vitro*⁴⁰. Diante disso, avaliamos a capacidade respiratória de nossos grupos de estudo e encontramos diferença no sóleo de animais Parkin^{-/-} na meia-idade que apresentaram menor respiração na adição de Succinato (Complexo II) e de ADP (capacidade OXPHOS).

Alterações na estrutura do músculo envelhecido atrófico estão relacionadas também à regulação negativa de PGC-1 α e à disfunção na cadeia respiratória, e isso ocorre de maneira diferente nos tipos de miofibras²⁴. Um estudo observou que camundongos envelhecidos possuem diferenças na respiração quanto ao tipo de miofibras, mas que isso não necessariamente reflete a gravidade da perda de massa. Os autores observaram que o músculo gastrocnêmio tem maior perda de massa muscular que sóleo e EDL, porém, na respiração, o sóleo apresentou maiores prejuízos²⁵. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a falta de Parkin leva à alterações no músculo esquelético na meia-idade, sugerindo que os camundongos *knockout* são prejudicados precocemente, e a depender do tipo de miofibras. O resultado da técnica de *Oroboros* em nosso estudo é complementar a atrofia encontrada no sóleo, e nos reforça a ideia de que a falta de Parkin influencia não somente na morfologia do tecido muscular de predominância oxidativa, mas também na capacidade mitocondrial dos mesmos, ainda que o modelo experimental não se encontre em idade avançada ou com lesões.

A síntese proteica muscular tem importante função no crescimento e manutenção da massa muscular, o que reflete na saúde e qualidade de vida do indivíduo³². Utilizamos a técnica de Western Blot para as proteínas AKT e 4E-BP1. A AKT é uma serina/treonina quinase mediadora do crescimento e sobrevivência de células em diferentes tecidos e promove a síntese proteica de várias maneiras como na ativação de p70 e S6K e diminuição da sinalização FOXO1/3a⁵⁰. Já a fosforilação da 4E-BP1 resulta na desassociação com eIF4E permitindo assim a ligação de eIF4E a eIF4G que promove o início da tradução³².

Observamos diferentes regulações das proteínas nos diferentes músculos. Apesar de notarmos uma diminuição da fosforilação de AKT e de 4E-BP1 no genótipo Parkin^{-/-} na meia-idade no músculo tibial anterior, indicando um menor estímulo de síntese proteica, o mesmo ainda não resulta em alterações morfológicas. Além disso, esse músculo apresenta maiores níveis de fosforilação de AKT aos 3 meses de idade, na ausência de Parkin. Já no sóleo, onde observamos diminuição de diâmetro de miofibras na ausência de Parkin na meia-idade, não observamos queda da síntese, mas constatamos que aos 3 meses, a via está mais ativa. Não está claro na literatura se existem diferenças na síntese proteica muscular com relação ao tipo de fibra. Um estudo mostrou no músculo de camundongos que a privação alimentar por 48 horas induziu menor síntese proteica nas miofibras do tipo IIx e IIb em comparação com as do tipo I e IIa³³. Um outro estudo realizou denervação em camundongos e observou que a mTOR é ativada e tem importante papel para mitigar a atrofia decorrente do procedimento, mas que isso não ocorria em miofibras do tipo IIb³⁴. O fato de observarmos que os animais Parkin^{-/-} jovens têm a fosforilação de AKT maior em ambos os músculos e de 4E-BP1 no sóleo, pode sinalizar uma supercompensação da via, onde a necessidade da fosforilação das proteínas é maior para manutenção da síntese proteica e da massa muscular, o que é complementar ao fato de que os animais knockout aos 3 meses não têm menor diâmetro de miofibras em ambos os músculos

coletados. Não é a primeira vez em que é demonstrada uma interação de Parkin na via de mTOR. Em situações de estresse mitocondrial, em células Hela, mTORC1 é ubiquitinada por Parkin através dos sítios de ubiquitinação K2066 e K2306, impedindo a diminuição dessa via e promovendo a sobrevivência celular⁴¹. Outro estudo demonstrou que a superexpressão de Parkin no músculo esquelético de camundongos jovens promoveu hipertrofia e maior atividade da via Akt/mTORC1. Além disso, em camundongos idosos, protegeu da perda de massa muscular decorrente da idade⁴². Perante a capacidade de Parkin de manter a ativação da via de mTOR, uma possível explicação para nossos resultados é que a falta da proteína está tornando a via menos ativa numa idade mais avançada, resultando em menor fosforilação de AKT e 4E-BP1.

