UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Priscila de Oliveira Coelho

**Identificação de genes associados à atrofia muscular induzida pela
privação de andrógeno**

RIBEIRÃO PRETO/SP

2019

Priscila de Oliveira Coelho

**Identificação de genes associados à atrofia muscular induzida pela
privação de andrógeno**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

RIBEIRÃO PRETO/SP

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Coelho, Priscila de Oliveira.

Identificação de genes associados à atrofia muscular induzida pela privação de andrógeno / Priscila de Oliveira Coelho - Ribeirão Preto, 2019.

125f., 30cm.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes

1.FBXO32. 2.Atrofia muscular. 3.Atrogenes. 4.Anti-atrogenes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Coelho, Priscila de Oliveira

Título: Identificação de genes associados à atrofia muscular induzida pela
privação de andrógeno

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wilson e Rosalina, pelo total apoio durante essa longa jornada da pós-graduação. Pelo suporte emocional nas épocas mais difíceis, por não terem me deixado desistir e por sempre apoiarem todos os meus sonhos. E minhas viagens!

Ao professor Marcelo pela oportunidade e confiança em trabalhar em seu laboratório todos esses anos.

À professora Rosely Godinho e seus alunos, Leonardo e Enio, pela parceria e colaboração com os inúmeros experimentos com animais e pela troca de conhecimento.

À professora Flavia Guarnier pelo aprendizado, pela paciência e disponibilidade.

À Livia Zaramela pela paciência e tranquilidade em me explicar, de novo e de novo, os caminhos difíceis da bioinformática.

À professora Isis e seus alunos, Willian e Dawit, muito obrigada pela paciência e pelos ensinamentos toda vez que eu aparecia pedindo inúmeros auxílios, anticorpos e protocolos.

Ao professor Cláudio e seus alunos. Obrigada pelos auxílios e pela parceria na realização de experimentos.

À Ana Carla pela parceria e companhia nesses 6 anos! Pelos dias de alegrias, dias de experimentos de 15 horas, dias normais, alguns difíceis, às vezes sem muita paciência e outros com muitas risadas! Obrigada por dividir milimetricamente a bancada comigo durante todo esse tempo! rs... pelos cafés durante a tarde pra falar da vida... Obrigada pelo auxílio pessoal, experimental e emocional!

À Nichelle por todo o auxílio experimental com os camundongos e com as macerações emocionantes de músculos imersos em nitrogênio líquido. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos “estatísticos” e por não ter me deixado roubar o ratinho Pancetta, cujo apego emocional foi tanto que quase morri de tristeza quando você o destroncou.

Ao pessoal da secretaria: Maria Ivone, Rose e Ronaldo. Obrigada pelas risadas, pelos conselhos e as ajudas de última hora com as “papeladas” da pós.

À Maria Ivone pelo ouvido amigo, pelas conversas, as puxadas de orelha e seu carinhoso suporte emocional.

À Cacilda pela companhia, pelas inúmeras histórias e por dividir todo esse período de amadurecimento dentro do laboratório. E por não ter explodido o Prédio Central com as autoclaves esquecidas de desligar. Mas só às vezes rs...

Ao Rafael, por todos esses anos juntos. Por sempre me socorrer nos momentos mais difíceis, tanto no Doutorado com os experimentos complicados quanto com as dificuldades pessoais, quando as vezes tudo parecia se perder. Obrigada pelos dias bons e pelos dias incríveis compartilhados. Pelas nossas viagens e aventuras! Pelo nosso amor.

À turma da academia *Top Fusion*: Marcus, Flávia, Rafaela, Marinho e Bruninha. Pelos treinos mortais de *Wushu Sanda*, pelas conversas e cervejas divididas, as muitas risadas compartilhadas, as festas inesquecíveis e pela companhia.... Meu muito obrigado! Sem a amizade de vocês e esse esporte incrível, eu dificilmente teria sobrevivido aos vários períodos estressantes do Doutorado.

Ao meu vitiligo desenvolvido logo no início do Doutorado, por ter me mostrado que ansiedades precisam sim serem olhadas com carinho e entendidas. Obrigada por me ensinar que controlar o psicológico é essencial e também faz parte. E que as manchas não são marcas, são ensinamentos.

À Deus, pelo dom da vida, por me guiar no caminho correto e por decerto, ter colocado algumas pedras no meu caminho. Mas desta forma, por também me fazer entender que as dificuldades servem para serem superadas e que ainda há belas flores à minha espera.

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças.”

Stephen Hawking

RESUMO

Coelho, P.O. Identificação de genes associados à atrofia muscular induzida pela privação de andrógeno. 125 folhas. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A perda muscular ou atrofia é uma condição associada a importantes doenças sistêmicas humanas, incluindo diabetes, câncer e insuficiência renal. Há diversos estudos de perfis transcricionais mostrando que um conjunto comum de genes, denominados atrogenes, é modulado nos músculos atrofiados. No entanto, as alterações transcricionais que desencadeiam a reversão ou atenuação da atrofia muscular ainda não foram caracterizadas a nível molecular até o momento. Para identificar os principais genes envolvidos na recuperação da massa muscular esquelética, utilizamos a técnica de *microarray* e RT-PCR para investigar genes diferencialmente expressos durante a reversão da atrofia do músculo Elevador do ânus (EA) sensível a andrógeno, no modelo de castração e reposição de testosterona. Como esperado, a maioria dos genes expressos de maneira diferencial comportam-se como atrogenes e respondem à atrofia induzida pela castração. Porém, observou-se pela primeira vez um grupo de sete genes (APLN, DUSP5, IGF1, PIK3IP1, KLHL38, PI15 e MKL1) que não responderam à castração, mas exclusivamente à reposição de testosterona. Considerando que quase todas as proteínas codificadas por esses genes estão associadas à reversão da atrofia e podem funcionar como reguladores da proliferação/crescimento celular, nossos resultados abrem novas perspectivas sobre a existência de anti-atrogenes.

Palavras-chave: FBXO32, atrofia muscular, atrogenes e anti-atrogenes.

ABSTRACT

Coelho, P.O. Identification of genes associated in androgen deprivation-induced skeletal muscle atrophy. 125 pages. Thesis (Doctorate) Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Muscle wasting or atrophy is a condition associated with major human systemic diseases including diabetes, cancer, and kidney failure. There is accumulating evidence from transcriptional profiles showing that a common set of genes, termed atrogenes, is modulated in atrophying muscles. However, transcriptional changes that trigger reversion or attenuation of muscle atrophy have not been characterized at the molecular level until now. To identify key genes involved in the recovery of skeletal muscle mass, we have used cDNA microarrays and RT-PCR to investigate genes differentially expressed during the atrophy reversion of the androgen-sensitive *Levator ani* muscle (LA), in the well-established model of castration and testosterone replacement. As expected, most of the differential expressed genes behave as atrogenes and responded to castration-induced atrophy. Strikingly, seven genes (APLN, DUSP5, IGF1, PIK3IP1, KLHL38, PI15, and MKL1) did not respond to castration but exclusively to the testosterone replacement. Considering that almost all proteins encoded by these genes are associated to reversion of atrophy and may function as regulators of cell proliferation/growth, our results open new perspectives on the existence of a new group of genes, determined anti-atrogenes.

Keywords: FBXO32, muscle atrophy, atrogenes, and anti-atrogenes.

LISTA DE ABREVIATURAS

ActRIIA	Receptores de activina tipo II A
ActRII	Receptores de activina tipo II B
Akt/PKB	Proteína quinase B
AMD1	Adenosilmetionina descarboxilase 1
AMH	Hormônio Anti -Mülleriano
Atrogin-1/ MAFbx/ FBXO32	<i>Muscle atrophy F-box</i>
APLN	Apelina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CCK	Colecistoquinina
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjutivo
CXCL14	<i>Chemokine (C X C Motif) Ligand 14</i>
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DEPC	Água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% e autoclavada
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DPBS	Tampão salina fosfato Segundo Dulbecco
DUSP5	Fosfatase 5 de dupla especificidade
EAA	Esteróides androgênicos anabolizantes
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima carreadora de ubiquitina
E3	Enzima ligante de ubiquitina ou ubiquitina-ligase
EA	Músculo Elevador do ânus
Epc1	Potenciador do <i>Polycomb1</i>
FDR	Taxa de falsa descoberta
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
GO	Ontologia gênica
HEK293T	Cultura de células embrionárias renais humanas
HOPX	Proteína de único homeodomínio
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGFBP3	Proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina
KLF15	Fator 15 semelhante à Kruppel
KLHL38	38º Membro da família Kelch identificado
LOWESS	<i>LOcally WEighted Scatterplot Smoothing</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
METTL7A	Proteína do tipo metiltransferase (7A)
MKL1	Leucemia megacarioblastica 1
mTOR	Complexo do alvo da <i>rapamicina</i> em <i>mamíferos</i>
MuRF-1	<i>Muscle RING Finger-1</i>
NF-Kb	Fator nuclear Kappa B
ODC1	Ornitina descarboxilase 1
PGF	Fator de crescimento placentário
PI15	Inibidor de Peptidase 15
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIK3IP1	Proteína 1 de interação da Fosfatidilinositol 3 quinase
PT	Propionato de testosterona
RA	Receptor de andrógenos
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNs	Receptores nucleares
RPL32	Proteína ribossomal L32
RPL39	Proteína ribossomal L39
RPS6Ka5	Proteína quinase a5 ribossomal s6
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SUP	Sistema Ubiquitina-Proteassoma
TGF-α	Fator de crescimento transformador α
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
ΔCt	Ct do Gene alvo menos Ct do gene constitutivo (<i>housekeeping</i>)
ΔΔCt	ΔCt do grupo de amostras menos ΔCt do grupo controle

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Músculo esquelético.....	16
1.2 Reguladores da massa muscular esquelética.....	18
1.2.1 Via PI3K/Akt/mTOR.....	18
1.2.2 Via NF-κB.....	18
1.2.3 Via da Miostatina.....	19
1.2.4 Células satélites.....	20
1.2.5 Apoptose e via autofágica/lisossomal	21
1.2.6 Sistema Ubiquitina Proteassoma.....	23
1.3 Modelos experimentais de atrofia em roedores.....	25
1.3.1 Modelo de privação de andrógeno.....	26
1.3.2 Testosterona e o receptor de andrógeno.....	27
1.3.3 Modelo de privação alimentar.....	29
2. HIPÓTESE.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo geral.....	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
5.1 Animais de pesquisa.....	38
5.1.1 Modelo de privação de andrógeno.....	38
5.1.2 Castração cirúrgica.....	39

5.1.3 Modelo de privação alimentar.....	39
5.2 Experimentação animal.....	40
5.3 Extrações de RNA das amostras musculares.....	40
5.4 Síntese de cDNA.....	41
5.5 Metodologia do <i>microarray</i>	42
5.6 Reações de RT-PCR.....	46
5.7 SUnSET	49
5.8 Array de anticorpos anti-fosfoquinasas.....	51
5.9 <i>Imunoblotting</i>	53
5.9.1 Anticorpos.....	54
6. RESULTADOS.....	56
6.1 Modelo de privação de andrógeno.....	56
6.2 Controle da atrofia.....	59
6.3 Grupo dos novos atrogenes.....	60
6.4 Grupo dos genes associados à reversão da atrofia.....	65
6.5 Comportamentos dos genes-alvos.....	67
6.6 Modelo de privação alimentar.....	68
6.7 Ensaios SUnSET.....	73
6.8 Array de anticorpos anti-fosfoquinasas.....	77
7. DISCUSSÃO	84
8. CONCLUSÃO	103
9. REFERÊNCIAS.....	105
10. APÊNDICES.....	115
A. Genes diferencialmente expressos em 24 horas.....	115
B. Análise funcional DAVID.....	120

C. Membranas de nitrocelulose para Western <i>blotting</i>	121
11. ANEXOS.....	124
ANEXO 1. Documentação CEUA.....	124
ANEXO 2. Fosfoquinases e sítios de fosforilação.....	125

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O músculo esquelético

A musculatura esquelética constitui cerca de 40% a 50% da massa corporal humana, sendo o principal tecido e a principal fonte de proteínas dos mamíferos, durante períodos catabólicos em situações de estresse metabólico, bem como um dos principais órgãos envolvidos na disponibilidade e manutenção de energia. Os músculos executam as funções locomotoras e posturais/tônicas, bem como desempenham um importante papel metabólico (Lee, Wang et al. 2000, Izumiya, Hopkins et al. 2008). Portanto, a manutenção da massa muscular é essencial para prevenir doenças e melhorar a qualidade de vida de um indivíduo.

Durante processos catabólicos, como no jejum, desequilíbrio hormonal ou doenças sistêmicas, os aminoácidos disponibilizados pelo músculo servem como fonte de energia para vários órgãos. A massa muscular e o tamanho das fibras respondem muito rapidamente a diferentes desafios, sejam eles anabólicos ou catabólicos. Foi descrito anteriormente que 30% de perda de peso representa 75% de queda na massa protéica. (Tisdale 2010, Sandri 2013). É de amplo conhecimento que o músculo esquelético possui uma plasticidade pronunciada e que é capaz de modular o seu metabolismo dependendo da tensão mecânica e do caráter da atividade contrátil.

As fibras musculares podem sofrer um processo de reparo de células danificadas quando o estresse (por exemplo, exercício ou trauma) ativa células satélites quiescentes da vizinhança, levando-as a proliferar, migrar e substituir/reparar as miofibrilas que sofreram injúrias (Shortreed K. 2008).

Existem várias vias envolvidas no processo de perda muscular. O seu curso envolve um desequilíbrio no balanço entre a taxa de síntese e a degradação proteica, com a diminuição de massa em última instância (Hallows, Yu et al. 2011). Os fatores endócrinos e inflamatórios são os mediadores gerais desse equilíbrio (Lang, Streeper et al. 2010). O processo de atrofia envolve uma diminuição no tamanho/volume do tecido bem como a diminuição no volume celular, causada pela perda de proteínas, citoplasma e organelas, simultânea à diminuição de força e performance muscular. A atrofia muscular esquelética pode ocorrer em um indivíduo por vias naturais, no caso a senescência (sarcopenia) a partir da quinta década de vida; por períodos prolongados de jejum, doenças como câncer e diabetes, pacientes acamados, danos por queimaduras graves, doenças neurodegenerativas, AIDS ou estimulação hormonal catabólica com o uso de corticoesteroides (Thomas 2007, Cruz-Jentoft, Baeyens et al. 2010, Schiaffino, Dyar et al. 2013).

Já a síntese proteica no músculo esquelético é impulsionada pelo hormônio do crescimento IGF-1 (Glass 2005), a insulina e a testosterona (Fanzani, Conraads et al. 2012) sendo fortalecidos por nutrição e exercício adequados (Shavlakadze and Grounds 2006).

Assim, identificar os mecanismos moleculares que regulam a degradação e a síntese proteica é fundamental para o desenvolvimento de programas de exercícios eficazes e intervenções farmacológicas potenciais que possam inibir a atrofia muscular e/ou promoverem a hipertrofia.

1.2 Reguladores da massa muscular esquelética

1.2.1 Via PI3K/Akt/mTOR

Uma das vias centrais para o controle do tamanho das fibras musculares é a via PI3K/Akt/mTOR (fosfatidilinositol 3 quinase/ proteína quinase B/ alvo de rapamicina em mamíferos), uma via modulada por IGF-1 e a insulina (Rommel, Bodine et al. 2001). A estimulação da síntese de proteínas envolve esses hormônios interagindo com seus respectivos receptores de tirosina quinase para fosforilar o IRS-1 (substrato do receptor de insulina) e ativar a sinalização PI3K/Akt (Vivanco and Sawyers 2002), que ativa mTOR (Pallafacchina, Calabria et al. 2002) e por sua vez, fosforila *downstream* os alvos p70S6K e 4E-BP1 (Bodine, Stitt et al. 2001, Pallafacchina, Calabria et al. 2002) levando ao aumento da síntese proteica. A ativação de Akt possui duas funções simultâneas: resiste à atrofia fosforilando fatores de transcrição FOXO, impedindo assim sua translocação para o núcleo onde, de outra forma, promoveriam a transcrição dos atrogenes MuRF-1 e FBXO32 (ou MAFbx) associados à atrofia (Sandri, Sandri et al. 2004), ambas ubiquitinas ligases que catalisam a degradação de proteínas através do Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP). A inibição da fosforilação da Akt promove atrofia muscular, prevenindo a fosforilação dos fatores de transcrição da FoxO, impulsionando a transcrição dos atrogenes de atrofia MuRF-1 e FBXO32 (Sandri, Sandri et al. 2004, Skurk, Izumiya et al. 2005). Ambas E3 ligases também podem ser ativadas por uma via independente da sinalização de Akt, a via do NF- κ B.

1.2.2 Via NF- κ B

O NF- κ B é um fator de transcrição ativado em atrofia por desuso (Hunter, Stevenson et al. 2002) e condições caquéticas (Remels, Gosker et al. 2010, Wysong, Couch et

al. 2011). Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Quando estimulado, ocorre ativação de NF- κ B, levando à sua translocação para o núcleo, onde então ele pode se ligar ao promotor de MuRF-1 e iniciar a degradação muscular induzida pelo proteassoma (Cai, Frantz et al. 2004). Os promotores de MuRF-1 e FBXO32 têm sítios putativos de ligação para outros fatores de transcrição, como os fatores de transcrição NF- κ B, CCAAT/proteína potenciadora de ligação β (C/EBP β) e Smad3, que podem ativar MuRF-1 ou FBXO32 individualmente ou em combinação com outros fatores. Numerosos estudos demonstraram um papel para os fatores de transcrição NF- κ B (p65, c-Rel, RelB, p52, p50) na indução de atrofia muscular sob condições como desuso (Judge, Koncarevic et al. 2007, Van Gammeren, Damrauer et al. 2009), desnervação (Mourkioti, Kratsios et al. 2006), envelhecimento (Bar-Shai, Carmeli et al. 2008) e caquexia (Cai, Frantz et al. 2004, Rhoads, Kandarian et al. 2010). A atrofia muscular induzida por níveis elevados dos fatores de transcrição NF- κ B é frequentemente associada ao aumento da expressão das E3 ligases MuRF-1 e FBXO32. (Cai, Frantz et al. 2004, Wu, Kandarian et al. 2011).

1.2.3 Via da Miostatina

Nos últimos anos, a miostatina, membro da superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF- β), surgiu como um regulador chave da massa muscular esquelética. Sua deleção ou perda de função induz o crescimento excessivo do músculo, enquanto sua superexpressão ou administração sistêmica causa atrofia muscular. O dímero C-terminal maduro da miostatina liga-se a um dos dois receptores de activina tipo II (ActRIIB em maior grau que o ActRIIA), que recruta,

fosforila e ativa os receptores de activina tipo I (ALK4 e ALK5) que, por sua vez, leva à fosforilação e ativação de Smad2 e Smad3 (Lee and McPherron 2001, Rebbapragada, Benchabane et al. 2003). Smad2 e Smad3 fosforilados formam um complexo heterodimérico com o mediador comum Smad4. Estas proteínas Smads ativadas funcionam como os principais mediadores intracelulares da sinalização da miostatina à medida que se translocam para o núcleo e ativam a transcrição dos genes-alvo através da interação com o DNA e outros fatores nucleares (Derynck, Zhang et al. 1998). Diversos estudos demonstraram que a inibição de diferentes componentes da via miostatina - ActRIIB - ALK4/ALK5 - Smad2/3 promove a hipertrofia muscular na idade adulta. (Sartori, Milan et al. 2009, Trendelenburg, Meyer et al. 2009).

Outros estudos revelaram uma relação entre os efeitos anabólicos dos andrógenos e a miostatina. Andrógenos regulam negativamente a expressão da miostatina no músculo elevador do ânus em ratos, músculo dependente de andrógeno (Mendler, Baka et al. 2007). Além disso, os andrógenos podem regular a expressão da miostatina também de maneira indireta. Por exemplo, a folistatina (FS), um regulador negativo da miostatina, é regulada positivamente após o tratamento com testosterona em células satélites e no músculo, sugerindo que a inibição da miostatina pela FS pode contribuir para o efeito hipertrófico dos andrógenos (Braga, Bhasin et al. 2012).

1.2.4 Células satélites

O crescimento muscular em adultos é principalmente devido ao aumento do conteúdo de proteínas celulares através da ativação da via PI3K/Akt/mTOR que regula a síntese de proteínas. No entanto, a adição de novos núcleos fornecidos por células-tronco musculares, chamadas células satélites, também parece ser

necessária para o crescimento pós-mitótico das miofibrilas. As células satélites fornecem mioblastos para o crescimento pós-natal (Sloper and Partridge 1980, Allbrook 1981) e são fundamentais para a reparação do músculo esquelético (Sambasivan, Yao et al. 2011). Essas células são quiescentes até que um estresse (ex: trauma, exercício) seja imposto.

Após a lesão muscular, as células satélites são estimuladas pelos vários sinais que surgem do ambiente danificado. Elas então migram em direção ao local da lesão e entram novamente no ciclo celular para proliferar. Nesta fase, em resposta a estímulos como crescimento, remodelação ou trauma, as células-satélites são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores miogênicos Pax7 e/ou Myf5 e/ou MyoD (Olguin, Yang et al. 2007, Bentzinger, Wang et al. 2013). Neste estado, também são denominadas mioblastos. Essas células fundem-se a fibras musculares já existentes ou a células satélites vizinhas para gerar novas fibras musculares.

Alguns dados sugerem que as células satélites também podem contribuir para a hipertrofia muscular após a perda da miostatina. De fato, o número de células satélites em estado estacionário por unidade de fibra muscular e a proporção de células satélites ativadas são significativamente mais altas em camundongos nocautes para a miostatina (Mstn - /-) do que em animais selvagens (McCroskery, Thomas et al. 2003).

Durante o envelhecimento a resposta proliferativa e capacidade regenerativa para perturbação são reduzidas nas células satélites (Collins, Zammit et al. 2007, van der Meer, Jaspers et al. 2011).

1.2.5 Apoptose e via autofágica/lisossomal

A via da apoptose, ou morte celular programada, é um processo importante em organismos multicelulares, mesmo durante o desenvolvimento, onde assegura a

eliminação de tecidos supérfluos, sendo crítico para a manutenção da homeostase tecidual. Durante a apoptose, as enzimas que clivam as proteínas, as caspases, são ativadas no citosol e são responsáveis pela clivagem proteolítica de um amplo espectro de alvos celulares (Earnshaw, Martins et al. 1999). O músculo esquelético é um tecido único, pois suas células musculares, as miofibrilas, são multinucleadas. Este aspecto do músculo esquelético levou ao conceito do domínio mio-nuclear, que é definido como a quantidade teórica de citoplasma suportada por um único núcleo de fibra muscular, que é chamado de um mionúcleo (proteína/DNA) (Cheek 1985). Portanto, a perda de alguns núcleos não resulta necessariamente na destruição da fibra muscular (Dirks-Naylor and Lennon-Edwards 2011).

