

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Aline Zanatta Schavinski

Papel do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina na modulação da autofagia
cardíaca de camundongos

Ribeirão Preto

2019

ALINE ZANATTA SCHAVINSKI

Papel do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina na modulação da autofagia cardíaca de camundongos

Dissertação apresentado ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Ribeirão Preto

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.

SCHAVINSKI, Aline Zanatta

Papel do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina na modulação da autofagia cardíaca em camundongos. Ribeirão Preto, 2019.

87 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Navegantes, Luiz Carlos Carvalho.

1. CGRP. 2. Metabolismo de proteínas. 3. Autofagia. 4. Coração.

SCHAVINSKI, A. Z. **Papel do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina na modulação da autofagia cardíaca em camundongos.** Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha querida mãe **Marileda Zanatta**, pela sua história e luta diária para me dar o melhor desse mundo. Por todas as oportunidades, pelos sins e principalmente pelos nãoos, foram eles que me trouxeram até aqui.*

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida, que me permitiu viver este caminho e que nele colocou pessoas essenciais para que tudo se tornasse melhor. Pelo amparo nos momentos de fraqueza e pela força quando precisei. “Não te mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares (Josué 1:9).”

Agradeço à minha mãe **Marileda Zanatta**, por todo amor, apoio e suporte, por compreender e aceitar minha partida e minha ausência nesses dois anos. Seus incentivos e encorajamento diários foram indispensáveis para que eu conseguisse trilhar este caminho.

Ao meu orientador **Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes**, pela imensa oportunidade de ser sua aluna. Pelos desafios diários, pelo encorajamento e principalmente por acreditar na minha capacidade. Obrigada pelo carinho, compreensão e por todo apoio na realização deste trabalho. Gratidão pela sua confiança!

À **Dra Isis do Carmo Kettelhut** pelo acolhimento em seu laboratório, por me instigar o conhecimento e pelas contribuições durante a realização deste trabalho. É um prazer conviver com a Senhora!

Ao **Dr. Renato Hélios Migliorini** (*in memoriam*) pela fundação do Laboratório de Controle do Metabolismo sobre alicerces que fazem deste laboratório referência nacional e internacional.

À **Ana Paula de Assis** por ser minha duplinha do laboratório. Me lembro da primeira vez que te encontrei no laboratório, um rosto conhecido, aquilo me tranquilizou. Soube naquele momento que teria alguém do meu ladinho, sentada ali bem atrás de mim que poderia dividir os próximos dois anos que viriam. Sou grata pelo lindo laço que construímos, e pelo apoio que criamos uma na outra. Você sempre esteve ali deixando os dias mais leves de alguma forma.

Ao **Henrique Morgan**, pela sua amizade. Por ter me acolhido de uma forma tão linda, que meu coração transborda com tanta gratidão. Muito obrigada por cada ajuda, em cada experimento, pela sua disposição e disponibilidade. Obrigada pelo carinho e pela atenção.

À **Karine Emanuelle** pelas horas e horas de conversa sobre o trabalho e sobre a vida. Obrigada pelas palavras em meus momentos de euforia, obrigada por me colocar no chão sempre que precisava e por sempre me atualizar sobre o Minas.

À **Natany Garcia** pela amizade, companheirismo, pelos momentos de conversa, de descontração e pela ajuda na realização dos experimentos.

À **Natália Lauterbach** pelo acolhimento, pela ajuda diária, pela amizade e por cada experimento que se disponibilizou e se prontificou em fazer junto comigo. Principalmente pela paciência nas conversas científicas, por compartilhar sua experiência científica ajudando no meu crescimento profissional e pelos muitos ensinamentos de bancada.

Ao **Juliano Machado, Willian Silveira e Dawit Gonçalves** pelo acolhimento, paciência e disponibilidade nas ajudas com os experimentos.

À **Neuza Zanon**, pela boa convivência, pelas ajudas diárias nos experimentos, por colaborar com a boa manutenção do laboratório, favorecendo um bom ambiente de trabalho.

À **Lilian Zorzenon**, pela agradável convivência, pelo apoio técnico e pela disponibilidade e ajuda diária nos experimentos.

À **Elza Filippin** pelo apoio técnico, pela colaboração com o andamento do laboratório e pelos momentos de descontração diários no café.