A literatura não nos fornece indícios suficientes, mas nossa descoberta nos leva a crer que as miofibras do tipo I e IIa sofrem mais com a perda de Parkin em animais na meia-idade, e que isso pode estar associado a maior demanda mitocondrial, visto que a perda de Parkin acompanha menor atividade de Complexo II e de capacidade de OXPHOS no sóleo. O músculo tibial ainda não sofre alterações em seu diâmetro de miofibras, mas notamos a diminuição na via de síntese proteica com a falta de Parkin na meia-idade, o que nos reforça o citado acima sobre a interação da proteína com a via de mTOR. Isso nos leva a concluir que os camundongos Parkin^{-/-} não acompanham o quadro comum da sarcopenia no envelhecimento, a qual sofre com a perda de miofibras glicolíticas maioritariamente. Nossos achados também nos levam a crer, que a falta da proteína no músculo esquelético de animais jovens demanda uma maior ativação da via de mTOR, para manutenção da massa muscular, o que não se sustenta ao decorrer da idade, e acarreta em atrofia precoce das miofibras musculares de predominância oxidativa.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo nos levam a concluir que a falta de Parkin em camundongos na meia-idade leva à alterações na estrutura muscular esquelética, no tipo de fibra e na respiração mitocondrial, e que isso ocorre de maneira diferente a depender do tipo de miofibra do tecido. Apesar das alterações descritas, observamos que não há prejuízos na capacidade motora ou locomoção, o que fornece indícios de que o tecido muscular esquelético apresenta disfunções biomoleculares na falta de Parkin na meia-idade, e que isso precede alterações mecânicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Guerrero Camacho, J.L., Monroy Jaramillo, N., Yescas Gómez, P., Rodríguez Violante, M., Boll Woehrlen, C., Alonso Vilatela, M.E., & López López, M. (2012). Alta frequência de rearranjos de exon de Parkin em pacientes mestiços mexicanos com doença de Parkinson de início precoce. *Distúrbios do movimento: jornal oficial da Movement Disorder Society*, 27(8), 1047–1051. <https://doi.org/10.1002/mds.25030>
- 2- Lill, C.M., & Klein, C. (2017). Epidemiologie und Ursachen der Parkinson Erkrankung [Epidemiologia e causas da doença de Parkinson]. *Der Nervenarzt*, 88(4), 345–355. <https://doi.org/10.1007/s00115-017-0288-0>
- 3- Beitz J. M. (2014). Doença de Parkinson: uma revisão. *Frontiers in bioscience (edição acadêmica)*, 6, 65–74. <https://doi.org/10.2741/s415>
- 4- Sarah E.M. Stephenson, Juliet M. Taylor e Paul J. Lockhart (2012). Doença de Parkinson e Parkin: Insights de Park2 Knockout Mice, Mecanismos na Doença de Parkinson - Modelos e Tratamentos, Dra. Juliana Dushanova (Ed.), ISBN: 978-953-307-876-2, InTech.
- 5 - Rafael Reimann Baptista, Marco Aurélio Vaz. Arquitetura muscular e envelhecimento: adaptação funcional e aspectos clínicos; revisão de literatura. *Fisioterapia e Pesquisa*, São Paulo, v.16, n.4, p.368-73, out./dez. 2009
- 6- Masahiro Morita, Simon-Pierre Gravel, Laura Hulea, Ola Larsson, Michael Pollak, Julie St-Pierre e Ivan Topisirovic (2015) mTOR coordena a síntese de proteínas, atividade mitocondrial e proliferação, *Cell Cycle*, 14:4, 473-480, DOI: [10.4161/15384101.2014.991572](https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991572)