Mesmo assim, a apoptose desempenha um papel importante na atrofia do músculo esquelético. Fato este deduzido a partir da observação do seu aumento no músculo esquelético em vários aspectos patológicos e sob algumas circunstâncias fisiológicas. Exemplos: na insuficiência cardíaca crônica, distúrbios do neurônio motor, desnervação do músculo esquelético, lesão da medula espinhal, distrofia muscular e atrofia do músculo esquelético devido à suspensão ou imobilização do membro posterior estão associados a um aumento na taxa de apoptose dos músculos esqueléticos afetados (Allen, Linderman et al. 1997, Tews, Goebel et al. 1997, Podhorska-Okolow, Sandri et al. 1998, Adams, Jiang et al. 1999, Dupont-Versteegden, Murphy et al. 1999, Borisov and Carlson 2000, Smith, Maxwell et al. 2000).

Já o sistema proteolítico lisossomal, a primeira via proteolítica intracelular descrita, é caracterizado pela degradação de macromoléculas no interior do lisossomo (Blommaert et al. 1997). Esse processo ocorre constitutivamente para manter um equilíbrio anabólico/catabólico dinâmico dentro da célula. Mesmo assim, durante

estresse oxidativo (Dobrowolny, Aucello et al. 2008, Aucello, Dobrowolny et al. 2009) ou condições catabólicas extremas (Schiaffino and Hanzlikova 1972, Mizushima, Yamamoto et al. 2004) podem regular a autofagia. mTOR está integralmente envolvido em vias de autofagia (Yang and Klionsky 2010), no entanto, nos músculos esqueléticos, o fator de transcrição FOXO3 é o principal indutor de genes da autofagia, como o LC3 e o Bnip3 (Mammucari, Milan et al. 2007). A expressão gênica induzida por FOXO3 bem controlada é a chave para a autofagia balanceada.

1.2.6 Sistema Ubiquitina Proteassoma

O Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP) é responsável por até 80-90% da degradação protéica celular (Lecker, Goldberg et al. 2006) sendo o principal mecanismo de proteólise intracelular. E a atividade proteolítica aumentada é uma marca registrada em vários modelos de atrofia. No caso do músculo esquelético, os aumentos no SUP estão associados à perda de massa muscular. No músculo, ele é necessário para remover proteínas sarcoméricas após alterações na atividade muscular. Uma diminuição na massa muscular está associada a: (1) aumento da conjugação de ubiquitina para proteínas musculares; (2) atividade proteassomal ATP-dependente aumentada; (3) aumento da degradação de proteínas que pode ser eficientemente bloqueada por inibidores do proteassoma; e (4) regulação positiva de transcritos que codificam a ubiquitina, algumas enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2), algumas proteínas ubiquitina-ligases (E3) e várias subunidades do proteassoma (Lecker, Goldberg et al. 2006).

Figura 1. SUP na homeostase muscular. A enzima E1 ativa a ubiquitina numa reação dependente de ATP. A ubiquitina ativada é então encaminhada para enzimas E2 via E1. A reação final de ubiquitinação é catalisada por membros da classe de enzimas E3, induzindo a transferência de ubiquitina de E2 para o substrato. O substrato poliubiquitinado é reconhecido pelo proteassoma. As cadeias de poliubiquitina são removidas por enzimas de deubiquitinases (USPs). Os componentes deste sistema que contribuem para a perda de massa muscular são descritos: (1) O ZNF216 está envolvido no reconhecimento pelo proteassoma de proteínas ubiquitinadas durante a atrofia muscular; (2) Atrogin-1 regula a meia-vida do fator de transcrição MyoD e do eIF3f, cruciais para a síntese proteica; (3) Fbxo40 regula a meia-vida do IRS1, um fator essencial para a sinalização de IGF-1/ insulina e (4) MuRF-1 regula a meia-vida de várias proteínas sarcoméricas. (*Adaptado de "Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy"*) (Bonaldi and Sandri 2013).

O genoma humano codifica mais de 600 ubiquitina-ligases (Lee and Goldberg 2011). Elas estão envolvidas na regulação precisa de diferentes processos celulares e vem sendo feito um grande progresso recente na elucidação dos papéis das diferentes E3s na regulação do metabolismo, transcrição, ciclo celular, oncogênese e tamanho das fibras musculares. Uma contribuição importante para a identificação de ubiquitina ligases envolvidas na atrofia foram fornecidas pelo pioneirismo em estudos de perfil de expressão gênica realizada pelos grupos do Dr. Alfred L.

Goldberg e Dr. David J. Glass. Estudos esses que culminaram na descoberta das ubiquitina-ligases (E3) Atrogin-1 e MuRF-1, amplamente utilizadas como marcadores da atrofia (Bodine, Latres et al. 2001, Gomes, Lecker et al. 2001).

A análise comparativa de expressão gênica em diferentes modelos de atrofia muscular (incluindo diabetes, câncer-caquexia, insuficiência renal crônica, jejum e desnervação), estabeleceu a existência de um subconjunto de genes relacionados com atrofia ou Atrogenes (Sacheck, Hyatt et al. 2007).

1.3 Modelos experimentais de atrofia em roedores

As vantagens claras e bem conhecidas dos modelos animais são sua homogeneidade, geralmente de boa reprodutibilidade, nenhuma interferência com diferentes terapias e uma ampla gama de outros fatores imprevisíveis que afetam o desenvolvimento da doença em condições clínicas.

A maioria dos modelos de perda de massa muscular esquelética citados nos diversos estudos publicados em que se baseiam este trabalho, foram desenvolvidos em roedores, particularmente em ratos e camundongos. A vantagem óbvia dos camundongos é seu pequeno porte, fácil locação e rápida resposta em perda de peso/atrofia. Já os ratos são melhores para modelos cirúrgicos e permitem amostragem seriada de tecido.

Até agora pouco sabemos sobre o conjunto de genes que estão envolvidos na reversão da atrofia. Isso pode ser devido, em parte, aos desafios em intervir para reverter o processo de atrofia nesses modelos experimentais. Um modelo pouco estudado que permite tal estratégia de reversão é o modelo de atrofia por privação de andrógeno, no qual a reposição dos níveis de testosterona pode ser facilmente alcançada com a administração de sintéticos de testosterona.

1.3.1 Modelo de privação de andrógeno

O músculo Elevador do ânus (EA) do rato macho adulto é um modelo particularmente sensível para estudar os efeitos do andrógeno na massa muscular esquelética e na expressão de ubiquitina ligases como Atrogin-1 e MuRF-1 (Pires-Oliveira, Maragno et al. 2010). Nesse modelo, a atrofia muscular é induzida especificamente pela remoção do androgênio, sem lesão neuromuscular invasiva, como na desnervação, ou distúrbio metabólico sistêmico causado por caquexia ou jejum. Pires-Oliveira e colaboradores (Pires-Oliveira, Maragno et al. 2010), mostraram que a testosterona rapidamente e amplamente inibe a expressão das ubiquitina-ligases Atrogin-1 e Murf-1 *in vivo*, o que pode ser crítico para a ação anabólica dos hormônios sexuais masculinos (Pires-Oliveira, Maragno et al. 2010).

O músculo EA é considerado altamente responsivo à andrógeno mesmo durante pouco tempo de tratamento (Ferrando, Sheffield-Moore et al. 2002, Giannoulis, Jackson et al. 2008). Em um período curto de 7 dias de castração, o EA apresenta a ativação clássica dos atrogenes e o tratamento desses animais com o sintético propionato de testosterona leva a atenuação do quadro, otimizando o equilíbrio proteico muscular (Pires-Oliveira, Maragno et al. 2010). A sensibilidade acentuada desse músculo às alterações aos níveis androgênicos, podem ser facilmente observados por RNAm de atrogenes clássicos antes e após a reposição de PT (ao invés de ser necessário dosar os níveis de testosterona nesses animais), confirmando a efetiva depleção da testosterona pela orquidectomia bem como a sua reposição após a castração. No entanto, nenhuma investigação adicional do perfil transcricional no músculo EA após o tratamento foi descrita até agora.

1.3.2 Testosterona e o receptor de andrógeno

Andrógenos pertencem a uma classe de hormônios esteróides que servem como ligantes para o receptor de andrógeno (RA). Quando este receptor interage com seus ligantes, ele modula a regulação de genes-alvo através do reconhecimento e ligação aos elementos de resposta ao andrógeno (AREs). Os andrógenos e o RA desempenham um papel essencial no desenvolvimento sexual (Hughes, Lim et al. 2001) e podem influenciar a regulação da composição corporal geral (Mooradian, Morley et al. 1987).

O receptor de andrógeno (RA) pertence à subfamília dos receptores nucleares (RNs) e possui papel significativo no desenvolvimento e manutenção do sistema reprodutivo, muscular esquelético, cardiovascular, imunológico, dos sistemas neurais e hematopoiéticos (Lu, Wardell et al. 2006). O RA no seu estado inativo é normalmente ligado à proteínas de choque térmico (como HSP90 e HSP70) e à proteínas chaperonas no citosol. A ligação do andrógeno ao receptor desencadeia a liberação das HSPs e as consequentes mudanças conformacionais do RA necessárias para dimerização que assim iniciam um complexo programa de transcrição nas células alvo (Koryakina, Ta et al. 2014). Centenas de genes, como KLK3 (codifica o antígeno prostático específico/PSA), KLK2, FKBP5, entre outros, podem ser regulados pelo RA (Chen, Welsbie et al. 2004). A manutenção de todo o processo de regulação para manter uma homeostase adequada da expressão dos genes é crucial para o crescimento, desenvolvimento e saúde do estado do corpo humano.

Na via canônica, o esteróide anabolizante se liga ao RA para iniciar uma mudança conformacional e subsequente associação com o co-ativador da transcrição RA- β -

catenina. O complexo de agonista/RA/ β -catenina transloca-se para o núcleo e se liga a elementos responsivos ao RA localizados no promotor de genes específicos, incluindo genes nas vias IGF-1 (Ferrando, Sheffield-Moore et al. 2002), Wnt (Singh, Bhasin et al. 2009) e miostatina (Mendler, Baka et al. 2007), para aumentar a transcrição (Singh, Artaza et al. 2006). Não canonicamente, os agonistas androgênicos foram demonstrados ativar diretamente Akt (Kang, Janne et al. 2004), levando a múltiplos efeitos *downstream*.

Os derivados sintéticos da testosterona são conhecidos como esteróides anabólicos androgênicos (EAA). Existem aproximadamente 60 diferentes compostos EAA que podem ser classificados em três classes (Clark & Henderson, 2003) (Clark and Henderson 2003) com base em sua estrutura química e metabolismo. A classe I pertence aos compostos injetáveis derivados da esterificação do grupo 17 β -hidroxila de testosterona, que pode ser aromatizado para estrogênios, reduzido a diidrotestosterona (DHT), ou hidrolisado em testosterona. A classe II de EAA são compostos derivados de 19-nortestosterona injetáveis, que têm uma meia-vida mais longa e menos atividade androgênica do que os de Classe I. Semelhante à Classe I, a Classe II pode ser aromatizado para estrogênios ou reduzido a DHT. A alquilação no carbono 17 distingue classe III dos EAA (Clark and Henderson 2003) 4. O Propionato de testosterona (PT) pertence a Classe I dos AAS.

Hormônios sexuais masculinos regulam positivamente a massa muscular (Bhasin, Storer et al. 1996). A ativação dos receptores androgênicos nos tecidos-alvo pela testosterona leva ao aumento dos níveis de vários fatores de transcrição que modulam a expressão dos genes-alvo dos andrógenos (Gobinet, Poujol et al. 2002). De fato, é amplamente sabido que os andrógenos são capazes de aumentar a síntese de proteína muscular, enquanto a deficiência androgênica em homens está

associada à perda de massa muscular esquelética (Mayer and Rosen 1977). Estes fenômenos têm sido extensivamente estudados no músculo EA de roedores machos.

1.3.3 Modelo de privação alimentar

Os modelos de atrofia por privação alimentar, que variam de seis horas até 72 horas de jejum, são amplamente utilizados e estão presentes em diversos e importantes estudos de atrofia muscular (Gomes, Lecker et al. 2001, Jagoe, Lecker et al. 2002, Allen, Cleary et al. 2010).

Durante períodos de privação alimentar, a manutenção dos níveis de glicose no sangue é de suma importância para a função cerebral normal. Portanto, os organismos privados de alimentos iniciam uma série de mecanismos fisiológicos designados para permitir que eles mantenham os níveis de glicose no sangue em uma situação de zero ingestão de nutrientes. Além disso, os estoques de energia são mobilizados a partir de vários tecidos para fornecer uma fonte contínua de nutrientes para a produção de energia. Nesse caso, o músculo esquelético exerce papel crítico no metabolismo, armazenando glicogênio e desempenhando função de fonte de aminoácidos que podem ser solicitados em condições de extrema demanda metabólica como durante a privação alimentar (Richard 2002). As proteínas do músculo esquelético são decompostas em aminoácidos livres (Daniel 1977), que podem então ser convertidos em glicose no fígado pela gliconeogênese (Mlekusch, Paletta et al. 1981). Esse processo resulta em uma rápida e dramática atrofia do músculo esquelético durante o estado de privação alimentar e essa atrofia é fundamental para a manutenção da homeostase da glicose durante o jejum (Orngreen, Zacho et al. 2003).

Em roedores, durante o jejum, a testosterona diminui significativamente após 24 horas e 48 horas. Os níveis também caem após 16 horas de jejum, quando comparado com apenas 4 horas (Ahima, Prabakaran et al. 1996, Gavrilova, Leon et al. 1999, Champy, Selloum et al. 2004). Porém, o peso dos testículos não é afetado nos animais durante esse período (Gavrilova, Leon et al. 1999).

HIPOTESE

2. HIPÓTESE

Vários estudos na literatura utilizam modelos experimentais em roedores para estudar as vias de sinalização reguladas no músculo atrofiado. No entanto, nenhum estudo similar foi realizado no processo de reversão, principalmente, pelo fato da maioria dos modelos experimentais não permitirem tal reversão. Para abordar essa problemática, foi empregado um modelo bem estabelecido de privação/reposição de andrógeno no músculo Elevador do ânus de ratos machos adultos. A hipótese deste estudo é que existe uma resposta anti-atrófica no músculo EA que pode ser aplicada aos demais músculos esqueléticos.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

O estudo de Pires-Oliveira em 2010, mostrou que a castração dos animais por três dias, insuficiente para o estabelecimento de um quadro de atrofia, induz a expressão de marcadores clássicos de atrofia no músculo EA de ratos machos adultos. Este modelo, com ativação aguda de atrofia/reversão, pode ser empregado para estudar a resposta transcricional ainda não caracterizada nos modelos de atrofia. A caracterização molecular do processo de reversão pode oferecer novas estratégias para intervenções farmacológicas/nutrição e protocolos de exercícios físicos objetivando a melhora/atenuação de casos clínicos de atrofia imposta por doenças ou injúrias graves.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

O principal objetivo deste trabalho foi investigar genes responsivos à reversão da atrofia no músculo Elevador do ânus de camundongos machos adultos, no modelo bem estabelecido de privação androgênica.

4.2 Objetivos específicos:

- Empregar a análise por *microarray* de cDNA para identificar genes responsivos na reversão de atrofia do EA em um modelo de privação androgênica. Para isto, foi comparado os perfis de expressão gênica de músculos de ratos castrados pelo período de 3 dias *versus* os animais que ficaram o mesmo tempo castrados e tiveram reposição de testosterona por períodos de 8 horas e 24 horas.
- Validar os genes-alvos identificados através da técnica de RT-PCR.
- Analisar os genes-alvos em músculo esquelético de menor responsividade aos andrógenos.
- Investigar a síntese proteica, com experimentos de marcação com Puromicina (SUnSET) em células HEK293T hiperexpressando genes-alvos.
- Investigar o perfil de fosforilação de fosfoquinases, com *array* de anticorpos anti-fosfoquinases, em músculo EA castrados por 3 dias e castrados por 3 dias e tratados com PT por 8 horas.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais de pesquisa

5.1.1 Modelo de privação de andrógeno

O modelo em rato dos procedimentos de privação/reposição de testosterona foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (1604/2007 e 0034/2012). Trinta e dois ratos Wistar machos adultos pesando entre 363 e 390 g do Laboratório de Experimentação Animal do Instituto Nacional de Farmacologia e Biologia Molecular (LEA-INFAR, UNIFESP) foram utilizados no estudo. Os animais foram divididos igualmente em três grupos:

- Grupo Sham (grupo S)
- Grupo Castrado (grupo C3)
- Grupo Castrado/tratado com propionato de testosterona (grupo C3pt).

Ratos dos grupos Sham (n = 8), C3 (n = 8) e C3pt- (n = 16) foram submetidos a cirurgia aberta. O grupo Sham sofreu apenas anestesia e a incisão.

Para C3 e C3pt, a cirurgia envolveu orquidectomia sob anestesia com 75 mg/kg de cetamina e 12 mg/kg de xilazina. Após a cirurgia, todos os animais foram monitorados durante todo o período experimental adicional. Após 3 dias de castração, os animais destinados ao grupo C3pt foram tratados com uma dose única de propionato de testosterona (PT - 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e eutanasiados após 8 horas (n = 8; denominado grupo C3pt8) ou 24 horas (n = 8; denominado grupo C3pt24).

5.1.2 Castração cirúrgica

Os ratos foram anestesiados com cetamina 75 mg/kg e xilazina 12 mg/kg e castrados por via escrotal através de uma incisão longitudinal na região média do escroto. Após a incisão na túnica albugínea e expulsão dos testículos, os pedículos vasculares foram ligados acima da cabeça do epidídimo e seccionados. As estruturas restantes foram recolocadas na cavidade; o escroto foi suturado e a antisepsia foi feita com etanol 70% na área operada. Os ratos destinados ao grupo Sham foram somente expostos a incisão cirúrgica.

5.1.3 Modelo de privação alimentar

Para outro modelo experimental de atrofia, utilizou-se o modelo murino submetido ao procedimento de privação alimentar (jejum) de 48 horas, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (161/2017) - disponível no Anexo 1. Foram utilizados 16 camundongos C57BL/6 machos adultos pesando 22 - 25 g do Laboratório de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram divididos igualmente em dois grupos:

- Controle (grupo controle);
- Privação alimentar de 48 horas (grupo FD48).

Os animais foram alimentados com água e ração padrão *ad libitum* por duas semanas para aclimação ao biotério. No início do experimento, os *pellets* de alimento foram removidos das gaiolas dos animais do grupo submetido ao jejum.

5.2 Experimentação animal

Os métodos experimentais de ambos os modelos estão dispostos na forma de algoritmo representado esquematicamente na Figura 4.

Durante todo o período experimental (privação/reposição de testosterona e privação de alimento), os animais (ratos e camundongos) foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com água e ração *ad libitum* (exceto durante o momento de privação alimentar) e em todos os aspectos, todos os protocolos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório [Publicação DHEW No. (NIH) 86-23, Revisado 1985, Escritório de Ciência e Relatórios de Saúde, DRR / NIH, Bethesda, MD 20892].

Todos os animais, no momento apropriado, foram mortos por decapitação e os músculos dos ratos e camundongos foram dissecados, pesados, rapidamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados e armazenados a -80°C. No momento da utilização, cada músculo EA e Gastrocnêmio foram transferidos para microtubos livres de RNase. O RNA foi isolado usando o método TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) para hibridização por *microarray* e análise de RT-PCR.

5.3 Extrações de RNA das amostras musculares

Tanto os músculos EA quanto o Gastrocnêmio de cada um dos grupos de ratos e camundongos foram rapidamente macerados em cadinhos autoclavados, com uma pequena quantidade de nitrogênio líquido e rapidamente transferidos para microtubos de 1,5 mL livres de RNase.

A extração de RNA total das amostras foi feita pelo método do TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies, CA), adicionando 1 mL de TRIzol™ em cada amostra. Adicionou-se à cada amostra uma pequena esfera de metal para lise mecânica realizada com o

aparelho TissueLyser II (Qiagen, Alemanha) seguindo programação de dois minutos a 30 Hz (Hertz), mantido os tubos refrigerados durante todo processo. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido da adição de 200 µL de clorofórmio (Baker, EUA) em cada tubo, agitação vigorosa por 15 segundos e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos a 4°C, onde foi possível a visualização de uma fase aquosa onde o RNA permanece, exclusivamente. Essa fase foi totalmente transferida para outros microtubos de 1,5 mL livres de RNase.

Para a precipitação do RNA, foi adicionado às amostras 500 µL de isopropanol 100%, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos a 4°C sendo possível a visualização de um *pellet* semelhante a um gel no fundo de cada tubo. Para a lavagem do RNA, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% e as amostras foram brevemente agitadas em vortex e então centrifugadas a 7500 xg por cinco minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e após a secagem dos *pellets*, estes foram ressuspensos em 20-30 µl de água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% e autoclavada), incubados em banho-maria a 55°C por 10 minutos e então quantificados por densidade óptica em espectrofotômetro (260 nm).

5.4 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega, EUA) e com o iniciador oligo (dT). Porém, antes da síntese, as amostras de RNA foram tratadas com DNase, utilizando 1 µg de RNA total, 1 µL de tampão

10x da enzima, 1 µL de DNase e água tratada com DEPC completando para um volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos, seguido da adição de 1 µL de solução de parada da reação e novamente incubadas a 65°C por 10 minutos. Para a realização da transcrição reversa, foram utilizados os 11 µL das amostras tratadas e 1 µL de iniciador oligo (dT). Para o anelamento do oligo (dT) as amostras foram incubada por 10 minutos a 70°C e, em seguida, por cinco minutos a 4°C. Em sequência foram adicionados 4 µL do tampão 5x da enzima, 2 µL da enzima transcriptase reversa, 2 µL de dNTP “mix” (10 mM) e água DEPC para um volume final de 20 µL. Após a adição do “mix”, as amostras foram incubadas a 25°C por cinco minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. Após a síntese completa as amostras foram devidamente mantidas refrigeradas a -20°C.

5.5 Metodologia do *microarray*

Para identificar genes diferencialmente expressos em músculo EA de ratos em resposta ao tratamento com propionato de testosterona, realizou-se um ensaio de *microarray* utilizando lâminas de oligonucleotídeos de rato 4 x 44K (Kit de *microarray* de GE4x44k v3 de rato, Agilent Technologies, G2519F, *design ID* 028282). Amostras do grupo Castrado (C3, n = 4) foram tomados como referência e as lâminas foram empregadas para estabelecer a razão de expressão gênica entre C3 x C3pt8 (8 h tratamento; n = 4), e C3 x C3pt24 (24 h tratamento; n = 4).