Ao **Victor Dias Galban** pela gentileza e solicitude no dia a dia

De uma forma em geral, meus agradecimentos ao **Laboratório de Controle do Metabolismo**, e toda à equipe, pelos grandes momentos de aprendizagem, pela troca de conhecimento e pela vivência diária.

À minha irmã **Minéia Schavinski** pela presença diária, pelas nossas conversas e pelo seu apoio incondicional.

À **Flávia da Silva Resende** por sua amizade, pelo seu companheirismo, pelo carinho e dedicação. Obrigada por tudo que fez por mim nestes dois anos, pela sua presença diária com fotos, ligações e mensagens. Por tornar meus dias mais leves. Pelas palavras de apoio, de incentivo e de conselho. É imensurável a gratidão que sinto pela sua pessoa. Que nosso caminho permaneça unido por toda a vida.

À **Amanda Lima Deluque** obrigada pela imensa oportunidade de dividir nos mínimos detalhes estes dois anos contigo. O caminho foi mais leve pois pude partilha-lo contigo. Obrigada por ter me dado a mão e ter aceitado caminhá-lo comigo. Muito obrigada pela sua amizade, pelas nossas conversas, pelas nossas risadas diárias, pela companhia e por todo o suporte- principalmente- nos dias mais difíceis que passamos aqui. A vida ficou mais leve com você ao meu lado.

As minhas amigas **Thais Caroline e Karolyne Magalhães**, que trouxeram luz aos meus dias. Vocês entraram em minha vida quando eu mais precisava,

abraçaram minhas dores, colocaram um sorriso em meu rosto. Sou grata por todos nossos dias, por nossos almoços, e por nossa família.

À **Heloísa Della Coletta Francescato** pelo acolhimento, pelo abraço maternal, pela ajuda nos dias que mais precisei, pelas conversas esclarecedoras, e por encher minha vida de suculentas.

À **Dalva Oppelt, Arnildo Camponogara, Maria Cristina Trauttman, Maria das Dores Rezende, Delma Zanatta** pelo carinho incondicional, pelo apoio, e pelo incentivo, não apenas nesses dois últimos anos, mas em toda a minha vida.

Aos meus amigos **Dener Araújo, Dionys Souza, Romero Caló e Ionara Lima** pela amizade que construímos na graduação e que perdura até hoje. É bom saber que mesmo na correria do dia a dia, na distância que nossos caminhos tomaram, posso contar com vocês.

Ao professor **Dr. Davi Moraes, Dr. Rubens Fazan** e professora **Dra Mariana Kyomi** pelas valiosas contribuições em minha banca de qualificação.

À professora **Dra Mariana Kyomi** e aos seus alunos **Flávia Matsuo e Paulo Henrique Araújo** pela disponibilidade e colaboração com a técnica de imunofluorescência. Ao **Laboratório Multiusuário de Histotécnica** do Departamento de Biologia Celular e Molecular pela confecção das lâminas de imunofluorescência.

À **Ana Carolina Onomoto** pela colaboração com os primeiros experimentos que realizei no mestrado. Obrigada pela disponibilidade e paciência.

À todos os meus amigos da pós-graduação: **Júlio Pascoaloti, Adrielli Raminelli, Rafaella Volpi, Daniel Mendes, Samuel Grisote, Viviane Filintro, Daniel Phelipe, Thais Marques, Cláudia Silva, Beatriz Magalhães** por todos os momentos de descontração, pela amizade, pelas manifestações e principalmente por tornarem a caminhada mais leve.

Aos funcionários do departamento de fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à **Elisa, Cláudia e Fernando** pela notável paciência e disponibilidade na resolução de eventuais problemas que surgiram pelo caminho.

À **CAPES, CNPq e FAPESP** pelo apoio financeiro.

Epígrafe

“Temos um corpo e uma alma e um querer e nossos filhos - e, no entanto o que verdadeiramente somos é aquilo que o impossível cria em nós”.