- 7- Aravamudan B , Mantilla CB , Zhan WZ & Sieck GC (2006) Efeitos da desnervação no tamanho do domínio mionuclear das fibras do diafragma de rato . *J Appl Physiol* 100 , 1617 – 1622
- 8- Li JB & Goldberg AL (1976) Efeitos da privação de alimentos na síntese e degradação de proteínas em músculos esqueléticos de ratos
- 9- Sandri M , Lin J , Handschin C , Yang W , Arany ZP , Lecker SH , Goldberg AL & Spiegelman BM (2006) PGC-1 α protege o músculo esquelético da atrofia suprimindo a ação do FoxO3 e a transcrição do gene específico da atrofia . *Proc Natl Acad Sci USA* 103 , 16260 – 16265
- 10- Timmer, LT, Hoogaars, WMH, Jaspers, RT (2018). O Papel da Sinalização do IGF-1 na Atrofia do Músculo Esquelético. In: Xiao, J. (eds) *Muscle Atrophy. Avanços em Medicina Experimental e Biologia*, vol 1088. Springer, Cingapura. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_6
- 11- Hepple RT (2011) Alterações nas mitocôndrias e seu impacto no envelhecimento do músculo esquelético . Em *Sarcopenia – Perda e Fraqueza Muscular Relacionadas à Idade: Mecanismos e Tratamentos* (G Lynch , ed.). Nova York: Springer, pp. 135 – 158 .
- 12- Chen G, Kroemer G, Kepp O. Mitofagia: um papel emergente no envelhecimento e nas doenças associadas à idade. *Front Cell Dev Biol.* 2020 26 de março;8:200. doi: 10.3389/fcell.2020.00200. PMID: 32274386; PMCID: PMC7113588
- 13- AGUIRRE, J. D. et al. Impacto da fosforilação alterada na perda de função de variantes genéticas associadas ao parkinsonismo juvenil da E3 ligase parkin. *Jornal de Química Biológica*, p. jbc. RA117. 000605, 2018. ISSN 0021-9258
- 14-. MIYAI, T. et al. A ativação da mitofagia mediada por PINK1-Parkin degrada as proteínas de controle de qualidade mitocondrial na distrofia endotelial da córnea de Fuchs. *Sou. J. Pathol.*, 2019. ISSN 0002-9440.

- 15- PANICKER, N.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T. M. Mecanismos de ativação da ubiquitina ligase parkin E3. *Biochemical Journal*, v. 474, n. 18, pág. 3075-3086, 2017. ISSN 0264-6021.
- 16- Sui SX, Williams LJ, Holloway-Kew KL, Hyde NK, Pasco JA. Saúde do músculo esquelético e função cognitiva: uma revisão narrativa. *Jornal Internacional de Ciências Moleculares*. 2021; 22(1):255. <https://doi.org/10.3390/ijms22010255>
- 17- Peker N, Donipadi V, Sharma M, McFarlane C, Kambadur R. A perda de Parkin prejudica a função mitocondrial e leva à atrofia muscular. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1º de agosto de 2018;315(2):C164-C185. doi: 10.1152/ajpcell.00064.2017. Epub 2018 21 de março. PMID: 29561660.
- 18- Gouspillou, G., Godin, R., Piquereau, J., Picard, M., Mofarrahi, M., Mathew, J., Purves-Smith, F.M., Sgarioto, N., Hepple, R.T., Burelle, Y., & Hussain, S. (2018). Papel protetor da Parkina na função contrátil e mitocondrial do músculo esquelético. *O Jornal de fisiologia*, 596 (13), 2565-2579. <https://doi.org/10.1113/JP2756043>
- 19- Esteca MV, Severino MB, Silvestre JG, Palmeira Dos Santos G, Tamborlin L, Luchessi AD, Moriscot AS, Gustafsson ÅB, Baptista IL. A perda de parkin resulta em diferenciação alterada de células-tronco musculares durante a regeneração. *Int J Mol Sci*. 28 de outubro de 2020;21(21):8007. doi: 10.3390/ijms21218007. PMID: 33126429; PMCID: PMC7662548.
- 20- Sarah E.M. Stephenson, Juliet M. Taylor e Paul J. Lockhart (2012). *Doença de Parkinson e Parkin: Insights de Park2 Knockout Camundongos, Mecanismos na Doença de Parkinson - Modelos e Tratamentos*, Dra. Juliana Dushanova (Ed., ISBN: 978-953-307-876-2, InTech

21- Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. Avaliação do equilíbrio e coordenação motora em camundongos utilizando a trave de equilíbrio. J Vis Exp. 10 de março de 2011;(49):2376. doi: 10.3791/2376. PMID: 21445033; PMCID: PMC3197288.

22 - Du, J., Shen, L., Zhang, P. et al. A regulação da composição do tipo de fibra muscular esquelética pela betaina está associada ao NFATc1/MyoD. J Mol Med 96, 685–700 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1657-2>

23- Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Tipo de músculo e especificidade do tipo de fibra na perda de massa muscular. Int J Biochem Cell Biol. 2013 out;45(10):2191-9. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.016. Epub 2013 21 de maio. PMID: 23702032.