Neste sentido, os RNAs de C3 e amostras tratadas com PT foram marcados com Cyanin 3 (Cy3) e Cyanin 5 (Cy5) dUTP, respectivamente. Como controle interno, 200 ng de RNA total foram incubados com RNA *Spike-In* A ou B. A síntese de cDNA e a seguinte marcação e síntese de cRNA a partir do cDNA foram realizadas usando o kit *Quick Amp Labeling* (Agilent Technologies), de acordo com as instruções do

fabricante. O cRNA resultante foi purificado em colunas conforme instruído no kit *RNeasy Plus* (Qiagen, Alemanha) e quantificado em um equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, CA). Alvos marcados com fluorescência de ratos castrados (controle) e ratos castrados tratados com propionato de testosterona (8 h ou 24 h) foram hibridizados para a mesma lâmina de *microarray* com sondas de 60 µm (4 réplicas). Um procedimento de rotulagem *flip* (troca de corante) foi seguido para anular o viés de corante associado à incorporação desigual dos dois corantes Cy em cDNA (Martin-Magniette, Aubert et al. 2005). As lâminas foram escaneadas no GenePix 4000B (Molecular Devices) que escaneia simultaneamente os canais Cy3 e Cy5 com uma resolução de 5 µm. As imagens TIFF Cy3 e Cy5 mescladas geradas pelo Gene-Pix foram analisadas usando o *Software* de extração de recursos Agilent v.9.5.3.1 (Agilent Technologies).

O trabalho descrito teve seu início em 2013 no projeto de mestrado com a descrição dos dados obtidos apresentados na Dissertação. No desenvolvimento do doutorado, foi dada continuidade ao trabalho, porém com várias modificações de análises dos dados primários obtidos no *microarray*.

Na primeira análise de 2013, para um gene ser considerado diferencialmente expresso, foi utilizado dois critérios: valor de $p < 0,1$ obtido com o teste *t* de *Student* e *fold-change* ($\log_2$) > 1 ou < -1 . Dessa maneira, em 8 horas de tratamento com propionato de testosterona 113 genes foram selecionados por esses parâmetros enquanto em 24 horas de tratamento, o número foi de 303 genes diferencialmente expressos. Os alvos que foram escolhidos para validação pela técnica de RT-PCR estavam dentro do grupo tratado por 24 horas com PT. Eles foram selecionados a partir de buscas em banco de dados sobre suas funções e relevância.

Para publicação do trabalho, uma segunda análise foi realizada, de forma a aplicar métodos consolidados no processamento de dados de *microarray*. Para isso, as intensidades de sinal bruto de quimioluminescência das lâminas de *microarray* foram corrigidas e normalizadas usando uma técnica de regressão local LOWESS (*Leachly Screening Scotter Plot Weighted*) (Cleveland 1988).

O pacote de dados Limma em R/Biocondutor foi utilizado para identificar os genes diferencialmente expressos. Limma (Ritchie, Phipson et al. 2015) ajusta um modelo linear para a expressão de cada gene. Isso permite estimar a variância residual de cada gene e a aplicação do *teste t moderado* o que é vantajoso para um pequeno 'n' de repetições do experimento (4 repetições biológicas) (Smyth 2005, Ritchie, Phipson et al. 2015). O *teste t moderado* utiliza a informação de vários genes para o cálculo da variância, enquanto que o *teste t de Student* calcula a variância usando os valores disponíveis para cada gene, em cada réplica. Dessa forma, reduz-se o número de falsos positivos. Nessa segunda análise, os valores de p foram ajustados para múltiplos testes controlando-se a taxa de falsa descoberta (FDR) pelo método de Benjamini-Hochberg. Os genes com um $FDR < 0,05$ e um *fold change* $\geq 1,5$ foram considerados significativamente diferentes entre os grupos de tratamentos com PT e o grupo castrado 3 dias. Dentro desses parâmetros, em 24 horas de tratamento com PT foram observados 241 genes diferencialmente expressos. Em 8 horas de tratamento apenas 1 gene (adenosilmetionina descarboxilase 1, Amd1) apresentou-se diferencialmente expresso. A expressão dos *top* 50 genes diferencialmente expressos em 24 horas foram representados usando um mapa de calor (*heatmap*). Para tanto, foi utilizado o algoritmo de agrupamento hierárquico (HCL - distância euclidiana) que ordena os genes em função da similaridade do perfil de expressão dos genes e das amostras. Análise de enriquecimento funcional

foi realizada com os 241 genes diferencialmente expressos em 24 horas e a análise de agrupamento foi realizada usando o pacote *gplots* na linguagem R (<https://www.rdocumentation.org/packages/gplots>).

Os genes foram anotados quanto a sua ontologia (*Gene Ontology* - GO) utilizando o banco de Dados de Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID) (Huang da, Sherman et al. 2009). O teste exato de Fisher foi aplicado para identificar categorias funcionais enriquecidas. Os valores de *p* foram novamente ajustados para múltiplos testes controlando para taxa de falsa descoberta pelo método de Benjamini-Hochberg, selecionando um FDR < 0,05 foi como critério de corte.

Os dados do *microarray* foram depositados no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia GEO (NCBI GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) e estão disponíveis sob o número de acesso GSE97740.

Todas as análises obtidas com os dados do *microarray*, e suas posteriores mudanças descritas previamente, tiveram a colaboração da Dra. Livia Soares Zaramela (Departamento de Pediatria, Universidade da Califórnia, San Diego).

Gene	NCBI RefSeq	Anotação	Log2 (fold change)	Mudança absol.	p-valor	p-valor.ajust (BH)
Fbxo32	NM_133521	<i>F-box only protein 32/Atrogin-1</i>	-2.826	7.090	0.0000	0.0001
Klhl38	NM_001025008	<i>Kelch-like protein 38</i>	-2.301	4.928	0.0000	0.0002
Pik3ip1	NM_001017453	<i>Phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1</i>	-2.029	4.082	0.0000	0.0002
Mettl7a	NM_001037355	<i>Methyltransferase like 7A</i>	-2.020	4.055	0.0000	0.0000
Igfbp3	NM_012588	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>	-1.975	3.930	0.0000	0.0002
CXLX14	NM_001013137	<i>C-X-C motif chemokine 14</i>	-1.579	3.006	0.0000	0.0002
Igf-1	NM_001082479	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	1.758	3.383	0.0000	0.0001
Klf15	NM_053536	<i>Kruppel-like factor 15</i>	-1.403	2.644	0.0000	0.0003
Amd1	NM_031011	<i>S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme</i>	1.626	3.087	0.0000	0.0006
Cck	NM_012829	<i>Cholecystokinin</i>	1.228	2.343	0.0000	0.0011

Hopx	NM_133621	<i>HOP homeobox</i>	1.100	2.143	0.0000	0.0011
Odc1	NM_012615	<i>Ornithine decarboxylase</i>	1.241	2.364	0.0000	0.0025
Mkl1	XM_235497	<i>Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1</i>	0.991	1.988	0.0000	0.0034
Pgf	NM_053595	<i>Placental growth factor</i>	0.796	1.736	0.0000	0.0122
Pi15	NM_001106917	<i>Peptidase inhibitor 15</i>	0.642	1.560	0.0002	0.0330
Apln	NM_031612	<i>Apelin</i>	0.224	1.168	0.0728	0.4866
Dusp5	NM_133578	<i>Dual specificity phosphatase 5</i>	0.111	1.080	0.3182	0.7624

Tabela 1. FDR e log2 (razão de *fold-change*) de genes diferencialmente expressos selecionados para validação por RT-PCR. O ensaio de *microarray* foi realizado utilizando quatro replicatas biológicas. A expressão diferencial dos genes foi avaliada com o pacote Limma em R/Biocondutor. Os genes foram considerados diferencialmente expressos se seus valores de p, ajustados para o teste de hipóteses múltiplas, fossem < 0,05 e *fold-change* ≥ 1,5.

5.6 Reações de RT-PCR

O cDNA das amostras foram submetidos à reação de PCR em tempo real utilizando o kit *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (Bio-Rad Laboratories, CA) e os *primers forward* e *reverse* com sequências específicas para amplificação dos genes alvos escolhidos (na Tabela 2), sendo o gene constitutivo (*housekeeping*) RPL39 ou RPL32 escolhido para a normalização dos dados. O gene Atrogin-1 também foi utilizado como controle.

Os resultados foram obtidos com o aparelho da CFX96™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, EUA) a partir da ciclagem: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e ciclagem de 40 vezes de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, seguido pelo ciclo de dissociação para verificação de um produto através de análise pela curva *melting*. Os resultados foram analisados de acordo com o método do $\Delta\Delta C_t$. A quantificação relativa dos níveis de RNAm foi expressa relativamente ao controle. A média dos valores de C_t de cada duplicata foi usada para o cálculo do ΔC_t (C_t do gene *interesse* - C_t do gene constitutivo). Os valores de $\Delta\Delta C_t$ (ΔC_t do grupo teste - ΔC_t do grupo controle) foram calculados e a amplificação de RNAm foi determinada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001).

A partir dos valores obtidos era feita a busca por possíveis valores *outlier* na distribuição gaussiana dos dados através do teste de *Grubb's* (disponível em <http://www.graphpad.com/quickcalcs/>).

Para as análises estatísticas tivemos a colaboração da Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier (Universidade Estadual de Londrina, UEL). Todas as estatísticas foram realizadas com análise de variância simples *One-way* ANOVA não pareado e pós-teste de *Tukey*, com valor de $p \leq 0,05$, no programa *GraphPad Prism* 5.0.

GENE	HumanCyc	Primers Forward e Reverse
AMD1	Adenosilmetionina descarboxilase. Enzima essencial para a biossíntese de poliaminas.	Forward: 5' CCATCCCAAGATCCGAGTGG 3' Reverse: 5' GTGTGGGTACCCTTGGTGAG 3'
APLN	Apelina ou ligante de APJ.	Forward: 5' TGCCACGGACCGAGTTGCAG 3' Reverse: 5' GGCAGCATCAGTGGCACTCCA 3' Mouse/Forward: 5' ACCGTGCCTTCTAATGTCTTC 3' Mouse/Reverse: 5' TTGGGCTCTGACTTTCTGTG 3'
Atrogin-1	Controle positivo. Atroгене.	Rat/Forward: 5' CTTGGATGAGAAAAGCGGCACCTT 3' Rat/Reverse: 5' GTTGCCCAACCAGCACGGACTTG 3' Mouse/ Forward: 5' CAGGTCGGTGATCGTGAG 3' Mouse/ Reverse: 5' GCAGAGAGTCGGCAAGTC 3'
CCK	Colecistoquinina. Peptídeo que induz liberação de enzimas pancreáticas. Ação na proliferação celular e apoptose.	Rat/ Forward: 5' GGTCCGCAAAGCTCCCTCTGG 3' Rat/ Reverse: 5' GGCCGAAATCCATCCAGCCCAT 3' Mouse/ Forward: 5' GGACCCAGCCATAGAATAAG 3' Mouse/ Reverse: 5' CAACATTAGGTCTGGGAGTCAC 3'
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo.	Forward: 5' CAAGATTGGCGTGTGCCACTG 3' Reverse: 5' CAGTCGGTAGGCAGCTAGGG 3'
CXCL14	Proteína pertencente à família de quimiocinas. Expressa em músculo esquelético.	Forward: 5' GAGAAACGCAGGGTCTACGA 3' Reverse: 5' TGAAGTCTGGTACGCAGGAG 3'
DUSP5	Proteína fosfatase 5 de dupla especificidade. Apresenta atividade de fosfatase para vários substratos, como forte interação com ERK1.	Forward: 5' TGACCAGGGTGGCCCAGTTGAA 3' Reverse: 5' GGTTGGCGAGGAAGTCTGCACT 3'
FOXO3	Fator de transcrição que regula o sistema ubiquitina proteassoma e a via de autofagia durante a atrofia.	Forward: 5' CGTGCCTTGTCAAATTCTGTC 3' Reverse: 5' CCATTTCCCTTTTCTCAGTG 3'

HOPX	Fator de transcrição. Necessário para modular o crescimento e desenvolvimento cardíaco. Recruta proteínas HDAC.	<i>Rat/Forward:</i> 5' TCACGGAGGAGCAGACGCAGAAAT 3' <i>Rat/Reverse:</i> 5' GCTCAAGGGCCTGGCTCCCTA 3' <hr/> <i>Mouse/ Forward:</i> 5' TCCTCTCCATCCTTAGTCAGAC 3' <i>Mouse/ Reverse:</i> 5' GAAACATCAAAACAGCCTGGG 3'
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1. Atividade promotora de crescimento.	<i>Forward:</i> 5' CCTTTGCGGGGCTGAGCTGG 3' <i>Reverse:</i> 5' CCATAGCCTGTGGGCTTGTGAAGT3' <hr/> <i>Mouse/Forward:</i> 5' TCAACAGCAATCTACCCACG 3' <i>Mouse/Reverse:</i> 5' GAAAACGAAGCTGCAAAGGAG 3'
IGFBP3	Proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina. Inibe ou estimula os efeitos de promoção do crescimento dos IGFs.	<i>Rat/Forward:</i> 5' AGCCGTCTCCTGGAAACACCACT 3' <i>Rat/Reverse:</i> 5' TCAGTCACGCGGTGTGTGCT 3' <hr/> <i>Mouse/Forward:</i> 5' AAATCCTCTTTCCATCCCCTG 3' <i>Mouse/Reverse:</i> 5' CAACACATATCCTCTCCACAG 3'
KLF15	Fator 15 semelhante à Kruppel. Regulador transcricional envolvido no controle da hipertrofia cardíaca.	<i>Forward:</i> 5' CTGCAGACAAGTCACCACAGGCT 3' <i>Reverse:</i> 5' CCACTGGGCATTTCGGTGACGA 3'
KLHL38	Proteína do tipo Kelch 38. Organizadores de actina.	<i>Forward:</i> 5' TGTGCGCCTTATCCAGGTTTA 3' <i>Reverse:</i> 5' CATGGTGCATCCTTCGGTCT 3'
METTL7A	Metiltransferase tipo 7A. Atividade de metiltransferase.	<i>Forward:</i> 5' GCTGTGCTCGGTGAAGAGCCA 3' <i>Reverse:</i> 5' CGTTCATCCGCCACATGCTCCA 3'
MKL1	Proteína serina/treonina quinase. Envolvida em uma via de sinalização de cálcio. Atividade catalítica.	<i>Forward:</i> 5' CTCCAAGCCCTCGGGTGAGA 3' <i>Reverse:</i> 5' GTTCTGACGGGCCAGCCAC 3'
ODC1	Proteína ornitina descarboxilase. Atua na biossíntese de poliamina.	<i>Forward:</i> 5' CGCTTCCCTGTGCTGTGAGGAGA 3' <i>Reverse:</i> 5' TGGTTGGTTCTCGATGTGCCTCTGA 3'
PGF	Fator de crescimento placentário. Ativo na angiogênese e no crescimento de células endoteliais.	<i>Rat/Forward:</i> 5' AGGATGTGCTCTGCGAATGCAGG 3' <i>Rat/Reverse:</i> 5' GCATCACAGGTGGGGTTCCTCAG 3' <hr/> <i>Mouse/Forward:</i> 5' TTTCTCAGGATGTGCTCTGTG 3' <i>Mouse/Reverse:</i> 5' CCTTCCATGCCCCCTTATCTTG 3'
PI15	Inibidor de peptidase 15. Inibidor de serino proteases	<i>Forward:</i> 5' CATGGGCAGCAACTTGCATT 3' <i>Reverse:</i> 5' AGTGGCCCAAACCATCTGTG 3' <hr/> <i>Mouse/Forward:</i> 5' ATTATGCCTTTCCTTACCCTCAG 3' <i>Mouse/Reverse:</i> 5' GTGCTTCTCCTATCCAGTTACC 3'
PIK3IP1	Proteína 1 de interação da Fosfatidilinositol 3 quinase. Regulador negativo da atividade de PI3K.	<i>Forward:</i> 5' GCTACATCAGCAGCGAGACT 3' <i>Reverse:</i> 5' ACACGTAGCCCAAAGTTCCC 3'
RPS6ka5	Proteína serina/treonina quinase. Em mioblastos esqueléticos é necessário para a fosforilação do fator de transcrição RELA durante o estresse oxidativo.	<i>Forward:</i> 5' TGGTGACGTTGCACTATGCT 3' <i>Reverse:</i> 5' ACGCTCTTTCGGCTTCATCA 3'

RPL39	Controle endógeno para rato (<i>housekeeping</i>).	<i>Forward</i> : 5' TCCTGGCAAAGAAACAAAAGC 3' <i>Reverse</i> : 5' TAGACCCAGCTTCGTTCTCCT 3'
RPL32	Controle endógeno para camundongo. (<i>housekeeping</i>).	<i>Forward</i> : 5' TCTGGTGAAGCCCAAAGATCG 3' <i>Reverse</i> : 5' CTCTGGGTTTCCGCCAGTT 3'

Tabela 2. Identificação de genes e sequência de primers *Forward* e *Reverse* usados para amplificação de cDNA em ensaio de RT-PCR. Os alvos foram escolhidos dentro dos resultados do ensaio de *microarray*, com base nos parâmetros descritos. Os genes em destaque representam as sequências de expressão constitutiva (RPL32 e RPL39), FOXO3 e o controle positivo (Atrogin-1). Atrogin-1 foi escolhida com base em sua resposta conhecida aos desafios atroficos, bem como FOXO3. As sequências são diferentes entre ratos e camundongos nos genes onde os alvos foram avaliados para ambos.

5.7 SUnSET

Recentemente, um método não radioativo para avaliar a síntese proteica em culturas de células, conhecido como SUnSET (*Surface Sensing of Translation*), foi desenvolvido e validado contra os métodos existentes (Schmidt, Clavarino et al. 2009). O método baseia-se no princípio de que a puromicina é incorporada em cadeias peptídicas em alongamento, em baixa concentração, devido à sua estrutura em analogia ao tirosil t-RNA (Nathans 1964). Em alta concentração, a puromicina efetivamente encerra a tradução. No entanto, em concentrações muito baixas e durante breves períodos de tempo, ela não interfere nas taxas gerais de tradução nem induz uma resposta ao estresse. Os peptídeos conjugados com puromicina podem então ser detectados por *imunoblotting* utilizando um anticorpo anti-puromicina, que representa a taxa global de síntese proteica (Schmidt, Clavarino et al. 2009).

Para os experimentos, a linhagem celular foi cultivada em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Invitrogen Life Technologies, CA), 10 µg de estreptomicina, 10 U/mL de penicilina G sódica e 29,2 µg/mL de glutamina (Invitrogen Life Technologies, CA) mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Para a realização dos experimentos, células HEK293T (células renais embrionárias humanas) foram utilizadas e transfectadas com plasmídeos de expressão contendo os genes: APLN (gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Masri, da Universidade de Toulouse III) ou MKL1 (gentilmente cedido pela Dra. Akiko Atabuchi, da Universidade de Toyama). Como controle utilizou-se o plasmídeo pcDNA3.

As células foram plaqueadas em confluência de 70% em 7 poços de placas de 6 poços no dia anterior a transfecção. No dia seguinte, as células foram transfectadas em quadruplicata para o plasmídeo alvo e controle em placa de 6 poços.

Figura 2. Esquema simplificado das montagens das placas para o experimento SUnSET.

Para a transfecção utilizou-se 2 ug de DNA para 6 uL de reagente de transfecção pEI (polietilenoimina) em 90 uL de Optimem, a solução foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, gotejado-se o volume final por poço a ser transfectado. Após 36 horas de transfecção, as células foram incubadas por meia hora antes da lise com uma solução de Puromicina a 1 uM diluída em DMEM. Para os poços controles, utilizou-se além da Puromicina, a cicloheximida (um inibidor da síntese proteica) na concentração final de 10 mg/mL também por meia hora.

Após o período de tratamento das células, a lise foi feita em gelo, com o auxílio de rodinho, em 100 uL de solução de RIPA (*Radioimmuno Precipitation Assay*) 1x mais inibidores de fosfatase e proteases. Deixadas em homogenizador rotacional por

meia hora a 4°C. Em seguida, foram sonicadas com três pulsos de 10 segundos *on/off* com 20% de amplitude. Centrifugadas por 14.000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos.

As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford 1976) (Sigma-Aldrich, EUA) e 60 ug de proteínas totais foram preparadas em tampão *Laemmli* (62,5 mM Tris-HCl, 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 2% SDS, 0,004% azul bromofenol), fervidas a 100°C por cinco minutos para desnaturação das proteínas e corridas em gel de poliacrilamida 10% por duas horas a 100 V para separação. A transferência das proteínas foi feita para membrana de nitrocelulose utilizando tampão específico para o sistema semi-seco (tampão 48 mM Tris, 39 mM Glicina, 20% metanol, 0,0375% SDS) por 35 minutos no aparelho Trans-Blot (BioRad) em amperagem constante de 400 mA. Após o processo de transferência, a membrana foi corada com *Ponceau* (*Ponceau* S 50mg, Ácido Acético glacial 5% e água Milli-Q q.s.p. 50 mL) e a imagem da membrana corada foi utilizada para posterior análise da síntese proteica das amostras. A membrana foi bloqueada com uma solução de leite desnatado 5% e incubada *overnight* com o anticorpo anti-Puromicina (1:25.000 - MABE, clone 12D10, Sigma-Aldrich) e revelada pelo método de quimiluminescência. Para normalização utilizou-se o anticorpo anti-GAPDH (1:10.000 - G9295, Sigma-Aldrich). Também utilizamos o anticorpo anti-pS6 (1:500 - #2215, Cell Signaling) para avaliar o possível aumento na via de síntese.

5.8 Array de anticorpos anti-fosfoquinases

Para a extração de proteínas totais, amostras de músculo EA armazenadas em *freezer* -80°C foram mantidas em nitrogênio líquido e pulverizadas com o auxílio de cadinhos previamente esterilizados. Aproximadamente 15 mg de músculo

pulverizado foram transferidos para microtubos *safer-lockers* livres de RNase, adicionado um volume de 300 uL de tampão de lise disponibilizado no kit acrescido de inibidor de fosfatases (Sigma-Aldrich, EUA). Todos os componentes foram mantidos em gelo durante todo o procedimento. Para a lise mecânica utilizou-se novamente a lise mecânica no equipamento TissueLyser II (Qiagen, Alemanha) com programação de 2 minutos a 30 Hz.

Após o processo de ruptura mecânica, os tubos foram agitados em agitador rotacional por duas horas a 4°C. Seguido de centrifugação por 20 minutos a 4°C a 14000 RPM. O sobrenadante foi colhido e armazenado em novos microtubos livres de RNase. A quantificação de proteínas totais foi feita conforme já descrito.