(Clarice Lispector)

Resumo

RESUMO

SCHAVINSKI, A.Z. **Papel do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina na modulação da autofagia cardíaca de camundongos.** Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) é um potente peptídeo vasodilatador amplamente distribuído no sistema nervoso central e em vários tecidos periféricos, incluindo o músculo esquelético e cardíaco. Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que este neuropeptídeo exerce efeitos antiproteolíticos no músculo esquelético e na manutenção da junção neuromuscular em ratos. No entanto, seu papel modulatório no controle do metabolismo de proteínas no coração ainda é completamente desconhecido. O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos agudos *in vivo* do CGRP na autofagia cardíaca. Para isso, camundongos C57Bl6 machos receberam uma única injeção de CGRP (100 µg/Kg, via subcutânea) ou solução salina 0,9% e foram sacrificados após 15, 30 ou 60 minutos. Nestes períodos, foram analisados metabólitos, hormônios, marcadores da autofagia cardíaca e o estado de fosforilação de proteínas relacionadas ao controle da síntese e degradação de proteínas. Os efeitos do CGRP no fluxo autofágico foram estimados por meio do tratamento com colchicina (0,4 mg/Kg, via intraperitoneal) em camundongos alimentados ou submetidos a 24h de jejum (CEUA, 018/2010, FMRP-USP). O sangue foi coletado e os corações foram removidos para posterior análises bioquímicas, de imunoreatividade, imunofluorescência e de expressão gênica. As catecolaminas foram quantificadas por HPLC. Os resultados foram expressos como média±EPM e para análise estatística foi aplicado o teste ANOVA com nível de significância de 5%. Em camundongos alimentados, o CGRP aumentou a glicemia (~55%) e diminuiu a insulinemia (~79%) sem alterar o conteúdo de glicogênio hepático por até 60 minutos. Além disso, o tratamento com CGRP aumentou a concentração plasmáticas de ácidos graxos livres (~33%) e diminuiu a concentração de glicerol (~50%) e noradrenalina plasmática (~83%). No coração, o tratamento com CGRP aumentou o estado de fosforilação de CREB (Ser¹³³;~3x) e da lipase hormonal sensível (~50%), sugerindo ativação da via de sinalização do AMPc/PKA. O efeito de fosforilação de CREB induzido pelo CGRP coincidiu com uma expressão elevada de

SIK1 (~2x), um gene alvo de CREB bem conhecido. Após 15 min, o CGRP aumentou p62 e tendeu a diminuir a razão LC3II:LC3I sugerindo inibição da autofagia. Este efeito foi confirmado em camundongos jejuados, onde o CGRP reduziu o fluxo autofágico cardíaco, conforme estimado pela redução do conteúdo de LC3II (~50%). Em animais alimentados, o tratamento com CGRP também reduziu o estado de fosforilação de Akt, em ambos os resíduos (Thr³⁰⁸ e Ser⁴⁷³; ~60%), não alterou a fosforilação de FoxO1 (Ser²⁵⁶), mas aumentou o estado de fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) (~2x), S6 (Ser^{235/236}) (~4x) e Ulk1 (Ser⁷⁵⁷) (~2x). Além disso, verificou-se aumento transitório da fosforilação de AMPK (Thr¹⁷²) (~30%) e de Ulk1 (Ser³¹⁷) (~80%). Em experimentos com cardiomiócitos de ratos neonatos, o CGRP aumentou a fosforilação de CREB e de Akt, após 15 minutos de incubação. A fosforilação de mTOR em resposta ao CGRP *in vitro* apresentou uma tendência de aumento. Este conjunto de resultados mostra que o tratamento agudo com CGRP induz efeitos diabetogênicos sistêmicos associados a uma rápida inibição do sistema autofágico/liossomal em coração de camundongos. Este efeito antiproteolítico é provavelmente mediado pela via do AMPc/PKA que leva à ativação da mTOR e à fosforilação inibitória em Ulk1, independentemente da sinalização da insulina/Akt.

Palavras chaves: CGRP, metabolismo de proteínas, autofagia, coração.