24- Fukunaga T, Mori S, Omura T, Noda Y, Fujita Y, Ohsawa I, Shigemoto K. Alterações específicas do tipo de fibra muscular da função respiratória mitocondrial e morfologia em camundongos fêmeas envelhecidos. Biochem Biophys Res Commun. 12 de fevereiro de 2021;540:116-122. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.11.071. Epub 2021 17 de janeiro. PMID: 33472133. See More

25- M. Picard , D. Ritchie , MM Thomas , KJ Wright , RT Hepple alterações na função mitocondrial intrínseca com o envelhecimento são específicas do tipo de fibra e não explicam a atrofia diferencial entre os músculos S. Aging Cell, 10 (2011), pp. 1047 - 1055 , 10.1111/j.1474-9726.2011.00745.

26- Takayuki Mito, Amy E. Vincent, Julie Faitg, Robert W. Taylor, Nahid A. Khan, Thomas G. McWilliams, Anu Suomalainen, Disfunção do mosaico da mitofagia na doença muscular mitocondrial, Metabolismo celular, Volume 34, Edição 2,2022 ,Páginas 197-208.e5,ISSN 1550-4131, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.017>

- 27- Coen PM, Musci RV, Hinkley JM, Miller BF. Mitocôndrias como um alvo para mitigar a sarcopenia. *Front Physiol.* 10 de janeiro de 2019;9:1883. doi: 10.3389/fphys.2018.01883. PMID: 30687111; PMCID: PMC6335344.
- 28- Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Mecanismos moleculares e celulares da atrofia do músculo esquelético: uma atualização. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2012 Set;3(3):163-79. doi: 10.1007/s13539-012-0074-6. Epub 2012 7 de junho. PMID: 22673968;
- 29- Peker, N., Sharma, M. & Kambadur, R. A deficiência de *Parkin* exacerba a perda muscular esquelética induzida pelo jejum em camundongos. *npj Parkinson Dis.* 8 , 159 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00419-3>
- 30- Leduc-Gaudet JP, Reynaud O, Hussain SN, Gouspillou G. A superexpressão de *Parkin* protege contra a perda de massa e força muscular relacionada ao envelhecimento. *J Physiol.* 2019 abr;597(7):1975-1991. doi: 10.1113/JP277157. Epub 2019 Jan 30. Errata em: *J Physiol.* 2019 dez;597(24):5991. Resumo corrigido. Errata em: *J Physiol.* 2020 set;598(18):4133. PMID: 30614532; PMCID: PMC6441909
- 31- Brooks, S., Dunnett, S. Testes para avaliar o fenótipo motor em camundongos: um guia do usuário. *Nat Rev Neurosci* 10 , 519–529 (2009).
- 32- Bodine, S., Stitt, T., Gonzalez, M. et al. A via Akt/mTOR é um regulador crucial da hipertrofia do músculo esquelético e pode prevenir a atrofia muscular in vivo . *Nat Cell Biol* 3 , 1014–1019 (2001)
- 33- Goodman CA, Kotecki JA, Jacobs BL, Hornberger TA (2012) Diferenças dependentes do tipo de fibra muscular na regulação da síntese de proteínas. *PLoS ONE* 7(5): e37890.

- 34- You, JS., Kim, K., Steinert, ND *et al.* mTORC1 medeia a regulação específica do tipo de fibra da síntese de proteínas e tamanho do músculo durante a desnervação. *Descoberta da morte celular* 7 , 74 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00460-w>
- 35- Cronin-Golomb A. Parkinson's disease as a disconnection syndrome. *Neuropsychol Rev.* 2010 Jun;20(2):191-208. doi: 10.1007/s11065-010-9128-8. Epub 2010 Apr 10. PMID: 20383586; PMCID: PMC2882524.
- 36- Jason SL Yu, Wei Cui; Proliferação, sobrevivência e metabolismo: o papel da sinalização PI3K/AKT/mTOR na pluripotência e inteligência do destino celular. *Desenvolvimento* 1 de setembro de 2016; 143 (17): 3050–3060.doi: <https://doi.org/10.1242/dev.137075>
- 37- Hyatt H, Deminice R, Yoshihara T, Powers SK. A disfunção mitocondrial induz a atrofia muscular durante a inatividade prolongada: uma revisão das causas e efeitos. *Arch Biochem Biophys.* 15 de fevereiro de 2019;662:49-60. doi: 10.1016/j.abb.2018.11.005
- 38- Alterações na função mitocondrial, liberação de peróxido de hidrogênio e dano oxidativo no músculo esquelético dos membros posteriores de camundongos durante o envelhecimento, *Mecanismos de Envelhecimento e Desenvolvimento*, Volume 127, Edição 3, 2006, Páginas 298-306, ISSN 0047-6374, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.11.004>.
- 39- Parkin contribui para a renovação mitocondrial e perda neuronal dopaminérgica em camundongos idosos, *Neurobiologia da Doença*, Volume 136, 2020, 104717, ISSN 0969-9961, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104717>.
- 40- A perda de Parkin prejudica a função mitocondrial e leva à atrofia muscular. Nesibe Peker, Vinay Donipadi, Mridula Sharma, Craig McFarlane e Ravi Kambadur. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2018 315:2, C164-C185