Para a determinação dos níveis relativos de fosforilação de proteínas utilizou-se o kit *Proteoma Profile Human Phospho-kinase array* (R&D Systems, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Nele, as 43 fosfoquinases e os controles encontravam-se divididas em partes A e B. A parte 'A' contendo 29 anticorpos impressos em duplicata e a parte 'B' contendo 16 anticorpos impressos em duplicata. As respectivas coordenadas dos controles e das fosfoquinases nas membranas e seus sítios de fosforilação estão disponíveis no Anexo 2.

Dois jogos A-B foram utilizados para dois animais castrados 3 dias e outros dois A-B foram utilizados para dois animais castrados 3 dias e tratados com PT por 8 horas. Para cada jogo de membranas A-B foram utilizadas 600 ug de proteínas totais para a incubação *overnight*. A marcação dos anticorpos foi feita com Streptavidina-HRP e reveladas com reagentes disponibilizados pelo fabricante.

As imagens, capturadas ImageQuant (GE Healthcare, EUA), foram analisadas com o módulo de extensão *Microarray* do software *Image J* (versão 1.47, *National Institute of Health*, EUA) medindo-se a densidade de *pixel* de cada poço, os valores

exportados para uma planilha *Microsoft Excel*, a média do sinal da duplicata de cada fosfoquinase calculada e então foi extraído o valor de *background* (dos poços de PBS das membranas A e B). O resultado foi obtido comparando-se os sinais correspondentes nos diferentes grupos para determinar a mudança do perfil de fosforilação de proteínas quinases dos animais castrados por 3 dias e tratados 8 horas com PT em relação ao grupo castrado 3 dias.

5.9 Immunoblotting

Todas as tentativas de validação das proteínas de maneira quantitativa, tanto do ensaio de RT-PCR quanto do *array* de anticorpos anti-fosfoquinases, foram feitas por *Western blotting*. Amostras contendo 60-100 ug de proteínas totais extraídas, já descritas anteriormente, foram preparadas em tampão *Laemmli*, fervidas por cinco minutos a 100°C para desnaturação das proteínas. Após fervuras, as amostras foram corridas em gel de poliacrilamida 10%, 100 V por duas horas ou mais dependendo do tamanho da proteína-alvo. A transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose foi feita no aparelho Trans-Blot (Bio-Rad, EUA) com tampão específico para o sistema semi-seco.

Seguido por bloqueio da membrana por uma hora em solução de leite 5% em TTBS (tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,1 M, Tween 20 0,05%). Após as lavagens, as incubações com os anticorpos primários foram feitas *overnight*. A revelação foi feita por quimiluminescência utilizado o reagente Amersham ECL (GE Healthcare, EUA) e as imagens capturadas pelo aparelho ImageQuant (GE Healthcare, EUA).

As membranas de nitrocelulose coradas com *Ponceau* após a transferência das proteínas estão disponíveis no Apêndice C.

5.9.1 Anticorpos

Anticorpos testados para validação dos resultados obtidos por RT-PCR:

AKT – Cell signaling, número de catálogo: #4691

CCK – Proteintech, número de catálogo: 13074-2-AP

FOXO3a – Sigma-Aldrich, número de catálogo: F2178

Phospho-FOXO3a – Cell Signalling, número de catálogo: 07-695

HDAC4 (4A3)– Cell signaling, número de catálogo: #5392

Phospho-HDAC4 (Ser246)/HDAC5 (Ser259)/ HDAC7 (Ser155) – Cell Signaling, número de catálogo: #3443

Phospho-HDAC4 (Ser632)/HDAC5 (Ser498)/ HDAC7 (Ser486) – Cell Signaling, número de catálogo: #3424

HOPX – Sigma-Aldrich, número de catálogo: HPA030180

IGFBP3 – OriGene, número de catálogo: TA303275

METTL7A – OriGene, número de catálogo: TA306679

MKL1 – Sigma-Aldrich, número de catálogo: HPA030782

PGF – Proteintech, número de catálogo: 10642-1AP

PIK3IP1 – Proteintech, número de catálogo: 16826-1-AP

Anticorpos testados para validação dos resultados obtidos pelo array de anticorpos anti-fosfoquinasas:

Phospho-AKT (Ser473) (D9E) Cell signaling, número de catálogo: #4060

Phospho-CREB (Ser133) (87G3) Cell signaling, número de catálogo: #9198

Phospho-eNOS (Ser1177) Cell Signaling, número de catálogo: #9571

Phospho-p70S6k (Thr389) Santa Cruz Biotechnology, número de catálogo: sc-11759

Phospho-STAT3 (Y705) R&D Systems, número de catálogo: MAB4607

RESULTADOS

6. Resultados

6.1 Modelo de privação de andrógeno

Como esperado, no modelo utilizado de privação de andrógeno, nem a castração por 3 dias ou o tratamento androgênico por 8 horas ou 24 horas alteraram significativamente o peso corporal dos ratos analisados quando comparados ao grupo Sham.

Figura 3. Peso do EA corrigido pela relação massa corporal em animais Sham, Castrados e Castrados e tratados 8 h e 24 h com propionato de testosterona. Sham - submetido somente ao procedimento cirúrgico, sem retirada do testículo, seguido por 3 dias e sacrificado; C3 - submetido à castração cirúrgica, seguido de 3 dias e sacrificado; C3pt8 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com PT (dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificado após 8 h; e C3tp24 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com PT (dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificado após 24 h. Nenhuma diferença foi detectada por *One-way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

A análise de *microarray* foi realizada após 8 h e 24 h de tratamento para identificar genes responsivos ao PT em um modelo de reversão de atrofia bem estabelecido. Modelos lineares foram aplicados a 26.276 genes únicos para estimar os efeitos do tratamento e sua significância associada usando o pacote Limma em R/Biocondutor (Ritchie, Phipson et al. 2015). Após 24 h de tratamento com PT, 241 genes foram regulados diferencialmente seguindo o critério: *fold-change* $\geq 1,5$ de expressão induzida ou reprimida e com um valor de FDR $< 0,05$ (a tabela com todos os genes

estão disponíveis no Apêndice A). A análise de enriquecimento de ontologia gênica foi realizada usando a ferramenta disponível na internet DAVID (Huang da, Sherman et al. 2009) e então foi possível observar que as 24 horas de tratamento com PT influenciaram significativamente os componentes extracelulares, a regulação positiva da proliferação de células musculares e a resposta ao estímulo mecânico (dados disponíveis no Apêndice B). Uma pesquisa adicional aos bancos de dados HumanCyc (disponível em <http://humancyc.org>) ou Uniprot (<http://www.uniprot.org>) foi aplicada para avaliar a relevância da via metabólica e da função e então a decisão sobre quais alvos seriam utilizados para a validação foram finalizados.

Figura 4. Representação algorítmica das condições experimentais.

Figura 5. Heatmap dos 50 genes diferencialmente expressos entre castrados e castrados e tratados por 8 h ou 24 h após uma única dose de propionato de testosterona (4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho). O ensaio de *microarray* foi realizado utilizando quatro replicatas biológicas. A expressão

diferencial dos genes foi avaliada com o pacote Limma em R/Bioconductor. Os genes foram considerados diferencialmente expressos se seus valores de p, ajustados para o teste de hipóteses múltiplas, fossem $<0,05$ e *fold-change* $\geq 1,5$. Expressões gênicas induzidas são indicadas em vermelho. Expressões gênicas reprimidas são indicadas em verde.

Figura 6. Ontologia de genes usando os 241 genes diferencialmente expressos após 24 horas de tratamento com PT. Somente termos significativamente enriquecidos (FDR $<0,05$, linha vermelha tracejada) são apresentados como $-\log_{10}$ (FDR). BP, processo biológico; CC, componente celular; GO, ontologia genética. A análise de enriquecimento foi realizada usando o teste exato de Fisher, os valores de p foram ajustados para o FDR usando o método de Benjamini & Hochberg.

6.2 Controle da atrofia

Como atrogene clássico, FBXO32 foi utilizado como gene de controle positivo, estando regulado negativamente após 24 h de tratamento com PT, quando C3 foi a referência. Pode-se observar a expressão característica de FBXO32 drasticamente aumentada durante o processo de atrofia no grupo de animais castrado por 3 dias ($8,2 \pm 6,3$ vezes). Depois do tratamento com PT, a expressão decaiu expressivamente em 8 h e 24 h.

Figura 7. Regulação diferencial do FBXO32 no músculo Elevador do ânus, durante castração ou castração mais tratamento com propionato de testosterona. Os valores representam média $\pm$ DP de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mRNA FBXO32/RPL39 no músculo EA de ratos submetidos à castração por 3 dias (C3, $n = 8$), sendo tratados para reversão da atrofia com propionato de testosterona (PT - dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) após 8 h (C3pt8; $n = 8$) ou após 24 h (C3pt24; $n = 8$). Os valores foram normalizados pela expressão de RPL39 (*housekeeping*), e a razão de expressão estabelecida *versus* o grupo controle (Sham), que tem valor de expressão considerado 1. * $p < 0,05$ comparado com Sham; ** $p < 0,05$ quando comparado com C3, por *One-way* ANOVA seguido de pós-teste de Tukey.

6.3 Grupo dos novos atrogenes

Com a análise do *microarray*, foi observado que o número de genes diferencialmente expressos após 8 h foi muito menor do que após 24 h de tratamento com PT, inferindo que apenas 8 h de tratamento podem ser insuficientes para induzir resposta em todos os genes. Dessa maneira, decidiu-se por direcionar a análise das expressões e validar por RT-PCR o grupo dos animais castrados 3 dias e tratados com PT por 24 horas.

A partir dessa escolha refinada, foi feita a validação desses alvos por RT-PCR utilizando RPL39 como gene de expressão constitutiva. Os valores de C_t foram calculados em média (triplicatas, 8 animais por grupo) e os valores de ΔC_t e $\Delta\Delta C_t$ foram calculados e a amplificação do RNAm foi determinada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Com os valores obtidos, foi realizado o teste de *Grubbs* para detecção de *outliers*, já descrito, dentro do grupo de 8 animais, dados testados para distribuição gaussiana.

As análises estatísticas foram realizadas com análise de variância simples *One-way ANOVA* não pareado e pós-teste de Tukey, com valor de $p < 0,05$, plotados no programa *GraphPad Prism* 6.0.

Os genes validados foram agrupados em duas categorias distintas. Na primeira, foram separados genes de expressão similar aos Atrogenes. Foram considerados aqueles que apresentaram regulação significativa ($p < 0,05$) induzidos ou reprimidos após a castração (grupo C3 *versus* x Sham) e significativa ($p < 0,05$) induzidos ou reprimidos após reposição de testosterona (C3tp24 *versus* grupo C3). Dez genes participaram dessas condições: CCK, HOPX, METTL7A, IGFBP3, PGF, AMD1, CTGF, CXCL14, RPS6Ka5 e ODC1. O gene FOXO3 também foi avaliado como marcador de atrofia nos animais devido ao seu importante papel transcricional dos atrogenes MuRF-1 e FBXO32 quando em condição de atrofia muscular esquelética.

Figura 8. Genes FOXO3, CCK, HOPX e METTL7A identificados como novos atrogenes no músculo Elevador do ânus e validados por RT-PCR. Os genes considerados como atrogenes foram aqueles induzidos ou reprimidos de maneira significativa ($p < 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) em amostras C3, e também de maneira significativa ($p < 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) induzidos ou reprimidos em C3tp24 quando comparado com C3. Sham - submetido apenas ao procedimento cirúrgico, sem retirada do testículo, seguido de 3 dias e sacrificado; C3 - castrado, seguido de 3 dias e sacrificado; C3tp8 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com propionato de testosterona (PT - dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificado após 8 h; e C3tp24 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com propionato de testosterona (PT - dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificados após 24 h. Cada barra representa média $\pm$ DP dos genes validados ($n = 8$), normalizados pela expressão de cada gene em ratos Sham (considerados 1). Todos os valores foram calculados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Figura 9. Genes IGFBP3, PGF, AMD1, CTGF identificados como novos atrogenes no músculo elevador do ânus e validados por RT-PCR. Os genes considerados como atrogenes foram aqueles induzidos ou reprimidos de maneira significativa ($p < 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) em amostras C3, e também de maneira significativa ($p < 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) induzidos ou reprimidos em C3tp24 quando comparado com C3. Sham - submetido apenas ao procedimento cirúrgico, sem retirada do testículo, seguido de 3 dias e sacrificado; C3 - castrado, seguido de 3 dias e sacrificado; C3tp8 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com propionato de testosterona (PT - dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificado após 8 h; e C3tp24 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com propionato de testosterona (PT - dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificados após 24 h. Cada barra representa média $\pm$ DP dos genes validados ($n = 8$), normalizados pela expressão de cada gene em ratos Sham (considerados 1). Todos os valores foram calculados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Figura 10. Genes CXCL14, RPS6Ka5 e ODC1 identificados como novos atrogenes no músculo elevador do ânus e validados por RT-PCR. Os genes considerados como atrogenes foram aqueles induzidos ou reprimidos de maneira significativa ($p < 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) em amostras C3, e também de maneira significativa ($p < 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pós-teste de Tukey) induzidos ou reprimidos em C3tp24 quando comparado com C3. Sham - submetido apenas ao procedimento cirúrgico, sem retirada do testículo, seguido de 3 dias e sacrificado; C3 - castrado, seguido de 3 dias e sacrificado; C3tp8 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com propionato de testosterona (PT - dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificado após 8 h; e C3tp24 - castrado, seguido de 3 dias, tratado com propionato de testosterona (PT - dose única, 4 mg/kg, em 1 mL/kg de óleo de milho) e sacrificados após 24 h. Cada barra representa média $\pm$ DP dos genes validados ($n = 8$), normalizados pela expressão de cada gene em ratos Sham (considerados 1). Todos os valores foram calculados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

6.4 Grupo dos genes associados à reversão da atrofia

Em um segundo grupo estão os genes associados à reversão da atrofia. A condição para ser incluído neste grupo foi que sua regulação deveria ser exclusiva pela reposição hormonal. Sem diferença significativa comparando-se os grupos C3 x Sham, e ter diferença significativa, valor de $p < 0,05$, com expressão induzida ou reprimida entre os grupos C3 x C3pt24. Participam deste grupo: APLN, DUSP5, IGF-1, PIK3IP1, KLHL38, PI15 e MKL1.

Figura 11. Genes APLN, DUSP5, IGF1 e PIK3IP1 associados à reversão da atrofia no músculo elevador do ânus e validados por RT-PCR. Os genes associados à reversão atrofica foram aqueles que não demonstraram expressão significativa ($p > 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) induzida ou reprimida nas amostras C3, mas demonstraram expressão significativa ($p <$

0,05, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) induzida ou reprimida em C3pt24 quando comparado a C3. Cada barra representa média $\pm$ DP dos genes validados ($n = 8$), normalizados pela expressão de cada gene em ratos Sham (considerados 1). Todos os valores foram calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Figura 12. Genes KLHL38, PI15 e MKL1 associados à reversão da atrofia no músculo elevador do ânus e validados por RT-PCR. Os genes associados à reversão atrófica foram aqueles que não demonstraram expressão significativa ($p > 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) induzida ou reprimida nas amostras C3, mas demonstraram expressão significativa ($p < 0,05$, por *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey) induzida ou reprimida em C3pt24 quando comparado a C3. Cada barra representa média $\pm$ DP dos genes validados ($n = 8$), normalizados pela expressão de cada gene em ratos Sham (considerados 1). Todos os valores foram calculados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.5 Comportamentos dos genes-alvo

Resumidamente, é possível organizar o perfil de expressão dos genes-alvo no músculo EA através da classificação como atrogenes e genes associados à reversão da atrofia, ou anti-atrogenes.

Figura 13. Gráficos de barras representando os valores de expressão de *fold-change* após 24 h de tratamento com PT. Os valores foram obtidos a partir do ensaio de *microarray* e a expressão gênica diferencial foi avaliada com o pacote Limma em R/Bioconductor. O log2 negativo (razão) indica genes reprimidos após 24 horas de tratamento com PT. O log2 positivo (razão) indica genes induzidos após 24 horas de tratamento com PT. Gráficos de barras em azul e verde indicam genes classificados como atrogenes. Gráficos de barras em vermelho indicam genes classificados como associados à reversão da atrofia.

Figura 14. Modelo esquemático de *crosstalk* entre processos catabólicos e anabólicos no músculo esquelético. As cores das fontes indicam a classificação dos genes da seguinte forma: azul e verde indicam genes classificados como atro gênicos e vermelho indicam genes classificados como associados à reversão da atrofia.

6.6 Modelo de privação alimentar

A atrofia muscular envolve um programa comum de adaptações transcricionais na expressão gênica (Lecker, Jagoe et al. 2004, Satchek, Hyatt et al. 2007). Com a finalidade de validar se os novos atro gênicos descritos no músculo EA são parte do mesmo programa adaptativo, utilizamos outro músculo esquelético, o Gastrocnêmio. Para a atrofia, foi escolhido o modelo de privação alimentar (jejum de 48 horas) em camundongos. Para tal, foram utilizados dois grupos com oito camundongos machos cada.

Após dois dias sem alimentação, os camundongos foram sacrificados. Animais e músculo Gastrocnêmio foram pesados e observou-se que não houve alteração significativa do peso corporal dos camundongos quando comparado ao grupo Controle.

Figura 15. Peso do Gastrocnêmio (GAS) corrigido pela razão de massa corporal em animais do grupo controle e do grupo privados de alimentos após 48 horas (FD48). Cada barra indica $M \pm DP$ de cada grupo. Nenhuma diferença foi detectada por teste *t* de Student.

Oito atrogenes (FBXO32, FOXO3, CCK, PGF, HOPX, AMD1, ODC1 e IGFBP3) e cinco genes associados à reversão da atrofia (APLN, IGF-1, PI15, DUSP5 e KLHL38,) foram selecionados para validação por RT-PCR no músculo Gastrocnêmio. Como esperado, todos os atrogenes responderam à atrofia por privação alimentar de forma semelhante aos animais submetidos à castração. DUSP5 e KLHL38 reproduziram a resposta do modelo de castração, ou seja, não foi observado alteração nos seus níveis de RNAm pelo estímulo atrófico. Já PI15 teve uma pequena redução. Entretanto, os outros dois alvos (IGF-1 e APLN) foram fortemente reprimidos no jejum.

Nesse estudo, os genes FBXO32 e FOXO3 foram utilizados como controle positivo para a sinalização de resposta atrófica. CCK, PGF, HOPX, AMD1, ODC1, APLN, IGF-1 e PI15 foram significativamente reprimidos durante a privação alimentar, enquanto o IGFBP3 teve sua expressão induzida durante o período de jejum.

Figura 16. Expressão dos genes FBXO32 e FOXO3, atrogênes conhecidos e dos novos identificados CCK e PGF, em modelo murino de atrofia muscular por privação alimentar. Os valores representam média $\pm$ DP do mRNA alvo $2^{-\Delta\Delta CT/RPL32}$ no músculo Gastrocnêmio de camundongos submetidos à privação alimentar por 48 h (grupo FD48, n = 8), e camundongos controle (grupo Controle, n = 8). Os valores foram normalizados pela expressão RPL32 (*housekeeping*), e a razão de expressão estabelecida *versus* o grupo Controle, que tem seu valor de expressão considerado 1. * p < 0,05 comparado ao Controle, pelo teste *t de Student*.

Figura 17. Expressão dos novos atrogenes identificados HOPX, AMD1, ODC1 e IGFBP3 em modelo murino de atrofia muscular por privação alimentar. Os valores representam média $\pm$ DP do mRNA alvo $2^{-\Delta\Delta CT/RPL32}$ no músculo Gastrocnêmio de camundongos submetidos à privação alimentar por 48 h (grupo FD48, n = 8), e camundongos controle (grupo Controle, n = 8). Os valores foram normalizados pela expressão RPL32 (*housekeeping*), e a razão de expressão estabelecida *versus* o grupo Controle, que tem seu valor de expressão considerado 1. * p < 0,05 comparado ao Controle, pelo teste *t* de Student.

Figura 18. Expressão dos genes APLN, IGF-1 e PI15 classificados como anti-atrógenes em modelo de privação/reposição de andrógeno. Os valores representam média $\pm$ DP do mRNA alvo $2^{-\Delta\Delta CT/RPL32}$ no músculo Gastrocnêmio de camundongos submetidos à privação alimentar por 48 h (grupo FD48, n = 8), e camundongos controle (grupo Controle, n = 8). Os valores foram normalizados pela expressão RPL32 (*housekeeping*), e a razão de expressão estabelecida *versus* o grupo Controle, que tem seu valor de expressão considerado 1. * $p < 0,05$ comparado ao Controle, pelo teste *t* de Student.

Figura 19. Expressão dos genes DUSP5 e KLHL38. Ambos reproduziram a resposta do modelo de castração, ou seja, não possuem resposta com alteração significativa de sua expressão ($p < 0,05$) no grupo jejum (grupo FD48, $n = 8$) em relação ao grupo Controle (grupo Controle, $n = 8$) no músculo Gastrocnêmio durante o período de atrofia.

6.7 Ensaios SUnSET

As taxas de síntese de proteínas são geralmente medidas usando marcadores isotópicos para quantificar a incorporação de um aminoácido marcado em proteínas musculares. Recentemente, no entanto, uma técnica não isotópica conhecida como SUnSET (*SURface SENSing of Translation*), que envolve o uso do antibiótico Puromicina, foi desenvolvida para medir a síntese de proteínas em células cultivadas. Dessa maneira, decidiu-se investigar se dois plasmídeos contendo genes associados à reversão da atrofia, APLN e MKL1 (APLN, gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Masri, da Universidade de Toulouse III e MKL1, gentilmente cedido pela Dra. Akiko Atabuchi, da Universidade de Toyama) teriam influência na via de síntese de proteínas. Foi utilizada a técnica de SUnSET em células HEK293T (células renais embrionárias humanas) a fim de tentar detectar um aumento na síntese de proteínas nas células transfectadas com esses genes-alvos.

Após a incubação com anticorpo anti-Puromicina, as amostras foram normalizadas da seguinte maneira: o arraste de proteínas marcadas com o anticorpo anti-Puromicina de uma amostra normalizada pelo mesmo arraste da amostra de proteínas presentes no *Ponceau*, obtidas da mesma membrana transferida. Infelizmente, não foi identificado, com valor de p significativo, mudanças na síntese proteica das células transfectadas com os plasmídeos MKL1 e APLN, apenas uma tendência ao aumento na síntese, mas sem significância estatística. Uma das possibilidades da não detecção desse aumento por Western *blotting* pode ser devido ao modelo celular (HEK293T) empregado.

Figura 20. Plasmídeo APLN em HEK293T. Imagem do *Ponceau* da membrana de nitrocelulose corada contendo 60 ug de proteínas totais. O plasmídeo pcDNA3 foi utilizado como controle. CHX: cicloheximida, utilizada para inibição da síntese proteica.