ABSTRACT

SCHAVINSKI, A.Z. **Role of the Calcitonin Gene-Related Peptide in the modulation of the cardiac autophagy of mice.** Dissertation (Master) Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) is a potent vasodilator peptide widely distributed in the central nervous system and in various peripheral tissues, including skeletal and cardiac muscle. Recent studies from our laboratory have demonstrated that CGRP exerts antiproteolytic effects on the skeletal muscle and in the maintenance of neuromuscular junction in rats. However, its role in controlling the protein metabolism in the heart is still unknown. The main objective of this study was to evaluate the in vivo acute effects of CGRP on cardiac autophagy. For this, male C57B16 mice received a single injection of CGRP (100 µg/kg subcutaneous) or 0.9% saline and were sacrificed after 15, 30 or 60 minutes. In these periods, metabolites, hormones, cardiac autophagy markers and the state of phosphorylation of proteins related to the control of protein synthesis and degradation were analyzed. The effects of CGRP on autophagic flow were estimated by treatment with colchicine (0.4 mg/kg, intraperitoneal) in mice fed or submitted to 24 hours of fasting (CEUA, 018/2010, FMRP-USP). Blood was collected and hearts were removed for further biochemical, immunoreactivity, immunofluorescence and gene expression analyzes. Catecholamines were quantified by HPLC. The results were expressed as mean±SEM and for statistical analysis the ANOVA test was applied with significance level of 5%. In fed mice, CGRP increased blood glucose (~55%) and decreased insulinemia (~79%) without affecting the hepatic glycogen content for up to 60 minutes. In addition, treatment with CGRP increased plasma concentrations of free fatty acids (~33%) and decreased the concentration of glycerol (~50%) and plasma noradrenaline (~83%). In the heart, CGRP treatment increased the phosphorylation state of CREB (Ser133; ~ 3x) and sensitive hormone lipase (~50%), suggesting activation of the cAMP / PKA signaling pathway. The effect of CGRP-induced CREB phosphorylation coincided with a high expression of SIK1 (~2x), a well-known CREB target gene. After 15 min, CGRP increased p62 and tended to decrease the LC3II:LC3I ratio suggesting inhibition of autophagy. This effect was confirmed in fasted mice, in which CGRP reduced cardiac autophagic flow, as estimated by the reduction

of LC3II content (~50%). In fed animals, CGRP treatment also reduced the Akt phosphorylation status in both residues (Thr308 and Ser473; ~60%), did not alter the phosphorylation of Foxo1 (Ser256), but increased the phosphorylation state of mTOR (Ser2448) (~2x) S6 (Ser235 / 236) (~4x) and Ulk1 (Ser757) (~2x). In addition, there was a transient increase in the phosphorylation of AMPK (Thr172) (~30%) and Ulk1 (Ser317) (~80%). In experiments with cardiomyocytes from neonatal rats, CGRP increased CREB and Akt phosphorylation after 15 minutes of incubation. The phosphorylation of mTOR in response to in vitro CGRP showed a tendency to increase. These data show that acute treatment with CGRP induces systemic diabetogenic effects associated with rapid inhibition of the autophagic/lysosomal system in the heart of mice. This antiproteolytic effect is probably mediated by the cAMP cascade leading to mTOR activation and inhibitory phosphorylation in Ulk1, independently of insulin/Akt signaling.

Key words: CGRP, protein metabolism, autophagy, heart.

LISTA DE SIGLAS

AGLs	Ácidos graxos livres
Akt	Proteína quinase B
Atg	Genes relacionados à autofagia
AMBRA1	<i>Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy</i>
AMP	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato cíclico
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x	<i>B-cell lymphoma-extra</i>
BIF1	<i>Bax-interating factor 1</i>
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CLR	<i>Calcitonin-like receptor</i>
EPM	Erro padrão da média
FIP200	<i>Kinase Family interacting protein of 200 kD</i>
FoxO	<i>Forkhead box class O</i>
Gabarap	<i>γ-aminobuturic acid receptor-associated protein</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i>
mTOR	Proteína alvo da rapamicina de mamíferos
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PGC1-α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α</i>
RCP	<i>Receptor componente protein</i>
RAMP1	<i>Receptor activaty modifying protein 1</i>
TRPV1	<i>receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1</i>
Ulk1	<i>Unc51-like kinase 1</i>
UVRAG	<i>Uv radiation resistance-associated gene protein</i>
s.c	Subcutâneo
i.p	Intraperitoneal
UA	Unidades arbitrárias