- 41- Dohyun Park, Mi Nam Lee, Heeyoon Jeong, Ara Koh, Yong Ryoul Yang, Pann-Ghill Suh, Sung Ho Ryu, Parkin ubiquitinates mTOR to regulate mTORC1 activity under mitochondrial stress, *Cellular Signalling*, Volume 26, Issue 10, 2014, Pages 2122-2130, ISSN 0898-6568, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.06.010>.
- 42- Leduc-Gaudet JP, Reynaud O, Hussain SN, Gouspillou G. A superexpressão de Parkin protege contra a perda de massa e força muscular relacionada ao envelhecimento. *J Physiol*. 2019 abr;597(7):1975-1991. doi: 10.1113/JP277157.
- 43- Araya J, Tsubouchi K, Sato N, Ito S, Minagawa S, Hara H, Hosaka Y, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Yoshida M, Fujita Y, Utsumi H, Kobayashi K, Yanagisawa H, Hashimoto M, Wakui H, Ishikawa T, Numata T, Kaneko Y, Asano H, Yamashita M, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Mitofagia regulada por PRKN e senescência celular durante a patogênese da DPOC. *Autofagia*. 2019 mar;15(3):510-526. doi: 10.1080/15548627.2018.1532259. Epub 2018 13 de outubro. PMID: 30290714; PMCID: PMC6351145.
- 44- Ito A, Hashimoto M, Tanihata J, Matsubayashi S, Sasaki R, Fujimoto S, Kawamoto H, Hosaka Y, Ichikawa A, Kadota T, Fujita Y, Takekoshi D, Ito S, Minagawa S, Numata T, Hara H, Matsuoka T, Uda J, Araya J, Saito M, Kuwano K. Envolvimento da mitofagia mediada por Parkin na patogênese da sarcopenia relacionada à doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2022 junho;13(3):1864-1882. doi: 10.1002/jcsm.12988. Epub 2022, 3 de abril. PMID: 35373498; PMCID: PMC9178376.
- 45- Shan Z, Fa WH, Tian CR, Yuan CS, Jie N. Mitofagia e dinâmica mitocondrial no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. *Envelhecimento* (Albany NY). 2022 24 de março;14(6):2902-2919. doi: 10.18632/aging.203969. Epub 2022, 24 de março. PMID: 35332108; PMCID: PMC9004550.

46- Leduc-Gaudet, J.-P., Hussain, S.N. e Gouspillou, G. (2022), Parkin: um alvo potencial para promover o envelhecimento saudável. *J Physiol*, 600: 3405-3421. <https://doi.org/10.1113/JP282567>

47- Sesamol reverte a conversão do tipo miofibra em estados obesos por meio da ativação da via de sinal SIRT1/AMPK. Min-Min Hu, Wen-Ya Zheng, Ming-Hui Cheng, Zi-Yu Song, Horia Shaukat, Mahnoor Atta e Hong Qin. *Jornal de Química Agrícola e Alimentar* 2022 70 (7), 2253-2264. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c08036

48- Stefano Ciciliot, Alberto C. Rossi, Kenneth A. Dyar, Bert Blaauw, Stefano Schiaffino. Tipo de músculo e especificidade do tipo de fibra na perda de massa muscular. *O Jornal Internacional de Bioquímica e Biologia Celular*. Volume 45, Edição 10, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.016>.

49- Chen L, Shen Y, Xiong H, Guan Z, Si Y, Liang H, Zhu W, Cai Q. Papel do PGC-1 α na conversão do tipo de fibra no músculo palatofaríngeo de pacientes com AOS. *J Clin Lab Anal*. 2022 Jul;36(7):e24551. doi: 10.1002/jcla.24551. Epub 2022 12 de junho. PMID: 35692078; PMCID: PMC9279980.

50- Xinbo Zhang, Naimei Tang, Timothy J. Hadden, Arun K. Rishi, Akt, FoxO e regulação da apoptose, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Pesquisa de Células Moleculares*, Volume 1813, Edição 11, 2011. Páginas 1978-1986, ISSN 0167-4889, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>