Figura 21. Plasmídeo APLN em HEK293T. Imagem da membrana revelada com anti-Puromicina e com anti-pS6. O plasmídeo pcDNA3 foi utilizado como controle. CHX: cicloheximida, utilizada para inibição da síntese proteica.

Figura 22. Plasmídeo MKL1 em HEK293T. Imagem do *Ponceau* da membrana de nitrocelulose corada contendo 60 ug de proteínas totais. O plasmídeo pcDNA3 foi utilizado como controle. CHX: cicloheximida, utilizada para inibição da síntese proteica.

Figura 23. Plasmídeo MKL1 em HEK293T. Imagem da membrana revelada com anti-Puromicina e com anti-pS6. O plasmídeo pcDNA3 foi utilizado como controle. CHX: cicloheximida, utilizada para inibição da síntese proteica.

6.8 Array de anticorpos anti-fosfoquinasases

As proteínas quinases são a maior classe de enzimas no genoma humano. Elas regulam quase todos os processos celulares adicionando grupos fosfato às proteínas, modificando assim a atividade, a localização e a função geral de seus alvos. Consequentemente, a atividade anormal de quinases está envolvida em muitas doenças, incluindo a atrofia muscular esquelética (Glass 2010).

Como as quinases respondem rapidamente a estímulos, foi escolhido o menor tempo de tratamento com PT (8 horas) para a análise do perfil de fosforilação das fosfoquinases musculares. Selecionamos duas amostras de animais castrados por três dias e duas amostras de animais castrados e tratados 8 horas com PT para a realização do *array*. Comparamos o perfil de fosforilação das 43 quinases-alvo respeitando a mesma estratégia do *microarray*: C3pt8 x C3.

Animais C3

Figura 24. Membranas A-B de cada animal castrado por 3 dias contendo as duplicatas de poços de cada uma das 43 fosfoquinases e os controles da reação. Os experimentos foram realizados em duplicada. A avaliação do aumento ou diminuição dos níveis de fosforilação foi feita comparando-se amostras dos animais castrados 3 dias e tratados com PT por 8 horas com as amostras dos animais castrados por 3 dias. As coordenadas e os sítios de fosforilação se encontram disponíveis no Anexo 2.

Animais C3PT8

Figura 25. Membranas A-B de cada animal castrado por 3 dias e tratado com PT por 8 horas contendo as duplicatas de poços de cada uma das 43 fosfoquinases e os controles da reação. Os experimentos foram realizados em duplicata. A avaliação do aumento ou diminuição dos níveis de fosforilação foi feita comparando-se amostras dos animais castrados 3 dias e tratados com PT por 8 horas com amostras dos animais castrados por 3 dias. As coordenadas e os sítios de fosforilação se encontram disponíveis no Anexo 2.

Figura 26. Representação esquemática da posição dos poços presentes nas membranas A e B do kit *Proteoma Profile Human Phospho-kinase array* (R&D Systems, EUA). As coordenadas de cada duplicata de fosfoquinases, seus sítios de fosforilação e os poços controles do experimento estão disponíveis no Anexo 2.

Figura 27. Gráficos do *fold-change* das quinases, valores de cada animal tratado por 8 horas com Propionato de Testosterona em relação a expressão média dos animais castrados por 3 dias, todos corrigido com o valor do *background* dos poços controle de PBS. Foram utilizadas 600 ug de proteínas totais por *array* A e B. Em vermelho e em azul, valores de expressão distintas de cada animal castrado e tratado com PT por 8 horas corrigidos pelo valor da média de *background* dos animais castrados 3 dias.

Para validar os resultados obtidos com o *array* de fosfoquinases por *Imunoblotting*, foram selecionadas aquelas com regulação maior ou menor que 30% no tratamento de 8 horas com PT (valores menores que 0,7 ou maiores que 1,3 nos gráficos dispostos acima). As proteínas selecionadas foram escolhidas de acordo com a acessibilidade aos anticorpos.

Fosfoquinases testadas: Fosfo-AKT (Ser473), Fosfo-CREB (Ser133), Fosfo-eNOS (Ser1177), Fosfo-p70S6k (Thr389), Fosfo-STAT3.

Lamentavelmente, apesar de várias tentativas, não foi possível a validação desses dados pela técnica por Western *blotting*.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Os primeiros estudos de perfil de transcrição gênica (*gene expression profiling*) durante a atrofia muscular foram realizados pelos grupos do Dr. Alfred L. Goldberg, *Harvard University*, EUA e Dr. David J. Glass, *Regeneron Pharmaceuticals*, EUA (Bodine, Latres et al. 2001, Gomes, Lecker et al. 2001).

As comparações entre análises do perfil de transcrição em diferentes modelos de atrofia muscular possibilitaram a identificação de um conjunto de genes que são comumente expressos, induzidos ou reprimidos, revelando que a atrofia muscular é um processo ativo e controlado por vias de sinalização e programas transcricionais (Bonaldo and Sandri 2013). Acredita-se que essa resposta transcricional que ocorre durante a atrofia seja de alguma forma responsável pela perda de componentes musculares (Sacheck, Hyatt et al. 2007).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa utilizaram várias técnicas de medidas de atividade de transcrição gênica para auxiliar na identificação de novos genes críticos de atrofia muscular, incluindo análise serial de expressão gênica, *Gene-Tag differential display approach* (Bodine, Latres et al. 2001), análise de *microarray* (Lecker, Jagoe et al. 2004, Sacheck, Hyatt et al. 2007) e técnica de hibridização subtrativa. Esses estudos quase sempre foram realizados em músculos atroficos e nenhum deles focou nos genes que se encontram diferencialmente expressos durante a reversão ou prevenção do processo de atrofia. Pode-se atribuir isto aos desafios de se intervir e obter sucesso na reversão dos processos de atrofia do músculo esquelético em modelos animais distintos, tais como diabetes, câncer, suspensão de membros posteriores, imobilização, distrofias miotônicas tipos 1 e 2 e desnervação. Para superar este problema e assim aumentar a possibilidade de

identificar novos genes associados à atrofia, utilizamos um modelo bem estabelecido de castração e reposição androgênica, pouco explorado nos estudos de atrofia muscular.

A indução da atrofia muscular neste modelo, bem como o início das alterações de sinalização molecular, foi feita através da privação androgênica em ratos machos, sem lesão neuromuscular invasiva, como ocorre na desnervação, ou por distúrbio metabólico sistêmico como causado em modelos de caquexia ou jejum. O músculo Elevador do ânus de ratos machos adultos é particularmente sensível às variações androgênicas e atrofia significativamente em poucos dias após a privação de testosterona (obtida por castração) (Buresova, Gutmann et al. 1972). Pires-Oliveira (Pires-Oliveira, Maragno et al. 2010) demonstrou que a castração dos animais foi obtida de maneira eficiente após as análises dos pesos da glândula seminal e do músculo EA, que diminuem exponencialmente ao longo do tempo até 60 dias após o dia da castração.

A castração nos animais reduz a testosterona plasmática em 82% após um dia e continua a decair em níveis constantes até serem não detectáveis (0,04 ng/mL) após cinco dias (Mendes et al. 2004). A administração do propionato de testosterona foi modificada por Maróstica e colaboradores (Maróstica et al. 2005) para serem atingidas as concentrações plasmáticas de testosterona semelhantes ou ligeiramente superiores às dos animais do grupo controle. O éster PT é mais lipofílico, sendo absorvido lentamente após a dose única, feita em veículos a óleo, nos animais. A concentração plasmática máxima da testosterona ocorre após 24 horas e sua meia vida também é de 24 horas.

No modelo de atrofia de privação androgênica, Pires-Oliveira (Pires-Oliveira, Maragno et al. 2010) demonstrou que os níveis de RNAm de Atrogin-1 encontrava-

se aumentada logo após 2 dias de castração. Essa característica também foi confirmada no nosso trabalho, após 3 dias de castração, no perfil de expressão de Atrogin-1 no grupo C3 na validação do *microarray* por RT-PCR. A indução expressiva de Atrogin-1 em um estágio inicial de perda muscular, antes mesmo da perda de peso muscular ser detectável, sugere fortemente seu importante papel no início da proteólise. Recentemente, Dalbo e colaboradores (Dalbo, Roberts et al. 2017) demonstraram que a reposição crônica de testosterona ativa a via da miostatina, levando a um aumento da massa muscular em ratos idosos castrados.

Em consonância com os dados da literatura, alguns estudos já sugeriram que o processo de atrofia inicia-se principalmente a partir da ativação de um programa bioquímico comum que estimula a proteólise muscular (Mitch and Goldberg 1996, Hasselgren 1999, Lecker, Solomon et al. 1999, Gomes, Lecker et al. 2001) e a degradação de proteínas pelo proteassoma (Rusconi, Mancinelli et al. 2010, Timchenko 2013). Esses fatos juntos levam a conclusão, reforçada na última década, sobre a existência de um grupo de genes relacionados à atrofia, denominados atrogenes. Atualmente, a inibição dos atrogenes é considerada o único efeito terapêutico positivo de alguns tratamentos quando se considera a reversão da atrofia.

No presente trabalho, entre os genes identificados como possíveis novos atrogenes foram encontrados: CCK, HOPX, PGF, AMD1, ODC1, METTL7A, IGFBP3, CTGF, CXCL14 e RPS6Ka5. Nenhum dado na literatura, até o momento, demonstrou estes genes como pertencentes ao grupo dos atrogenes.

O comportamento destes genes foi similar ao controle positivo FBXO32, tanto no ensaio de *microarray* quanto na RT-PCR, ou seja, responderam (de maneira induzida ou reprimida) ao estímulo de castração, e também tiveram seus níveis de

expressão revertidos pela administração do propionato de testosterona. A expressão do atrogene MuRF-1 não foi avaliada como marcador positivo de atrofia pois esta E3-ligase possui expressão tardia, tendo seu pico máximo de expressão em 7 dias de castração (Pires-Oliveira, Maragno et al. 2010) e também tardia também em outros modelos de atrofia (Bodine, Latres et al. 2001, Satchek, Hyatt et al. 2007).

Sabe-se que os fatores de transcrição FOXO controlam a expressão das E3 ligases Atrogin-1 e MuRF-1 e a ativação do SUP, uma das principais vias envolvidas na degradação da proteína muscular e na atrofia muscular (Stitt, Drujan et al. 2004). Sandri e colaboradores em 2004 (Sandri, Sandri et al. 2004) demonstraram que em condições normais de crescimento de miotúbulos e fibras musculares adultas, a via IGF-1/PI3K/Akt suprime a expressão de Atrogin-1 por inativação dos fatores FOXO; a ativação de FOXO pode por si só causar atrofia dramática de miotúbulos e fibras musculares maduras e que inibir a função de FOXO reduz a indução de Atrogin-1 por glicocorticoides *in vitro* e por jejum *in vivo*. Assim, a ativação de FOXO3 é necessária e suficiente para a rápida atrofia. Dessa maneira, também optamos por validar o gene FOXO3 devido sua importância. Em um estudo publicado em 2007, Mammucari (Mammucari, Milan et al. 2007) e colaboradores, baseados principalmente em análises *in vivo* no músculo esquelético, identificaram uma via FOXO3-Bnip3 como um dos principais responsáveis na regulação transcricional de genes relacionados com autofagia. Dentre os 241 genes diferencialmente expressos com o tratamento de 24 h com PT (Lista completa disponível no Anexo 1), não foi encontrado genes como LC3 e Bnip. O que pode indicar que no curto tempo de privação de andrógeno bem como da reposição hormonal, a via de autofagia pode não estar significativamente ativa.

Os genes que foram regulados negativamente quando comparados ao controle, e então positivamente regulados com o tratamento com PT, foram CCK, HOPX, PGF, AMD1 e ODC1.

A colecistocinina (CCK) é um hormônio envolvido no metabolismo de gorduras e proteínas, além da regulação da saciedade (Little, Horowitz et al. 2005). Foi recentemente demonstrado que esta proteína também está indiretamente envolvida na ativação do complexo de rapamicina em mamíferos (mTOR) e no processo de autofagia em alguns tecidos (Little, Horowitz et al. 2005). Além disso, a proteína CCK8, no músculo esquelético, pode ser hidrolisada por proteases ativadas por cálcio.

A proteína de único homeodomínio (HOPX) é codificada pelo gene HOPX. No músculo esquelético, ela foi demonstrada induzir indiretamente a diferenciação do músculo esquelético, através da interação com *Enhancer of Polycomb 1* (Epc1), uma proteína de cromatina que pode modular a diferenciação do músculo esquelético (Kim, Kee et al. 2009). A diferenciação do músculo esquelético é prejudicada em mioblastos de camundongos nocautes para HOPX (Kee, Kim et al. 2007). Já o fator de crescimento placentário (PGF) é uma proteína codificada pelo gene da PGF e tem seu papel bem conhecido por regular a diferenciação e o desenvolvimento vascular (Maglione, Guerriero et al. 1991, Achen, Gad et al. 1997). PGF também foi demonstrado interagir com as vias de hipertrofia (Park, Chen et al. 1994).

Poliaminas têm sido mostradas envolvidas em numerosos processos celulares incluindo transcrição, proliferação celular e apoptose (Childs, Mehta et al. 2003). A putrescina, a espermidina e a espermina são consideradas fatores de crescimento essenciais em praticamente todas as células eucarióticas (Marton and Pegg 1995). Dentro da via de síntese das poliaminas, AMD1 e ODC1 possuem papel

fundamental. A produção de putrescina a partir da ornitina é catalisada pela ornitina descarboxilase (ODC1), e a produção de S-adenosilmetionina descarboxilada, catalisada pela S-adenosilmetionina descarboxilase (AMD1). Reduções nos níveis dessas enzimas envolvidas na via das poliaminas estão intimamente associadas à indução de perda de massa muscular (Lee and MacLean 2011, Bongers, Fox et al. 2015). A associação entre o aumento das poliaminas e regeneração muscular foi demonstrada em outros envolvendo modelos experimentais como seccionamento de tendão e desnervação (Kaminska, Stern et al. 1982).

De modo contrário, os genes METTL7A, IGFBP3, CTGF, CXCL14 e RPS6Ka5 mostraram regulação induzida sob estímulo de castração e foram reprimidos com a reposição de PT, assim como o gene FBXO32 que codifica Atrogin-1.

O gene METTL7A codifica uma proteína do tipo metiltransferase (7A). Essa superfamília de proteínas transfere um grupo metil a resíduos de arginina e lisina, sendo muito comum em histonas na regulação da transcrição. Recentemente, a metilação da lisina também foi encontrada em algumas proteínas não histonas, sugerindo que a metilação reversível regula não apenas a transcrição, mas também uma ampla gama de processos celulares (Del Rizzo and Trievel 2011, Hamamoto, Saloura et al. 2015), incluindo o crescimento celular, embora o gene METTL21C tenha demonstrado ser um gene pleiotrópico, modulando a via de sinalização catabólica do NF- κ B (Huang, Hsu et al. 2014). O gene METTL7A não demonstrou estar envolvido diretamente na regulação da massa muscular até o momento.

No entanto, a proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina codificada pelo gene IGFBP3 é uma das proteínas de ligação ao fator de crescimento de insulina (IGF) que transportam o IGF em circulação. Dentro dos tecidos, IGFBP3 pode se ligar ao IGF-1 e ao IGF-2 liberados por muitos tipos de

células, dessa forma bloqueando seu acesso ao receptor do IGF (IGFR). IGFBP3 também interage com proteínas da superfície celular, afetando a sinalização celular de fora da célula (Stewart and Rotwein 1996). Assim, a diminuição da expressão de IGFBP3 significa diminuição do bloqueio do IGF-IGFR, o que resulta em hipertrofia (Musaro, McCullagh et al. 2001). Por outro lado, o aumento da expressão de IGFBP3 significa aumento do bloqueio do IGF-IGFR, resultando em hipoplasia/atrofia.

O gene CTGF é um fator de crescimento do tecido conjuntivo, uma proteína da matriz celular que pertence à família de proteínas CCN. Ela atua regulando vários processos celulares, como proliferação, migração, adesão e diferenciação atingindo esses efeitos modulando a atividade de vários fatores de crescimento tais como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre muitos outros (Leask, Parapuram et al. 2009, Kubota and Takigawa 2015). A primeira evidência sobre o envolvimento de CTGF na biologia do músculo esquelético veio de estudos de *microarray* que identificaram a expressão do gene CTGF em células de rabdomiossarcoma (Astolfi, De Giovanni et al. 2001). Um estudo de 2005 mostrou que a desnervação do membro posterior e do músculo diafragma induz um aumento da expressão de CTGF e CCN1 no músculo esquelético (Magnusson, Svensson et al. 2005). A expressão desses dois genes também parece ser induzida no músculo esquelético humano após o exercício com alta carga mecânica (Kivela, Kyrolainen et al. 2007). No presente trabalho, o nível de expressão de CTGF se eleva durante o período de castração e diminui cerca de 2,06 vezes após o tratamento de 24 horas com PT corroborando com os dados apresentados na literatura.

O gene CXCL14 codifica uma proteína com função de citocina quimiotática (motivo C-X-C) ligante 14 e faz parte de uma pequena família de citocinas derivadas de músculo. Em um estudo recente, CXCL14 foi demonstrada atuar como um inibidor endógeno da diferenciação de mioblastos e regeneração do músculo esquelético. A redução da sua expressão no tecido muscular após a lesão acelera o processo de regeneração em camundongos adultos jovens e resgata totalmente a capacidade de regeneração em camundongos em envelhecimento com resposta regenerativa prejudicada (Waldemer-Streyer, Reyes-Ordonez et al. 2017). No presente estudo, o gene CXCL14 mostrou aumento de seus níveis no grupo castrado e posterior diminuição de 3,71 vezes quando da reversão da atrofia com o tratamento, condizente com seu papel em músculo esquelético. O mecanismo de ação de CXCL14 na regeneração muscular parece único e ainda não foi encontrado em nenhum outro tecido.

O gene RPS6Ka5 codifica a proteína quinase S6 ribossomal alfa 5, uma serina-treonina quinase pertencente a família de quinases RSK. Também é conhecida como quinase 1 ativada por mitógeno e estresse (MSK1). Um trabalho publicado em 2006 (Kefaloyianni, Gaitanaki et al. 2006) mostrou que essa quinase é fortemente fosforilada pelo tratamento com H₂O₂ em mioblastos de C2C12 e que esta fosforilação é mediada por ambas vias de ERK e p38-MAPK, e que estão implicadas na transativação de NF-κB por estímulo oxidativo, e que essa ação é provavelmente mediada por MSK1. Sua fosforilação por estresse oxidativo também foi relatada em outros tipos de células (Deak, Clifton et al. 1998, Aggeli, Gaitanaki et al. 2006), embora nesses casos a ativação de MSK1 tenha sido mediada apenas por p38-MAPK e não por ERK. A ativação da quinase nos estudos acima foi correlacionada

com a ativação subsequente dos fatores de transcrição (CREB e AP1, respectivamente).

RPS6ka5 também foi demonstrada estar regulada positivamente em tecidos de mioma e miométrio em mulheres portadoras de leiomioma (neoplasia benigna de músculo liso) (Lemeer, Gholami et al. 2015). Neste trabalho, foi observado o aumento dos níveis de RPS6Ka5 no grupo de animais castrados e quando tratados, sua expressão diminuiu-se em 4,79 vezes. Os dados apresentados condizem com os estudos publicados, já que níveis elevados dos fatores de transcrição NF- κ B é frequentemente associada ao aumento da expressão de MuRF-1 e FBXO32 (Cai, Frantz et al. 2004, Wu, Kandarian et al. 2011).

No presente estudo, considerando as funções de síntese proteica e manutenção das vias de massa muscular, parece razoável e coerente supor que o grupo de genes mencionados até o momento possa ser validado dentro do grupo de atrogenes.

Destaca-se que a análise geral dos resultados apresentados neste estudo revelou uma possível nova realidade, considerando não só a resposta de um grupo de genes que respondeu ao estímulo atrófico e também à reversão/atenuação, mas também de um grupo que respondeu positivamente apenas quando o tratamento foi aplicado. Com estas características, os genes APLN, DUSP5, IGF-1, PI15, MKL1, KLHL38 e PIK3IP1 foram considerados parte deste grupo, sendo os dois últimos reprimidos, enquanto todos os outros apresentaram indução de expressão com o tratamento.

A proteína apelina, codificada pelo gene APLN, é um ligante endógeno para a proteína G, que é expressa na superfície de várias células (Huang da, Sherman et al. 2009). Esta proteína parece ter uma espécie de múltiplas funções fisiológicas,

incluindo regulação da homeostase de fluidos corporais, ingestão de alimentos, proliferação celular, pressão sanguínea e angiogênese (O'Carroll, Lolait et al. 2013). Além disso, DUSP5, um gene que codifica a fosfatase 5 de dupla especificidade, interage com via da superfamília das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), regulando a hipertrofia dos cardiomiócitos (Ferguson, Harrison et al. 2013). Embora a sua importância na hipertrofia do músculo cardíaco tenha sido sugerida (Ferguson, Harrison et al. 2013), seu papel no trofismo do músculo esquelético ainda não está bem definido. No presente estudo, o gene DUSP5 mostrou um aumento de 3,4 vezes nos níveis de expressão de C3pt24 em relação ao C3, indicando que sua interação específica com a via MAPK sob administração do PT seria benéfica na reversão de perda de massa muscular esquelética com a depleção androgênica.

Como mencionado, o IGF-1 é um fator de crescimento de insulina que pode ser bloqueado pelo IGFBP3 em vários tecidos. Como observado, os níveis de IGFBP3 é completamente reprimido no grupo C3pt24, então é razoável dizer que IGF-1 teve sua expressão induzida no grupo C3pt24 uma vez que ela é liberada de sua ligação com o receptor. Mais uma vez, os resultados se mostram conectados e demonstram a viabilidade do modelo.

Já o gene PI15, que codifica o inibidor de peptidase 15 foi a proteína que demonstrou os níveis mais altos de regulação positiva entre os genes identificados como genes associados à reversão da atrofia (6,28 x). PI15 é o gene que codifica um inibidor de tripsina que foi previamente purificado do meio de cultura de células de glioblastoma humano (Yamakawa, Miyata et al. 1998) e não tem função específica identificada no músculo esquelético, até o momento. Por fim, a leucemia megacarioblástica 1 (MKL1) é um fator de transcrição com papéis importantes no sistema cardiovascular (Olson and Nordheim 2010). O aumento da importação

nuclear dessa proteína, simultaneamente com a diminuição da sua exportação, causa o acúmulo de MKL1 no núcleo, onde ele ativa o fator de resposta sérica (SRF) para ativar os genes que regulam a mobilidade celular e a contratilidade, interagindo com o rearranjo de actina (Ho, Jaalouk et al. 2013). O aumento de 2,2 vezes na expressão do gene MKL1 apenas no grupo C3pt24 reforça a ideia de que os genes associados à reversão da atrofia seriam expressos sob o comando de reorganização da expressão dos atrogenes.