Sumário

1.Introdução.....	22
1.1 Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina	22
1.2 Autofagia.....	25
1.3 Regulação da autofagia pelo AMPc	28
2. <i>Objetivo geral</i>	31
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	31
3.Materiais e Métodos	33
3.1 Animais	33
3.2 Delineamento experimental.....	33
3.3 Metodologia experimental	36
3.3.1 Análise in vivo do fluxo autofágico.....	36
3.3.2 Determinação de punctas de LC3 por imunofluorescência	36
3.3.3 Cultura primária de cardiomiócitos de ratas neonatas	37
3.3.4 Determinação da Glicemia	38
3.3.5 Determinação de ácidos graxos livres e glicerol.....	38
3.3.6 Determinação da insulina plasmática	38
3.3.7 Determinação das catecolaminas	39
3.3.8 Análises das proteínas por <i>Westerb blotting</i>	40
3.3.9 Avaliação da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real	43
3.4 Análise estatística	44
4. Resultados.....	46
4.1 Parâmetros metabólicos e hormonais.....	46
4.2 Parâmetros moleculares no coração de camundongos in vivo	48
4.2.1 Efeito do tratamento com CGRP na via de sinalização do AMPc	48
4.2.2 Efeito do tratamento com CGRP em diferentes marcadores autofágicos cardíacos	51
4.2.3 Efeito do tratamento com o antagonista do CGRP (CGRP ₈₋₃₇) na razão LC3-II/LC3-I	56
4.2.4 Efeito do tratamento com CGRP no fluxo autofágico do coração de camundongos jejuados	57
4.2.5 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de AKT/FoxO.....	59
4.2.6 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de mTOR	61
4.2.7 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de AMPK	63
4.3 <i>Parâmetros moleculares em cardiomiócitos de ratos nenatos</i>	65

4.3.1 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de PKA/CREB e de Akt/mTOR	65
5.Discussão	68
6.Conclusão.....	79
7. Referências Bibliográficas	81

Introdução

1.Introdução.

1.1 Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

O Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP, do inglês *calcitonin gene-related peptide*) é um neuropeptídeo que existe em humanos em duas isoformas, α -CGRP e β -CGRP. O α -CGRP é composto por uma sequência de 37 aminoácidos, formado a partir do *splicing* alternativo do gene da calcitonina (AMARA et al., 1982). Ele é amplamente distribuído no sistema nervoso e cardiovascular e, em outros tecidos como o músculo esquelético, tecido adiposo, adrenal, pâncreas, entre outros (RUSSELL et al., 2014). Entretanto, muito pouco ainda se conhece sobre a função do CGRP nestes diferentes órgãos e tecidos.

O CGRP é o principal peptídeo bioativo liberado por fibras nervosas sensoriais do tipo C e A δ (MAGGI, 1995), onde está frequentemente colocalizado com a substância P (SP) (GIBBINS et al., 1985). Na junção neuromuscular ou placa motora, é liberado juntamente com a Acetilcolina (Ach) (NEW; MUDGE, 1986). Como sua concentração plasmática é extremamente baixa, é provável que possa mediar seus efeitos próximos ao seu local de liberação dos nervos sem a necessidade de circular na corrente sanguínea (RUSSELL et al., 2014a).

O Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do Tipo 1 (TRPV1) está presente nas terminações nervosas sensoriais e é considerado o principal regulador da liberação do CGRP (SANCHEZ; KRAUSE; CORTRIGHT, 2001) e pode estar presente também em órgãos como o coração e o rim (CHEN et al., 2014; GAO et al., 2014). No coração, é expresso nos ventrículos, superfície do epicárdio, células endoteliais, células musculares dos vasos sanguíneos e nos neurônios sensoriais que inervam o miocárdio (YANG et al., 2010; ZAHNER et al., 2003). Os receptores TRPV1 podem ser ativados por diferentes estímulos exógenos, como a capsaicina, e endógenos como baixo pH, lipídeos e proteases. Sua estimulação provoca o aumento do influxo de cálcio (Ca^{2+}), o que leva à excitação das vesículas contendo CGRP e SP (RANDHAWA; JAGGI, 2017).

Após liberado, o CGRP se liga ao seu receptor *calcitonin receptor-like* (CLR), pertencente à família das proteínas G (AIYAR et al., 1996). O CLR se associa com uma proteína modificadora de atividade (RAMP), que possui três isoformas diferentes: a RAMP1, RAMP2 e RAMP3 (MCLATCHIE et al., 1998). Destas, a principal isoforma que interage com o CLR em resposta ao acoplamento com o

CGRP é a RAMP1. Um terceiro componente do sistema receptor conhecido como proteína componente de receptor (RCP) é recrutado com a função de otimizar a transdução do sinal mediado pelo CGRP (LU et al., 1999). A ligação do CGRP ao seu receptor ativa duas vias de sinalizações: a via do AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e da fosfolipase C (RUSSELL et al., 2014). É bem estabelecido que o AMPc tem como efetor clássico a PKA (proteína quinase dependente de AMPc), cuja ativação se dá através da ligação do AMPc às subunidades regulatórias desta quinase, promovendo assim a liberação das subunidades catalíticas, que agora livres podem promover a fosforilação de diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares, como CREB (proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc) (IYENGAR; HILDEBRANDT, 2001) (figura 1).