Não houve diferença na expressão do gene PIK3IP1 e KLHL38 entre os grupos C3 e Sham. No entanto, quando os ratos castrados foram submetidos ao tratamento com PT, estes genes foram significativamente reprimidos. He e colaboradores em 2008 (He, Zhu et al. 2008) identificaram a Proteína 1 de interação da Fosfatidilinositol 3 quinase (PIK3IP1) suprimindo a atividade da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), enquanto que a atividade de PI3K aumenta quando os níveis de PIK3IP1 são reduzidos experimentalmente. De fato, a PI3K regula importantes processos celulares, como proliferação, crescimento, sobrevivência, motilidade e metabolismo. Ela se liga a Akt, (proteína quinase B) e outras moléculas de transdução de sinal para a membrana, uma associação que desencadeia respostas celulares típicas dependentes de PI3K, como a hipertrofia (Engelman, Luo et al. 2006). No entanto, as consequências do PIK3IP1 na sinalização PI3K *in vivo* permanecem desconhecidas (Zhu, He et al. 2007), o que o torna um possível alvo de futuras investigações sobre o campo muscular esquelético. O gene KLHL38 codifica a 38ª proteína identificada membro da família Kelch. No músculo esquelético, esse grupo de proteínas possui poucas funções identificadas até agora. Elas parecem ter algum tipo de interação com E3 ligases *in vitro*, porém mais investigações são necessárias.

Em conjunto, os resultados apresentados abrem caminhos para a possibilidade da existência de um grupo de genes que são capazes de responder positivamente apenas sob estímulo relacionado ao tratamento de recuperação da atrofia, possibilitando uma nova via terapêutica no campo das síndromes relacionadas à atrofia. Além disso, também traz à luz um caminho em potencial no tratamento da atrofia ocasionada por doenças relacionadas com disfunção do proteassoma, como a distrofia miotônica do tipo 2 (Timchenko 2013).

Entre os genes com um papel em potencial para investigações na reversão da atrofia, APLN, o DUSP5, o IGF-1, o MKL1 e PI15 merecem uma investigação mais aprofundada. Em longo prazo, esses resultados podem ter relevância clínica em reverter ou atenuar a atrofia causada pela privação androgênica, um processo muito comum associado à castração farmacológica no tratamento do câncer de próstata. De fato, a castração remove andrógenos e muitas outras substâncias, como as produzidas pelas células de Sertoli, que incluem transferrina, fatores de crescimento transformadores α e β (TGF α , TGF β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e os hormônios inibina B e hormônio anti-Mülleriano (AMH) (Iliadou, Tsametis et al. 2015). No entanto, a reposição de propionato de testosterona por 15 dias é capaz de reverter completamente a atrofia do músculo EA induzida pela castração (Godinho, Lima-Landman et al. 1987), indicando que a privação de testosterona é a principal causa de atrofia induzida por gonadectomia.

Os genes alvos também foram avaliados por RT-PCR com amostras do músculo gastrocnêmio no modelo murino de jejum. No total, 13 alvos foram testados, entre eles os atrogenes FBXO32, FOXO3, AMD1, CCK, HOPX, IGFBP3, ODC1 e PGF. E os genes associados à reversão APLN, DUSP5, IGF1, KLHL38 e PI15.

Como esperado, o atrogene clássico FBXO32 teve seu aumento característico de expressão do RNAm no grupo jejum, bem como o fator de transcrição FOXO3, mostrando a eficiência da imposição do estímulo atrófico nos animais. Todos os genes pertencentes ao grupo dos atrogenes foram validados, reforçando a hipótese inicial de que esses resultados poderiam ser generalizados para outros músculos esqueléticos. IGFBP3 manteve sua indução de expressão no grupo jejum em relação ao controle, enquanto os demais tiveram sua expressão reprimida no grupo jejum. METTL7a, CTGF, RPS6Ka5 e CXCL14 ainda não foram testados nesse modelo pois os seus *primers* são específicos para ratos e suas sequências de bases não amplificavam em amostras de camundongos. Também foram testados cinco genes do grupo dos associados à reversão da atrofia: IGF-1, APLN, PI15, DUSP5 e KLHL38.

Observou-se que no modelo murino de atrofia os níveis de IGF-1 decaem no grupo jejum, de maneira contrária ao observado no grupo C3 do modelo de privação. Como IGF-1 e a insulina atuam através da via PI3K/Akt/mTOR, isso explica seus baixos níveis no grupo jejum, pois condições de mal nutrição estão associados com baixos níveis de RNAm de IGF-1 em músculos (Clemmons 2009) já que ele é responsável por controlar o crescimento e metabolismo. Este resultado também corrobora com o aumento observado de 3,14 vezes na expressão de IGFBP3 no grupo jejum. Como descrito previamente, IGFBP3 pode bloquear IGF-1 em vários tecidos. No entanto, outros diversos modelos de atrofia não demonstraram alterar os níveis de IGF-1, como descrito por Lecker (Lecker, Jagoe et al. 2004). Por isso, ainda nos leva a acreditar que IGF-1 possa compor o grupo dos genes associados à reversão da atrofia.

O gene PI15 teve sua expressão reprimida em 2,35 vezes durante estímulo atrófico no grupo jejum. Na literatura, poucos estudos mostram suas funções, principalmente em músculo esquelético. Como o segundo modelo de atrofia escolhido foi o de privação alimentar, no qual os animais ficaram 48 horas em completa ausência de alimento, podemos atribuir essa diminuição como consequência do período prolongado de jejum. Para a digestão dos alimentos, o pâncreas produz a tripsina, uma serino-protease responsável por hidrolisar proteínas encontradas no sistema digestivo de muitos vertebrados (Rawlings and Barrett 1994). Porém, também é necessária a liberação de inibidores de tripsina para prevenir a ação da enzima no próprio pâncreas. Entende-se que essa discreta diminuição da expressão de PI15 possa ser devido às características do modelo utilizado. Portanto, a investigação deste gene em modelos diferentes se faz necessário.

Assim como PI15, o gene APLN também respondeu à atrofia reprimindo sua expressão em 12,8 vezes no grupo jejum. Este hormônio peptídeo foi recentemente demonstrado evidências de estar associada à resistência à insulina. A apelina tem sua expressão induzida pela insulina (Boucher, Masri et al. 2005, Glassford, Yue et al. 2007) e inibe a secreção pancreática de insulina (Sorhede Winzell, Magnusson et al. 2005). Em estudos clínicos, os níveis de apelina estão aumentados em casos de obesidade (Boucher, Masri et al. 2005, Heinonen, Purhonen et al. 2005) e de resistência à insulina (Li, Yang et al. 2006); além disso, a redução do peso corporal resulta em um declínio simultâneo na expressão de apelina (Castan-Laurell, Vitkova et al. 2008). Diante das evidências, acredita-se que esse declínio na expressão de APLN no grupo jejum seja devido à característica do modelo utilizado e, assim como PI15, se faz necessário sua investigação em outros modelos distintos de atrofia.

Entretanto, os genes DUSP5 e KLHL38 tiveram seus níveis de expressão durante a atrofia no grupo jejum de maneira semelhante ao modelo de privação androgênica, mantendo seus níveis iguais aos animais do grupo Controle/Sham.

Para a validação dos resultados obtidos por RT-PCR e pelo *array* de fosfoquinases com a técnica de Western *blotting* foram enfrentados vários percalços. O primeiro e principal problema que tomou grande parte do tempo foi a qualidade de extração das amostras de proteínas totais dos músculos EA dos animais de todos os grupos. Durante muito tempo foram feitas alterações nos passos de extração, nos tampões utilizados, nos parâmetros de corrida dos géis, até que recentemente chegou-se ao protocolo ideal de extração de proteínas musculares.

Logo após, com as membranas ideais, passou-se a ter problemas de detecção das proteínas alvos com os anticorpos incubados. Seja por falta de quantidade da proteína alvo contida na amostra do extrato total de proteínas ou pelo baixo poder de detecção/qualidade do anticorpo disponível. As membranas de amostras musculares coradas com *Ponceau* estão disponíveis no Apêndice C.

Para a realização do ensaio do *array* de quinases foi escolhido o grupo de 8 horas com PT. Isto se deve ao fato de que o número de genes diferencialmente expressos nesse período foi muito menor que no período de tratamento com 24h, no qual 241 genes responderam ao tratamento contra somente um único gene (*Amd1*) no tratamento de 8 horas. Dado que o processo de fosforilação de proteínas por quinases ocorre de maneira mais rápida do que a expressão gênica, optou-se por avaliar a resposta das fosfoquinases no grupo de animais com menor tempo de tratamento com PT desse estudo.

As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP (em raros casos), para

resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser) (GRIFFIN 1992). Elas compõem a maior família de proteínas nos seres eucariontes e são componentes fundamentais da cascata de “comunicação” que ocorre no controle intracelular, na regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais das proteínas até ao controle transcricional. Adicionar e remover grupos fosfato são mecanismos fisiológicos importantes na regulação de proteínas intracelulares, as quais podem ser enzimas, receptores ou segundos mensageiros. Uma série de respostas celulares mediadas por receptores e vias metabólicas podem ser ativadas e desativadas pelas quinases ou fosfatases (enzimas que removem grupos fosfato) intracelulares. As quinases e as fosfatases, por sua vez, são reguladas por sinais bioquímicos extrínsecos, tais como hormônios e fatores de crescimento. As quinases celulares são divididas entre as que fosforilam proteínas em resíduos Tyr (tirosina-quinases) e as que fosforilam proteínas em resíduos Ser e Thr (serina/treonina-quinases) (DEVLIN 1992, GRIFFIN 1992).

Dentre os resultados observados, o aumento do perfil de fosforilação de AKT 1/2/3 é esperado com a administração de PT para reversão/atenuação da atrofia, já que essa quinase está intrinsecamente envolvida nas vias de hipertrofia. Porém, mTOR aparentemente teve seu perfil de fosforilação diminuído, já a quinase PRAS40 teve sua fosforilação aumentada. PRAS40 faz a regulação inibitória de mTORC1, e inibindo a ligação de 4E-BP1 de se ligar a raptor inibindo sua atividade de quinase (Wang, Harris et al. 2007). Porém, Akt pode diretamente fosforilar e inativar PRAS40.

Como mTOR fosforila *downstream* alvos como 4E-BP1 e p70S6k, novamente isto explica os altos níveis de fosforilação encontrados de p70S6k.

A quinase HSP60 também teve um grande aumento do seu perfil de fosforilação. Essa proteína de choque térmico 60 (HSP60), ativada sob condições de estresse, é uma das principais chaperonas nas mitocôndrias que auxiliam no dobramento de proteínas, transporte e degradação para manter a homeostase proteica mitocondrial (Bukau and Horwich 1998, Fersht and Daggett 2002, White, Gianni et al. 2005, Lianos, Alexiou et al. 2015). Estudos mostram a correlação entre HSP60 e adaptações do músculo esquelético, em modelos de exercício em roedores, indicando que o aumento na sua expressão em camundongos facilita a importação de proteínas e de seu dobramento, induzindo a biogênese mitocondrial (Hood, Takahashi et al. 2000).

STAT3 é um fator de transcrição que faz o intermédio da sinalização de várias citocinas, sendo especialmente relevante para a sinalização de IL-6 e outras citocinas da mesma família, incluindo IL-10, IL-11 ou fator inibidor de leucemia (FIL) (Yu, Lee et al. 2014, Nakamura, Sene et al. 2015). Entre as suas mudanças pós-transcricionais podemos citar a fosforilação de STAT3 na serina de posição 727, que aumenta sua atividade transcricional, e mTOR e várias MAPKs podem fosforilar este sítio (Yu, Lee et al. 2014, You, Wang et al. 2015). Quando é fosforilada na tirosina de posição 705, induz sua dimerização e translocação para o núcleo onde regula transcrição de genes (Yu, Lee et al. 2014, You, Wang et al. 2015).

Vários estudos demonstraram que STAT3 é um regulador importante da massa e metabolismo do músculo esquelético. Porém, a ativação de STAT3 tem sido diretamente relacionada à perda de massa muscular em vários modelos murinos de perda de massa muscular, como diabetes, doença renal crônica (DRC) e caquexia por câncer (Zhang, Pan et al. 2013, Gilabert, Calvo et al. 2014, Pretto, Ghilardi et al. 2015, Silva, Dong et al. 2015). Isto pode explicar os resultados obtidos com o *array*,

onde os níveis de fosforilação de STAT3 ainda estão aumentados em 8 horas, provavelmente pelo curto tempo de tratamento.

Estudos funcionais adicionais ainda são necessários para investigar se as proteínas codificadas pelos atrogenes são essenciais para a recuperação em massa do músculo esquelético. Observar o perfil de resposta desses genes no grupo Sham na sua posterior inclusão em novas lâminas de *microarray*, também auxiliará na melhor detecção dos atrogenes possibilitando detectar seus níveis basais antes das intervenções de castração e tratamento. Também, que a validação das técnicas de RT-PCR e *array* de quinases apresentadas no trabalho sejam feitas demonstrando as proteínas-alvo a níveis detectáveis por Western *blotting*.

A busca por genes relacionados à atrofia é um nicho promissor, que pode render bons resultados em longo prazo no campo clínico.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

No desenvolvimento do trabalho apresentado, durante as validações dos alvos por RT-PCR, nos deparamos com um grupo de genes cujo perfil de expressão nos levou a caracterizar um novo grupo de genes, aqui chamados de anti-atrogenes, devido ao seu perfil de expressão. Essa descoberta de importante relevância nos permite especular sobre um grupo de genes que teriam função, com expressão diferencialmente regulada, somente na reversão do quadro de atrofia, não exatamente um estado de hipertrofia.

A observação de padrão de resposta semelhante em modelo diferente de atrofia, por privação alimentar, demonstram como nossos dados estão em consonância entre eles e a literatura.

Nossos dados nos levaram a hipótese da existência de um novo grupo de genes, com perfil de expressão associados à reversão da atrofia. Isto nos abriu novas possibilidades para investigar outros genes pertencentes a esse grupo.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- Achen, M. G., J. M. Gad, S. A. Stacker and A. F. Wilks (1997). "Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development." *Growth Factors* **15**(1): 69-80.
- Adams, V., H. Jiang, J. Yu, S. Mobius-Winkler, E. Fiehn, A. Linke, C. Weigl, G. Schuler and R. Hambrecht (1999). "Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance." *J Am Coll Cardiol* **33**(4): 959-965.
- Aggeli, I. K., C. Gaitanaki and I. Beis (2006). "Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells." *Cell Signal* **18**(10): 1801-1812.
- Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier and J. S. Flier (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." *Nature* **382**(6588): 250-252.
- Allbrook, D. (1981). *Skeletal muscle regeneration, Muscle Nerve* **4**.
- Allen, D. L., A. S. Cleary, S. F. Lindsay, A. S. Loh and J. M. Reed (2010). "Myostatin expression is increased by food deprivation in a muscle-specific manner and contributes to muscle atrophy during prolonged food deprivation in mice." *J Appl Physiol* (1985) **109**(3): 692-701.
- Allen, D. L., J. K. Linderman, R. R. Roy, A. J. Bigbee, R. E. Grindeland, V. Mukku and V. R. Edgerton (1997). "Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting." *Am J Physiol* **273**(2 Pt 1): C579-587.
- Astolfi, A., C. De Giovanni, L. Landuzzi, G. Nicoletti, C. Ricci, S. Croci, L. Scopece, P. Nanni and P. L. Lollini (2001). "Identification of new genes related to the myogenic differentiation arrest of human rhabdomyosarcoma cells." *Gene* **274**(1-2): 139-149.
- Aucello, M., G. Dobrowolny and A. Musaro (2009). "Localized accumulation of oxidative stress causes muscle atrophy through activation of an autophagic pathway." *Autophagy* **5**(4): 527-529.
- Bar-Shai, M., E. Carmeli, P. Ljubuncic and A. Z. Reznick (2008). "Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation." *Free Radic Biol Med* **44**(2): 202-214.
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, N. A. Dumont and M. A. Rudnicki (2013). "Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche." *EMBO Rep* **14**(12): 1062-1072.
- Bhasin, S., T. W. Storer, N. Berman, C. Callegari, B. Clevenger, J. Phillips, T. J. Bunnell, R. Tricker, A. Shirazi and R. Casaburi (1996). "The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men." *N Engl J Med* **335**(1): 1-7.
- Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2001). "Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy." *Science* **294**(5547): 1704-1708.
- Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass and G. D. Yancopoulos (2001). "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo." *Nat Cell Biol* **3**(11): 1014-1019.
- Bonaldo, P. and M. Sandri (2013). "Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy." *Dis Model Mech* **6**(1): 25-39.
- Bongers, K. S., D. K. Fox, S. D. Kunkel, L. V. Stebounova, D. J. Murry, M. A. Pufall, S. M. Ebert, M. C. Dyle, S. A. Bullard, J. M. Dierdorff and C. M. Adams (2015). "Spermine oxidase maintains basal skeletal muscle gene expression and fiber size and is strongly repressed by conditions that cause skeletal muscle atrophy." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**(2): E144-158.
- Borisov, A. B. and B. M. Carlson (2000). "Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis." *Anat Rec* **258**(3): 305-318.

- Boucher, J., B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigne, A. Mazzucotelli, I. Castan-Laurell, I. Tack, B. Knibiehler, C. Carpenne, Y. Audigier, J. S. Saulnier-Blache and P. Valet (2005). "Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity." *Endocrinology* **146**(4): 1764-1771.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braga, M., S. Bhasin, R. Jasuja, S. Pervin and R. Singh (2012). "Testosterone inhibits transforming growth factor-beta signaling during myogenic differentiation and proliferation of mouse satellite cells: potential role of follistatin in mediating testosterone action." *Mol Cell Endocrinol* **350**(1): 39-52.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." *Cell* **92**(3): 351-366.
- Buresova, M., E. Gutmann and V. Hanzlikova (1972). "Differential effects of castration and denervation on protein synthesis in the levator ani muscle of the rat." *J Endocrinol* **54**(1): 3-14.
- Cai, D., J. D. Frantz, N. E. Tawa, Jr., P. A. Melendez, B. C. Oh, H. G. Lidov, P. O. Hasselgren, W. R. Frontera, J. Lee, D. J. Glass and S. E. Shoelson (2004). "IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice." *Cell* **119**(2): 285-298.
- Castan-Laurell, I., M. Vitkova, D. Daviaud, C. Dray, M. Kovacikova, Z. Kovacova, J. Hejnova, V. Stich and P. Valet (2008). "Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ." *Eur J Endocrinol* **158**(6): 905-910.
- Champy, M. F., M. Selloum, L. Piard, V. Zeitler, C. Caradec, P. Chambon and J. Auwerx (2004). "Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions." *Mamm Genome* **15**(10): 768-783.
- Cheek, D. B. (1985). "The control of cell mass and replication. The DNA unit--a personal 20-year study." *Early Hum Dev* **12**(3): 211-239.
- Chen, C. D., D. S. Welsbie, C. Tran, S. H. Baek, R. Chen, R. Vessella, M. G. Rosenfeld and C. L. Sawyers (2004). "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy." *Nat Med* **10**(1): 33-39.
- Childs, A. C., D. J. Mehta and E. W. Gerner (2003). "Polyamine-dependent gene expression." *Cell Mol Life Sci* **60**(7): 1394-1406.
- Clark, A. S. and L. P. Henderson (2003). "Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids." *Neurosci Biobehav Rev* **27**(5): 413-436.
- Clemmons, D. R. (2009). "Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance." *Trends Endocrinol Metab* **20**(7): 349-356.
- Cleveland, W. S. D., Susan J. (1988). "Locally-Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting." *Journal of the American Statistical Association*. **83** (403): 596-610.
- Collins, C. A., P. S. Zammit, A. P. Ruiz, J. E. Morgan and T. A. Partridge (2007). "A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging." *Stem Cells* **25**(4): 885-894.
- Cruz-Jentoft, A. J., J. P. Baeyens, J. M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F. C. Martin, J. P. Michel, Y. Rolland, S. M. Schneider, E. Topinkova, M. Vandewoude, M. Zamboni and P. European Working Group on Sarcopenia in Older (2010). "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People." *Age Ageing* **39**(4): 412-423.
- Dalbo, V. J., M. D. Roberts, C. B. Mobley, C. Ballmann, W. C. Kephart, C. D. Fox, V. A. Santucci, C. F. Conover, L. A. Beggs, A. Balazs, F. J. Hoerr, J. F. Yarrow, S. E. Borst and D. T. Beck (2017). "Testosterone and trenbolone enanthate increase mature myostatin protein expression despite increasing skeletal muscle hypertrophy and satellite cell number in rodent muscle." *Andrologia* **49**(3).
- Daniel, P. M. (1977). "The metabolic homeostatic role of muscle and its function as a store of protein." *Lancet* **2**(8035): 446-448.

- Deak, M., A. D. Clifton, L. M. Lucocq and D. R. Alessi (1998). "Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB." *EMBO J* **17**(15): 4426-4441.
- Del Rizzo, P. A. and R. C. Trievel (2011). "Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases." *Epigenetics* **6**(9): 1059-1067.
- Derynck, R., Y. Zhang and X. H. Feng (1998). "Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses." *Cell* **95**(6): 737-740.
- DEVLIN, T. M. (1992). *Textbook of biochemistry with clinical correlations*, Wiley-Liss.
- Dirks-Naylor, A. J. and S. Lennon-Edwards (2011). "Cellular and molecular mechanisms of apoptosis in age-related muscle atrophy." *Curr Aging Sci* **4**(3): 269-278.
- Dobrowolny, G., M. Aucello, E. Rizzuto, S. Beccafico, C. Mammucari, S. Boncompagni, S. Belia, F. Wannenes, C. Nicoletti, Z. Del Prete, N. Rosenthal, M. Molinaro, F. Protasi, G. Fano, M. Sandri and A. Musaro (2008). "Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity." *Cell Metab* **8**(5): 425-436.
- Dupont-Versteegden, E. E., R. J. Murphy, J. D. Houle, C. M. Gurley and C. A. Peterson (1999). "Activated satellite cells fail to restore myonuclear number in spinal cord transected and exercised rats." *Am J Physiol* **277**(3): C589-597.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Engelman, J. A., J. Luo and L. C. Cantley (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." *Nat Rev Genet* **7**(8): 606-619.
- Fanzani, A., V. M. Conraads, F. Penna and W. Martinet (2012). "Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update." *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **3**(3): 163-179.
- Ferguson, B. S., B. C. Harrison, M. Y. Jeong, B. G. Reid, M. F. Wempe, F. F. Wagner, E. B. Holson and T. A. McKinsey (2013). "Signal-dependent repression of DUSP5 by class I HDACs controls nuclear ERK activity and cardiomyocyte hypertrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(24): 9806-9811.
- Ferrando, A. A., M. Sheffield-Moore, C. W. Yeckel, C. Gilkison, J. Jiang, A. Achacosa, S. A. Lieberman, K. Tipton, R. R. Wolfe and R. J. Urban (2002). "Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(3): E601-607.
- Fersht, A. R. and V. Daggett (2002). "Protein folding and unfolding at atomic resolution." *Cell* **108**(4): 573-582.
- Gavrilova, O., L. R. Leon, B. Marcus-Samuels, M. M. Mason, A. L. Castle, S. Refetoff, C. Vinson and M. L. Reitman (1999). "Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14623-14628.
- Giannoulis, M. G., N. Jackson, F. Shojaaee-Moradie, K. S. Nair, P. H. Sonksen, F. C. Martin and A. M. Umpleby (2008). "The effects of growth hormone and/or testosterone on whole body protein kinetics and skeletal muscle gene expression in healthy elderly men: a randomized controlled trial." *J Clin Endocrinol Metab* **93**(8): 3066-3074.
- Gilbert, M., E. Calvo, A. Airoidi, T. Hamidi, V. Moutardier, O. Turrini and J. Iovanna (2014). "Pancreatic cancer-induced cachexia is Jak2-dependent in mice." *J Cell Physiol* **229**(10): 1437-1443.
- Glass, D. J. (2005). "Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(10): 1974-1984.
- Glass, D. J. (2010). "PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy." *Curr Top Microbiol Immunol* **346**: 267-278.
- Glassford, A. J., P. Yue, A. Y. Sheikh, H. J. Chun, S. Zarafshar, D. A. Chan, G. M. Reaven, T. Quertermous and P. S. Tsao (2007). "HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(6): E1590-1596.
- Gobinet, J., N. Poujol and C. Sultan (2002). "Molecular action of androgens." *Mol Cell Endocrinol* **198**(1-2): 15-24.

- Godinho, R. O., M. T. Lima-Landman, C. Souccar and A. J. Lapa (1987). "Trophic control of cholinesterase activity in a testosterone-dependent muscle of the rat. II. Effects of testosterone administration." *Exp Neurol* **98**(1): 93-102.
- Gomes, M. D., S. H. Lecker, R. T. Jagoe, A. Navon and A. L. Goldberg (2001). "Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14440-14445.
- GRIFFIN, J. E. O. S. R. (1992). *Textbook of endocrine physiology.*, Oxford University Press, New York.
- Hallows, W. C., W. Yu, B. C. Smith, M. K. Devries, J. J. Ellinger, S. Someya, M. R. Shortreed, T. Prolla, J. L. Markley, L. M. Smith, S. Zhao, K. L. Guan and J. M. Denu (2011). "Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction." *Mol Cell* **41**(2): 139-149.
- Hamamoto, R., V. Saloura and Y. Nakamura (2015). "Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis." *Nat Rev Cancer* **15**(2): 110-124.
- Hasselgren, P. O. (1999). "Glucocorticoids and muscle catabolism." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2**(3): 201-205.
- He, X., Z. Zhu, C. Johnson, J. Stoops, A. E. Eaker, W. Bowen and M. C. DeFrances (2008). "PIK3IP1, a negative regulator of PI3K, suppresses the development of hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **68**(14): 5591-5598.
- Heinonen, M. V., A. K. Purhonen, P. Miettinen, M. Paakkonen, E. Pirinen, E. Alhava, K. Akerman and K. H. Herzig (2005). "Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding." *Regul Pept* **130**(1-2): 7-13.
- Ho, C. Y., D. E. Jaalouk, M. K. Vartiainen and J. Lammerding (2013). "Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics." *Nature* **497**(7450): 507-511.
- Hood, D. A., M. Takahashi, M. K. Connor and D. Freyssenet (2000). "Assembly of the cellular powerhouse: current issues in muscle mitochondrial biogenesis." *Exerc Sport Sci Rev* **28**(2): 68-73.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." *Nat Protoc* **4**(1): 44-57.
- Huang, J., Y. H. Hsu, C. Mo, E. Abreu, D. P. Kiel, L. F. Bonewald, M. Brotto and D. Karasik (2014). "METTL21C is a potential pleiotropic gene for osteoporosis and sarcopenia acting through the modulation of the NF-kappaB signaling pathway." *J Bone Miner Res* **29**(7): 1531-1540.
- Hughes, I. A., H. N. Lim, H. Martin, N. P. Mongan, L. Dovey, S. F. Ahmed and J. R. Hawkins (2001). "Developmental aspects of androgen action." *Mol Cell Endocrinol* **185**(1-2): 33-41.
- Hunter, R. B., E. Stevenson, A. Koncarevic, H. Mitchell-Felton, D. A. Essig and S. C. Kandarian (2002). "Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy." *FASEB J* **16**(6): 529-538.
- Iliadou, P. K., C. Tsametis, A. Kaprara, I. Papadimas and D. G. Goulis (2015). "The Sertoli cell: Novel clinical potentiality." *Hormones (Athens)* **14**(4): 504-514.
- Izumiya, Y., T. Hopkins, C. Morris, K. Sato, L. Zeng, J. Viereck, J. A. Hamilton, N. Ouchi, N. K. LeBrasseur and K. Walsh (2008). "Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice." *Cell Metab* **7**(2): 159-172.
- Jagoe, R. T., S. H. Lecker, M. Gomes and A. L. Goldberg (2002). "Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation." *FASEB J* **16**(13): 1697-1712.
- Judge, A. R., A. Koncarevic, R. B. Hunter, H. C. Liou, R. W. Jackman and S. C. Kandarian (2007). "Role for IkkappaAlpha, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(1): C372-382.
- Kaminska, A. M., L. Z. Stern and D. H. Russell (1982). "Polyamine metabolism in muscle: differential response to tenotomy and denervation in the soleus and gastrocnemius muscle of adult rats." *Exp Neurol* **78**(2): 331-339.

- Kang, Z., O. A. Janne and J. J. Palvimo (2004). "Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor." *Mol Endocrinol* **18**(11): 2633-2648.
- Kee, H. J., J. R. Kim, K. I. Nam, H. Y. Park, S. Shin, J. C. Kim, Y. Shimono, M. Takahashi, M. H. Jeong, N. Kim, K. K. Kim and H. Kook (2007). "Enhancer of polycomb1, a novel homeodomain only protein-binding partner, induces skeletal muscle differentiation." *J Biol Chem* **282**(10): 7700-7709.
- Kefaloyianni, E., C. Gaitanaki and I. Beis (2006). "ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts." *Cell Signal* **18**(12): 2238-2251.
- Kim, J. R., H. J. Kee, J. Y. Kim, H. Joung, K. I. Nam, G. H. Eom, N. Choe, H. S. Kim, J. C. Kim, H. Kook, S. B. Seo and H. Kook (2009). "Enhancer of polycomb1 acts on serum response factor to regulate skeletal muscle differentiation." *J Biol Chem* **284**(24): 16308-16316.
- Kivela, R., H. Kyrolainen, H. Selanne, P. V. Komi, H. Kainulainen and V. Vihko (2007). "A single bout of exercise with high mechanical loading induces the expression of Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 in human skeletal muscle." *J Appl Physiol* (1985) **103**(4): 1395-1401.
- Koryakina, Y., H. Q. Ta and D. Gioeli (2014). "Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences." *Endocr Relat Cancer* **21**(4): T131-145.
- Kubota, S. and M. Takigawa (2015). "Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions." *Clin Sci (Lond)* **128**(3): 181-196.
- Lang, T., T. Streeper, P. Cawthon, K. Baldwin, D. R. Taaffe and T. B. Harris (2010). "Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment." *Osteoporos Int* **21**(4): 543-559.
- Leask, A., S. K. Parapuram, X. Shi-Wen and D. J. Abraham (2009). "Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease?" *J Cell Commun Signal* **3**(2): 89-94.
- Lecker, S. H., A. L. Goldberg and W. E. Mitch (2006). "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J Am Soc Nephrol* **17**(7): 1807-1819.
- Lecker, S. H., R. T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S. R. Price, W. E. Mitch and A. L. Goldberg (2004). "Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression." *FASEB J* **18**(1): 39-51.
- Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch and A. L. Goldberg (1999). "Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J Nutr* **129**(1S Suppl): 227S-237S.
- Lee, D. and A. Goldberg (2011). "Atrogin1/MAFbx: what atrophy, hypertrophy, and cardiac failure have in common." *Circ Res* **109**(2): 123-126.
- Lee, N. K. and H. E. MacLean (2011). "Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy." *J Cell Physiol* **226**(6): 1453-1460.
- Lee, R. C., Z. Wang, M. Heo, R. Ross, I. Janssen and S. B. Heymsfield (2000). "Total-body skeletal muscle mass: development and cross-validation of anthropometric prediction models." *Am J Clin Nutr* **72**(3): 796-803.
- Lee, S. J. and A. C. McPherron (2001). "Regulation of myostatin activity and muscle growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9306-9311.
- Lemeer, S., A. M. Gholami, Z. Wu and B. Kuster (2015). "Quantitative proteome profiling of human myoma and myometrium tissue reveals kinase expression signatures with potential for therapeutic intervention." *Proteomics* **15**(2-3): 356-364.
- Li, L., G. Yang, Q. Li, Y. Tang, M. Yang, H. Yang and K. Li (2006). "Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **114**(10): 544-548.
- Lianos, G. D., G. A. Alexiou, A. Mangano, A. Mangano, S. Rausei, L. Boni, G. Dionigi and D. H. Roukos (2015). "The role of heat shock proteins in cancer." *Cancer Lett* **360**(2): 114-118.
- Little, T. J., M. Horowitz and C. Feinle-Bisset (2005). "Role of cholecystikinin in appetite control and body weight regulation." *Obes Rev* **6**(4): 297-306.

- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lu, N. Z., S. E. Wardell, K. L. Burnstein, D. Defranco, P. J. Fuller, V. Giguere, R. B. Hochberg, L. McKay, J. M. Renoir, N. L. Weigel, E. M. Wilson, D. P. McDonnell and J. A. Cidlowski (2006). "International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors." *Pharmacol Rev* **58**(4): 782-797.
- Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi and M. G. Persico (1991). "Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(20): 9267-9271.
- Magnusson, C., A. Svensson, U. Christerson and S. Tagerud (2005). "Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle." *Eur J Neurosci* **21**(2): 577-580.
- Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A. L. Goldberg, S. Schiaffino and M. Sandri (2007). "FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo." *Cell Metab* **6**(6): 458-471.
- Martin-Magniette, M. L., J. Aubert, E. Cabannes and J. J. Daudin (2005). "Evaluation of the gene-specific dye bias in cDNA microarray experiments." *Bioinformatics* **21**(9): 1995-2000.
- Marton, L. J. and A. E. Pegg (1995). "Polyamines as targets for therapeutic intervention." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**: 55-91.
- Mayer, M. and F. Rosen (1977). "Interaction of glucocorticoids and androgens with skeletal muscle." *Metabolism* **26**(8): 937-962.
- McCroskery, S., M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma and R. Kambadur (2003). "Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal." *J Cell Biol* **162**(6): 1135-1147.
- Mendler, L., Z. Baka, A. Kovacs-Simon and L. Dux (2007). "Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **361**(1): 237-242.
- Mitch, W. E. and A. L. Goldberg (1996). "Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway." *N Engl J Med* **335**(25): 1897-1905.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2004). "In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker." *Mol Biol Cell* **15**(3): 1101-1111.
- Mlekusch, W., B. Paletta, W. Truppe, E. Paschke and R. Grimus (1981). "Plasma concentrations of glucose, corticosterone, glucagon and insulin and liver content of metabolic substrates and enzymes during starvation and additional hypoxia in the rat." *Horm Metab Res* **13**(11): 612-614.
- Mooradian, A. D., J. E. Morley and S. G. Korenman (1987). "Biological actions of androgens." *Endocr Rev* **8**(1): 1-28.
- Mourkioti, F., P. Kratsios, T. Luedde, Y. H. Song, P. Delafontaine, R. Adami, V. Parente, R. Bottinelli, M. Pasparakis and N. Rosenthal (2006). "Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration." *J Clin Invest* **116**(11): 2945-2954.
- Musaro, A., K. McCullagh, A. Paul, L. Houghton, G. Dobrowolny, M. Molinaro, E. R. Barton, H. L. Sweeney and N. Rosenthal (2001). "Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle." *Nat Genet* **27**(2): 195-200.
- Nakamura, R., A. Sene, A. Santeford, A. Gdoura, S. Kubota, N. Zapata and R. S. Apte (2015). "IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis." *Nat Commun* **6**: 7847.
- Nathans, D. (1964). "Puromycin Inhibition of Protein Synthesis: Incorporation of Puromycin into Peptide Chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 585-592.
- O'Carroll, A. M., S. J. Lolait, L. E. Harris and G. R. Pope (2013). "The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis." *J Endocrinol* **219**(1): R13-35.

- Olguin, H. C., Z. Yang, S. J. Tapscott and B. B. Olwin (2007). "Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination." *J Cell Biol* **177**(5): 769-779.
- Olson, E. N. and A. Nordheim (2010). "Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(5): 353-365.
- Orngreen, M. C., M. Zacho, A. Hebert, M. Laub and J. Vissing (2003). "Patients with severe muscle wasting are prone to develop hypoglycemia during fasting." *Neurology* **61**(7): 997-1000.
- Pallafacchina, G., E. Calabria, A. L. Serrano, J. M. Kalhovde and S. Schiaffino (2002). "A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9213-9218.
- Park, J. E., H. H. Chen, J. Winer, K. A. Houck and N. Ferrara (1994). "Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR." *J Biol Chem* **269**(41): 25646-25654.
- Pires-Oliveira, M., A. L. Maragno, L. T. Parreiras-e-Silva, T. Chiavegatti, M. D. Gomes and R. O. Godinho (2010). "Testosterone represses ubiquitin ligases atrogen-1 and Murf-1 expression in an androgen-sensitive rat skeletal muscle in vivo." *J Appl Physiol* (1985) **108**(2): 266-273.
- Podhorska-Okolow, M., M. Sandri, S. Zampieri, B. Brun, K. Rossini and U. Carraro (1998). "Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse." *Neuropathol Appl Neurobiol* **24**(6): 518-531.
- Pretto, F., C. Ghilardi, M. Moschetta, A. Bassi, A. Rovida, V. Scarlato, L. Talamini, F. Fiordaliso, C. Bisighini, G. Damia, M. R. Bani, R. Piccirillo and R. Giavazzi (2015). "Sunitinib prevents cachexia and prolongs survival of mice bearing renal cancer by restraining STAT3 and MuRF-1 activation in muscle." *Oncotarget* **6**(5): 3043-3054.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett (1994). "Families of serine peptidases." *Methods Enzymol* **244**: 19-61.
- Rebbapragada, A., H. Benchabane, J. L. Wrana, A. J. Celeste and L. Attisano (2003). "Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis." *Mol Cell Biol* **23**(20): 7230-7242.
- Remels, A. H., H. R. Gosker, P. Schrauwen, P. P. Hommelberg, P. Sliwinski, M. Polkey, J. Galdiz, E. F. Wouters, R. C. Langen and A. M. Schols (2010). "TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia?" *FASEB J* **24**(12): 5052-5062.
- Rhoads, M. G., S. C. Kandarian, F. Pacelli, G. B. Doglietto and M. Bossola (2010). "Expression of NF-kappaB and IkappaB proteins in skeletal muscle of gastric cancer patients." *Eur J Cancer* **46**(1): 191-197.
- Richard, L. (2002). *Skeletal Muscle – Structure, Function and Plasticity*. Baltimore: Lippincott
- Ritchie, M. E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth (2015). "limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies." *Nucleic Acids Res* **43**(7): e47.
- Rommel, C., S. C. Bodine, B. A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2001). "Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways." *Nat Cell Biol* **3**(11): 1009-1013.
- Rusconi, F., E. Mancinelli, G. Colombo, R. Cardani, L. Da Riva, I. Bongarzone, G. Meola and R. Zippel (2010). "Proteome profile in Myotonic Dystrophy type 2 myotubes reveals dysfunction in protein processing and mitochondrial pathways." *Neurobiol Dis* **38**(2): 273-280.
- Sacheck, J. M., J. P. Hyatt, A. Raffaello, R. T. Jagoe, R. R. Roy, V. R. Edgerton, S. H. Lecker and A. L. Goldberg (2007). "Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases." *FASEB J* **21**(1): 140-155.

- Sambasivan, R., R. Yao, A. Kissenpfennig, L. Van Wittenberghe, A. Paldi, B. Gayraud-Morel, H. Guenou, B. Malissen, S. Tajbakhsh and A. Galy (2011). "Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration." *Development* **138**(17): 3647-3656.
- Sandri, M. (2013). "Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(10): 2121-2129.
- Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker and A. L. Goldberg (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." *Cell* **117**(3): 399-412.
- Sartori, R., G. Milan, M. Patron, C. Mammucari, B. Blaauw, R. Abraham and M. Sandri (2009). "Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(6): C1248-1257.
- Schiaffino, S., K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw and M. Sandri (2013). "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy." *FEBS J* **280**(17): 4294-4314.
- Schiaffino, S. and V. Hanzlikova (1972). "Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system." *J Ultrastruct Res* **39**(1): 1-14.
- Schmidt, E. K., G. Clavarino, M. Ceppi and P. Pierre (2009). "SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis." *Nat Methods* **6**(4): 275-277.
- Shavlakadze, T. and M. Grounds (2006). "Of bears, frogs, meat, mice and men: complexity of factors affecting skeletal muscle mass and fat." *Bioessays* **28**(10): 994-1009.
- Shortreed K., J. A., Hawke T.J (2008). *Satellite cells and muscle repair*. In: *Skeletal muscle damage and repair*, Human Kinetics, Champaign IL:.
- Silva, K. A., J. Dong, Y. Dong, Y. Dong, N. Schor, D. J. Tweardy, L. Zhang and W. E. Mitch (2015). "Inhibition of Stat3 activation suppresses caspase-3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to preservation of muscle mass in cancer cachexia." *J Biol Chem* **290**(17): 11177-11187.
- Singh, R., J. N. Artaza, W. E. Taylor, M. Braga, X. Yuan, N. F. Gonzalez-Cadavid and S. Bhasin (2006). "Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors." *Endocrinology* **147**(1): 141-154.
- Singh, R., S. Bhasin, M. Braga, J. N. Artaza, S. Pervin, W. E. Taylor, V. Krishnan, S. K. Sinha, T. B. Rajavashisth and R. Jasuja (2009). "Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ beta-catenin and follistatin/transforming growth factor-beta signaling pathways." *Endocrinology* **150**(3): 1259-1268.
- Skurk, C., Y. Izumiya, H. Maatz, P. Razeghi, I. Shiojima, M. Sandri, K. Sato, L. Zeng, S. Schiekfer, D. Pimentel, S. Lecker, H. Taegtmeyer, A. L. Goldberg and K. Walsh (2005). "The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling." *J Biol Chem* **280**(21): 20814-20823.
- Sloper, J. C. and T. A. Partridge (1980). "Skeletal muscle: regeneration and transplantation studies." *Br Med Bull* **36**(2): 153-158.
- Smith, H. K., L. Maxwell, J. A. Martyn and J. J. Bass (2000). "Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization." *Cell Tissue Res* **302**(2): 235-241.
- Smyth, G. K. (2005). *Linear Models for Microarray Data*. New York, Springer, New York.
- Sorhede Winzell, M., C. Magnusson and B. Ahren (2005). "The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice." *Regul Pept* **131**(1-3): 12-17.
- Stewart, C. E. and P. Rotwein (1996). "Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors." *Physiol Rev* **76**(4): 1005-1026.
- Stitt, T. N., D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyeva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2004). "The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors." *Mol Cell* **14**(3): 395-403.

- Tews, D. S., H. H. Goebel and H. M. Meinck (1997). "DNA-fragmentation and apoptosis-related proteins of muscle cells in motor neuron disorders." *Acta Neurol Scand* **96**(6): 380-386.
- Thomas, D. R. (2007). "Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia." *Clin Nutr* **26**(4): 389-399.
- Timchenko, L. (2013). "Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(10): 2280-2287.
- Tisdale, M. J. (2010). "Cancer cachexia." *Curr Opin Gastroenterol* **26**(2): 146-151.
- Trendelenburg, A. U., A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama and D. J. Glass (2009). "Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size." *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(6): C1258-1270.
- van der Meer, S. F., R. T. Jaspers, D. A. Jones and H. Degens (2011). "Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle." *Muscle Nerve* **43**(2): 212-222.
- Van Gammeren, D., J. S. Damrauer, R. W. Jackman and S. C. Kandarian (2009). "The I κ B kinases IKK α and IKK β are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy." *FASEB J* **23**(2): 362-370.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- Waldemer-Streyer, R. J., A. Reyes-Ordóñez, D. Kim, R. Zhang, N. Singh and J. Chen (2017). "Cxcl14 depletion accelerates skeletal myogenesis by promoting cell cycle withdrawal." *NPJ Regen Med* **2**.
- Wang, L., T. E. Harris, R. A. Roth and J. C. Lawrence, Jr. (2007). "PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding." *J Biol Chem* **282**(27): 20036-20044.
- White, G. W., S. Gianni, J. G. Grossmann, P. Jemth, A. R. Fersht and V. Daggett (2005). "Simulation and experiment conspire to reveal cryptic intermediates and a slide from the nucleation-condensation to framework mechanism of folding." *J Mol Biol* **350**(4): 757-775.
- Wu, C. L., S. C. Kandarian and R. W. Jackman (2011). "Identification of genes that elicit disuse muscle atrophy via the transcription factors p50 and Bcl-3." *PLoS One* **6**(1): e16171.
- Wysong, A., M. Couch, S. Shadfar, L. Li, J. E. Rodriguez, S. Asher, X. Yin, M. Gore, A. Baldwin, C. Patterson and M. S. Willis (2011). "NF- κ B inhibition protects against tumor-induced cardiac atrophy in vivo." *Am J Pathol* **178**(3): 1059-1068.
- Yamakawa, T., S. Miyata, N. Ogawa, N. Koshikawa, H. Yasumitsu, T. Kanamori and K. Miyazaki (1998). "cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathogenesis-related proteins, and its frequent expression in human brain cancer cells." *Biochim Biophys Acta* **1395**(2): 202-208.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2010). "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation." *Curr Opin Cell Biol* **22**(2): 124-131.
- You, L., Z. Wang, H. Li, J. Shou, Z. Jing, J. Xie, X. Sui, H. Pan and W. Han (2015). "The role of STAT3 in autophagy." *Autophagy* **11**(5): 729-739.
- Yu, H., H. Lee, A. Herrmann, R. Buettner and R. Jove (2014). "Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions." *Nat Rev Cancer* **14**(11): 736-746.
- Zhang, L., J. Pan, Y. Dong, D. J. Tweardy, Y. Dong, G. Garibotto and W. E. Mitch (2013). "Stat3 activation links a C/EBP δ to myostatin pathway to stimulate loss of muscle mass." *Cell Metab* **18**(3): 368-379.
- Zhu, Z., X. He, C. Johnson, J. Stoops, A. E. Eaker, D. S. Stoffer, A. Bell, R. Zarnegar and M. C. DeFrances (2007). "PI3K is negatively regulated by PIK3IP1, a novel p110 interacting protein." *Biochem Biophys Res Commun* **358**(1): 66-72.

APÊNDICES

APENDICE A. Genes diferencialmente expressos em 24 horas.

Tabela com os 241 genes responsivos ao tratamento com propionato de testosterona por 24 horas após o período de castração.

Nome do Gene	Nome sistemático	logFC	P.Value	adj.P.Val
Mettl7a	NM_001037355	-2,01972	0,00000	0,00005
Ucp3	NM_013167	-2,19137	0,00000	0,00005
Igf1	NM_001082479	1,75830	0,00000	0,00013
Fbxo32	NM_133521	-2,82584	0,00000	0,00013
Pik3ip1	NM_001017453	-2,02938	0,00000	0,00019
Klhl38	NM_001025008	-2,30089	0,00000	0,00019
Igfbp3	NM_012588	-1,97467	0,00000	0,00021
Cxcl14	NM_001013137	-1,57930	0,00000	0,00023
A_64_P151542	A_64_P151542	2,35920	0,00000	0,00023
Klf15	NM_053536	-1,40288	0,00000	0,00030
Ccdc80	NM_022543	1,39079	0,00000	0,00033
Spns2	NM_001144991	1,48704	0,00000	0,00040
LOC292199	NM_001144859	-1,43942	0,00000	0,00040
Fn3k	NM_001109051	-1,21431	0,00000	0,00053
Col1a2	NM_053356	1,18587	0,00000	0,00057
Col1a1	NM_053304	1,32139	0,00000	0,00058
Fkbp5	NM_001012174	1,19394	0,00000	0,00058
Ankrd9	NM_001012112	1,15767	0,00000	0,00061
Creb3l1	NM_001005562	1,19873	0,00000	0,00064
Amd1	NM_031011	1,62631	0,00000	0,00064
Abr	NM_001105814	1,38766	0,00000	0,00070
Pim3	NM_022602	-1,29813	0,00000	0,00070
RT1-CE10	NM_001008833	-1,57351	0,00000	0,00099
Cck	NM_012829	1,22835	0,00000	0,00109
Col3a1	NM_032085	1,53833	0,00000	0,00111
Tmem140	NM_001009709	-1,34613	0,00000	0,00111
Hopx	NM_133621	1,09990	0,00000	0,00111
Myh1	NM_001135158	1,37510	0,00000	0,00126
GU969272	GU969272	-1,22943	0,00000	0,00127
Lrrc2	NM_001012001	-1,02104	0,00000	0,00141
Ulk1	NM_001108341	-1,09551	0,00000	0,00220
Crispld2	NM_138518	0,98864	0,00000	0,00220
Tuba1a	NM_022298	1,11302	0,00000	0,00220
Hdac4	XM_001067733	-1,13281	0,00000	0,00220
Ipo13	NM_053778	-1,03596	0,00000	0,00220
Odc1	NM_012615	1,24151	0,00000	0,00254
Mybph	NM_031813	1,34157	0,00000	0,00255
Dpep1	NM_053591	1,49742	0,00000	0,00267
LOC691781	XR_086096	0,92942	0,00000	0,00303
Tjap1	NM_001108203	1,09783	0,00000	0,00318
Ddit4l	NM_080399	-1,23425	0,00001	0,00318
Ucma	NM_001106121	1,06624	0,00001	0,00318
A_64_P136016	A_64_P136016	0,92715	0,00001	0,00318
Hspa5	NM_013083	0,91309	0,00001	0,00334
Mkl1	XM_235497	0,99130	0,00001	0,00344

Tuba1b	NM_001044270	0,88402	0,00001	0,00344
LOC678769	NM_001126298	0,89275	0,00001	0,00344
Art5	NM_001013039	-0,91438	0,00001	0,00420
Zfand5	NM_001106356	-1,34599	0,00001	0,00420
Pelo	NM_001007634	-0,84566	0,00001	0,00420
Manba	NM_001031655	0,99594	0,00001	0,00420
Rprml	NM_001109481	0,87400	0,00001	0,00429
A_64_P164335	A_64_P164335	-0,91323	0,00001	0,00474
Cygb	NM_130744	-0,93032	0,00001	0,00485
Mapk14	NM_031020	0,85146	0,00001	0,00498
Itgb6	NM_001004263	0,90776	0,00001	0,00577
A_64_P006473	A_64_P006473	1,05641	0,00001	0,00617
Kcnk6	NM_053806	0,83351	0,00001	0,00617
AW920845	AW920845	0,80830	0,00001	0,00619
Maf	NM_019318	0,87502	0,00001	0,00624
Bag3	NM_001011936	0,92624	0,00002	0,00662
Aqp4	NM_001142366	-1,09144	0,00002	0,00662
Ubc	NM_017314	-1,65886	0,00002	0,00662
ENSRNOT00000051185	ENSRNOT00000051185	0,79533	0,00002	0,00662
Col5a2	NM_053488	0,91890	0,00002	0,00662
Ypel3	NM_001135698	-0,80290	0,00002	0,00662
Mylk2	NM_057209	-0,77771	0,00002	0,00664
Lmod2	NM_001100964	-1,92227	0,00002	0,00670
C1qa	NM_001008515	0,79746	0,00002	0,00670
Tob2	NM_001007146	0,94150	0,00002	0,00670
Ppp1r14b	NM_172045	0,80905	0,00002	0,00670
Ppap2b	NM_138905	0,93531	0,00002	0,00677
Asb2	NM_001011984	-1,41262	0,00002	0,00701
Abhd4	NM_001108866	-0,75356	0,00002	0,00804
Cryab	NM_012935	0,83348	0,00002	0,00830
A_64_P110996	A_64_P110996	1,04808	0,00002	0,00834
Gprc5c	ENSRNOT00000004256	0,78674	0,00002	0,00834
St3gal6	NM_207602	-0,83326	0,00002	0,00834
A_64_P033230	A_64_P033230	0,79335	0,00003	0,00834
A_64_P163812	A_64_P163812	0,82850	0,00003	0,00859
Cd24	NM_012752	-0,85739	0,00003	0,00864
Srebf1	ENSRNOT00000047053	0,85954	0,00003	0,00887
Dynll1	NM_053319	0,82904	0,00003	0,00924
Slc13a3	NM_022866	1,01409	0,00003	0,00940
Pde4d	NM_017032	-0,79303	0,00003	0,00961
A_64_P157693	A_64_P157693	1,03326	0,00003	0,00982
Nme1	NM_138548	0,94002	0,00003	0,00983
Acly	NM_016987	0,84064	0,00003	0,01041
Slk	NM_019349	0,72491	0,00004	0,01085
Gabarapl1	NM_001044294	-0,77687	0,00004	0,01089
Ankrd54	NM_001025285	-0,73501	0,00004	0,01089
LOC680810	XM_001058983	-0,79061	0,00004	0,01140
Cd248	NM_001106325	0,78557	0,00004	0,01196
Rbl2	NM_031094	-1,02917	0,00004	0,01217
Cnppd1	NM_199112	-0,71033	0,00004	0,01217
Gapdh-ps1	NR_003722	-0,79808	0,00004	0,01217
Pgf	NM_053595	0,79607	0,00004	0,01217
Postn	NM_001108550	0,72792	0,00005	0,01244
Plcd4	NM_080688	1,15712	0,00005	0,01244

Zbtb38	NM_001012471	-0,69389	0,00005	0,01253
Pnp	NM_001106031	0,84356	0,00005	0,01262
Jph2	NM_001037974	0,69789	0,00005	0,01271
Ptprf	NM_019249	0,71288	0,00005	0,01330
A_64_P115772	A_64_P115772	0,78012	0,00005	0,01341
ENSRNOT00000043148	ENSRNOT00000043148	-0,75353	0,00005	0,01341
ENSRNOT00000013159	ENSRNOT00000013159	0,74366	0,00005	0,01341
Tbx1	NM_001108322	-0,71321	0,00005	0,01341
Mkrn2	NM_001008314	-0,78101	0,00006	0,01361
Tspan8	NM_133526	-0,74024	0,00006	0,01440
Prkca	NM_001105713	0,67194	0,00006	0,01445
Trim63	NM_080903	-0,95440	0,00006	0,01468
ENSRNOT00000001785	ENSRNOT00000001785	0,80574	0,00006	0,01494
Crim1	NM_001169103	-0,86266	0,00007	0,01546
Sypl2	NM_001108563	0,79625	0,00007	0,01619
Gas5	NR_002704	-0,77728	0,00007	0,01629
Rab20	NM_001109535	-0,75728	0,00007	0,01649
Fst	NM_012561	0,83431	0,00007	0,01649
Crym	NM_053955	0,72802	0,00007	0,01649
ENSRNOT00000048816	ENSRNOT00000048816	0,82698	0,00008	0,01663
Spon1	NM_172067	0,76029	0,00008	0,01663
Srxn1	NM_001047858	-0,77407	0,00008	0,01668
Scn4b	NM_001008880	-0,66904	0,00008	0,01668
A_64_P139203	A_64_P139203	0,66083	0,00008	0,01669
Arrdc3	NM_001007797	-1,13619	0,00008	0,01672
Abra	NM_175844	-1,13873	0,00008	0,01729
Jun	NM_021835	-0,85151	0,00008	0,01729
Myl6	NM_001109484	0,76460	0,00008	0,01729
Actg1	NM_001127449	0,67032	0,00008	0,01735
Rbp7	NM_001108693	0,67248	0,00009	0,01817
Mat2a	NM_134351	0,83156	0,00009	0,01847
Cep85	NM_001080151	-0,81683	0,00009	0,01847
G0s2	NM_001009632	1,93387	0,00009	0,01863
ENSRNOT00000014537	ENSRNOT00000014537	-0,68901	0,00009	0,01875
mrpl9	NM_001007696	-0,75084	0,00010	0,01902
Atpaf2	NM_001107006	0,64769	0,00010	0,01932
Ccrn4l	NM_138526	1,01162	0,00010	0,01974
Tnxa-ps1	NR_024118	0,86728	0,00010	0,01974
Flcn	NM_199390	-0,69939	0,00011	0,01988
A_64_P058274	A_64_P058274	0,66985	0,00011	0,01988
Hyou1	NM_138867	0,68420	0,00011	0,01988
Emp3	NM_030847	0,71109	0,00011	0,01994
Cox6a1	NM_012814	0,65589	0,00011	0,01995
Tmem86a	NM_001135016	-0,70638	0,00011	0,01995
Pgam1	NM_053290	0,69999	0,00011	0,02005
Tnxb	BC168189	1,13213	0,00011	0,02005
Cd163	NM_001107887	0,64246	0,00011	0,02005
RGD1566369	ENSRNOT00000006662	0,78593	0,00011	0,02005
Slc7a6	NM_001107424	0,67578	0,00011	0,02005
Higd1b	NM_001105844	0,82990	0,00011	0,02005
Omd	NM_031817	-0,62341	0,00012	0,02068
Mob2	NM_001109159	-0,61530	0,00012	0,02071
Arhgap28	NM_001191815	-0,68947	0,00012	0,02118
Ppp1r15a	NM_133546	-0,92134	0,00012	0,02118

Cmb1	NM_001008770	-0,70446	0,00012	0,02123
Creg1	NM_001105966	-0,70810	0,00013	0,02189
A_64_P036335	A_64_P036335	0,65055	0,00013	0,02214
Map1s	NM_001106070	0,72756	0,00013	0,02214
A_64_P101678	A_64_P101678	0,74350	0,00013	0,02214
Stat5b	NM_022380	-0,60977	0,00013	0,02214
Calr	NM_022399	0,61387	0,00014	0,02250
Spryd7	NM_001009635	-0,72619	0,00014	0,02250
Anxa10	NM_001109110	0,76841	0,00014	0,02250
A_64_P085462	A_64_P085462	0,69629	0,00014	0,02250
A_64_P025222	A_64_P025222	-0,79196	0,00014	0,02261
Efna1	NM_053599	-0,85786	0,00014	0,02262
Lsm12	NM_001105843	0,62257	0,00015	0,02335
Nfe2l1	NM_001108293	-0,61957	0,00015	0,02353
Cxcl13	NM_001017496	0,85100	0,00015	0,02415
Pes1	NM_001044228	-0,67965	0,00016	0,02535
Akap13	NM_001106271	-0,65979	0,00016	0,02543
XM_345356	XM_345356	0,68593	0,00017	0,02606
Pf4	NM_001007729	0,67144	0,00017	0,02606
Surf4	NM_001033868	0,73766	0,00017	0,02606
Cd302	NM_001013916	-0,75823	0,00017	0,02606
Fabp4	NM_053365	0,60750	0,00018	0,02688
Bcor1	NM_001191587	-0,62981	0,00018	0,02764
A_64_P149316	A_64_P149316	0,62785	0,00019	0,02858
Hlx	NM_001077674	-0,69443	0,00020	0,02895
Zfp503	NM_001107250	-0,71396	0,00020	0,02906
A_64_P053237	A_64_P053237	0,69325	0,00020	0,02915
Bmper	NM_001135799	0,66638	0,00020	0,02915
Chac1	NM_001173437	-0,60653	0,00020	0,02946
A_64_P042056	A_64_P042056	0,89047	0,00020	0,02949
A_64_P141709	A_64_P141709	0,67184	0,00021	0,03025
Sgk1	NM_019232	-0,71438	0,00022	0,03044
Vegfa	NM_031836	0,68597	0,00022	0,03062
Mgp	NM_012862	0,84650	0,00023	0,03176
C1qc	NM_001008524	0,61287	0,00023	0,03209
S100a4	NM_012618	0,62895	0,00023	0,03223
Pi15	NM_001106917	0,64194	0,00024	0,03299
Tubb2a	NM_001109119	0,64753	0,00025	0,03350
Lyz2	NM_012771	0,68577	0,00025	0,03350
Hmgn1	NM_001013184	0,64126	0,00025	0,03391
Abtb1	NM_001005902	-0,64847	0,00026	0,03406
Ctps	NM_001134873	0,59741	0,00027	0,03496
Ccdc28a	NM_001037789	-0,72442	0,00027	0,03496
Mrpl44	NM_001031650	-0,63474	0,00027	0,03556
Limk1	NM_031727	0,62480	0,00028	0,03556
Dnajc25	NM_001025021	0,63194	0,00028	0,03573
Taf9b	NM_133615	0,67004	0,00028	0,03575
Sparc	NM_012656	0,82873	0,00028	0,03602
Sept8	NM_001107002	0,62038	0,00029	0,03618
ENSRNOT00000029281	ENSRNOT00000029281	-0,59874	0,00029	0,03618
LOC684327	XM_001069890	-0,58622	0,00029	0,03623
A_64_P150064	A_64_P150064	-0,65792	0,00029	0,03625
Asb15	ENSRNOT00000008917	-0,60135	0,00030	0,03652
Sod3	NM_012880	-0,85238	0,00030	0,03653

Pnrc1	NM_173322	-0,69618	0,00030	0,03671
Klhl21	NM_001107996	-0,61601	0,00031	0,03815
A_64_P087796	A_64_P087796	-0,69958	0,00032	0,03832
Lman2	NM_001115024	0,67014	0,00033	0,03878
Acss1	NM_001106524	-0,66277	0,00033	0,03878
A_64_P111963	A_64_P111963	0,65838	0,00033	0,03878
Egln3	NM_019371	-0,59314	0,00033	0,03878
Ttc30b	NM_001127607	-0,61973	0,00034	0,04032
Usp10	NM_001034146	0,59294	0,00036	0,04157
Il1r2	NM_053953	0,68716	0,00036	0,04157
A_64_P147586	A_64_P147586	0,59990	0,00036	0,04157
Fabp5	NM_145878	0,71748	0,00037	0,04232
A_64_P106707	A_64_P106707	0,66047	0,00038	0,04232
Dusp26	NM_001012352	-0,61859	0,00038	0,04284
Mn1	NM_001191928	-0,60775	0,00039	0,04317
Tgm2	NM_019386	0,66414	0,00039	0,04343
Fam65a	ENSRNOT00000023710	-0,67655	0,00040	0,04359
DV714996	DV714996	0,67424	0,00040	0,04381
Myoc	NM_030865	-0,65735	0,00040	0,04389
Usp3	NM_001025424	-0,67152	0,00041	0,04415
RT1-A2	NM_001008829	-0,70263	0,00043	0,04500
A_64_P069236	A_64_P069236	-0,59370	0,00043	0,04518
Ankrd23	NM_001108211	-0,60264	0,00044	0,04605
Ctsl1	NM_013156	-0,94422	0,00044	0,04607
LOC687797	XM_001080179	0,63891	0,00045	0,04651
Pcgf5	NM_001129882	-0,63103	0,00046	0,04707
ENSRNOT00000041811	ENSRNOT00000041811	-0,76984	0,00047	0,04767
ENSRNOT00000058522	ENSRNOT00000058522	-0,77847	0,00047	0,04767
Fdx1l	NM_001108002	0,60614	0,00047	0,04767
Ssr3	NM_031120	0,71134	0,00048	0,04776
A_64_P123387	A_64_P123387	0,61003	0,00048	0,04776
A_64_P120936	A_64_P120936	-0,72988	0,00048	0,04796
ENSRNOT00000058516	ENSRNOT00000058516	0,63639	0,00049	0,04840
A_64_P028255	A_64_P028255	0,59827	0,00050	0,04913

APÊNDICE B. Análise funcional DAVID.

Category	Term	Count	%	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	PValue	Benjamini	-log10(pvalue)
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0070062~extracellular exosome	62	28,8372093	195	2646	18520	2,225400702	0,000	0,000	6,731939351
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0031012~extracellular matrix	15	6,976744186	195	254	18520	5,608721987	0,000	0,000	4,215147315
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0043209~myelin sheath	13	6,046511628	195	191	18520	6,464223386	0,000	0,000	4,161193106
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005615~extracellular space	34	15,81395349	195	1316	18520	2,453744837	0,000	0,000	3,926468602
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005737~cytoplasm	86	40	195	5227	18520	1,562616199	0,000	0,000	3,85336081
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005829~cytosol	35	16,27906977	195	1590	18520	2,090630543	0,000	0,002	2,704304014
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	12	5,581395349	195	253	18520	4,504712679	0,000	0,003	2,574253662
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009612~response to mechanical stimulus	10	4,651162791	191	104	17535	8,827527185	0,000	0,003	2,571746939
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0005581~collagen trimer	6	2,790697674	195	60	18520	9,497435897	0,000	0,013	1,900173122
GOTERM_CC_DIRECT	GO:0030016~myofibril	5	2,325581395	195	40	18520	11,87179487	0,001	0,022	1,666109768

APÊNDICE C. Membranas de nitrocelulose para Western blotting.

Exemplos de membranas de nitrocelulose feitas para os experimentos de validação com amostras de músculo Elevador do ânus de ratos machos adultos.

Apêndice C. Exemplos de membranas de nitrocelulose coradas com *Ponceau* utilizadas para incubação de anticorpos anti proteínas-alvo dos experimentos de validação de RT-PCR (Sham, C3 e C3pt24). As membranas foram incubadas com os anticorpos já listados previamente.

Apêndice C. Exemplo de membranas de nitrocelulose coradas com *Ponceau* utilizadas para incubação de anticorpos anti proteínas-alvo dos experimentos de validação do *array* de anticorpos anti-fosfoquinasas (Sham, C3 e C3pt8). As membranas foram incubadas com os anticorpos já listados previamente.

ANEXOS

ANEXO 1. Documentação CEUA.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Análise dos genes diferencialmente expressos durante o processo de reversão da atrofia muscular*”, registrado com o número **161/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Marcelo Damario Gomes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 28 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 12 camundongos C57Bl 6 machos pesando 30g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 28/08/2017 a 30/03/2019.

We certify that the Protocol nº 161/2017, entitled “*Analysis of differentially expressed genes in the process of reversal of muscle atrophy*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 08/28/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 12 male C57Bl 6 mice weighing 30g from the Central Animal House of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 03/30/2019.

Ribeirão Preto, 28 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
 Presidente da CEUA-FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br

ANEXO 2. Fosfoquinases e sítios de fosforilação.

Relação das 43 quinases presentes nas membranas A e B do *array* de anticorpos anti-fosfoquinases. Coordenadas, descrição da respectiva fosfoquinase e seus sítios de fosforilação. Também estão listados os controles do ensaio.

Membrane/ Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site
A-A1, A2	Reference Spot	—
A-A3, A4	p38 α	T180/Y182
A-A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/ Y187
A-A7, A8	JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/ Y223
A-A9, A10	GSK-3 α/β	S21/S9
B-A13, A14	p53	S392
B-A17, A18	Reference Spot	—
A-B3, B4	EGF R	Y1086
A-B5, B6	MSK1/2	S376/S360
A-B7, B8	AMPK α 1	T183
A-B9, B10	Akt 1/2/3	S473
B-B11, B12	Akt 1/2/3	T308
B-B13, B14	p53	S46
A-C1, C2	TOR	S2448
A-C3, C4	CREB	S133
A-C5, C6	HSP27	S78/S82
A-C7, C8	AMPK α 2	T172
A-C9, C10	β -Catenin	—
B-C11, C12	p70 S6 Kinase	T389
B-C13, C14	p53	S15
B-C15, C16	c-Jun	S63
A-D1, D2	Src	Y419
A-D3, D4	Lyn	Y397
A-D5, D6	Lck	Y394
A-D7, D8	STAT2	Y689
A-D9, D10	STAT5a	Y694
B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424
B-D13, D14	RSK1/2/3	S380/S386/S377
B-D15, D16	eNOS	S1177

Membrane/ Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site
A-E1, E2	Fyn	Y420
A-E3, E4	Yes	Y426
A-E5, E6	Fgr	Y412
A-E7, E8	STAT6	Y641
A-E9, E10	STAT5b	Y699
B-E11, E12	STAT3	Y705
B-E13, E14	p27	T198
B-E15, E16	PLC- γ 1	Y783
A-F1, F2	Hck	Y411
A-F3, F4	Chk-2	T68
A-F5, F6	FAK	Y397
A-F7, F8	PDGF R β	Y751
A-F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699
B-F11, F12	STAT3	S727
B-F13, F14	WNK1	T60
B-F15, F16	PYK2	Y402
A-G1, G2	Reference Spot	—
A-G3, G4	PRAS40	T246
A-G9, G10	PBS (Negative Control)	—
B-G11, G12	HSP60	—
B-G17, G18	PBS (Negative Control)	—