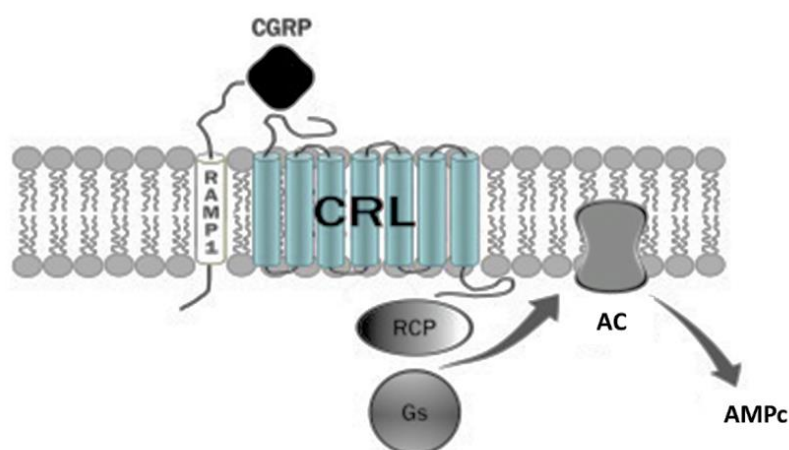


Figura 1: Representação esquemática do sistema CGRP-receptor. CGRP: Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina; CLR : calcitonin receptor-like; RAMP1: proteína modificadora de atividade 1; RCP: proteína componente de receptor; AC: Adenilato Ciclase; Gs: proteína G estimulatória; AMPc: Adenosina monofosfato cíclico [FONTE: KASTIN, A. (2013)].

Sabe-se que o CGRP possui uma importante atividade vasodilatadora. No coração, provoca vasodilatação coronariana e aumenta a frequência cardíaca e a força de contração (WANG; FISCUS, 1989). Além disso, induz hipertrofia cardíaca (BELL et al., 1997; ITO et al., 1997), por mecanismos moleculares ainda não bem compreendidos, e exerce ação protetora cardíaca contra a isquemia, em modelos de pré-condicionamento isquêmico (BRAIN; GRANT, 2004; LI et al., 1996). O CGRP também é um importante fator angiogênico para a formação microvascular na doença do coração (LI et al., 2013). Há evidências de que a ação cardioprotetora do CGRP esteja associada à ativação de vias de sinalizações da PI3K/Akt e ERK1/2, que levam à inibição da apoptose por restauração do complexo Bcl-2/Bax (UMOH et

al., 2014). Estudos demonstram que pequenas injeções subcutâneas de CGRP provocam aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação da pele (BRAIN et al., 1985). Este efeito também é observado em vasos cerebrais, coronários e renais e pode ser bloqueado pela administração do CGRP₈₋₃₇ (BRAIN; GRANT, 2004), um antagonista competitivo do receptor CLR (CHIBA et al., 1989), que diferentemente do peptídeo endógeno não possui o primeiro domínio da molécula formado pelos primeiros sete resíduos do terminal NH₂, em forma de anel.

O CGRP possui um importante papel fisiológico na nocicepção. É considerado um dos principais mediadores da dor crônica e exerce um papel central na patogênese da enxaqueca. É bem estabelecido que este neuropeptídeo é liberado pelas fibras aferentes do nervo trigemial, durante a crise da enxaqueca, causando vasodilatação e inflamação neurogênica (GALLAI et al., 1995; GOADSBY; EDVINSSON; EKMAN, 1988; RUSSELL et al., 2014). Em função disso, em 2018, o *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA, aprovou medicamentos à base de anticorpos monoclonais contra o CGRP para combater esta doença que acomete, aproximadamente, 15% da população mundial (EDVINSSON et al., 2018; STEINER; STOVNER; BIRBECK, 2013).

Embora as evidências mostrem que as drogas anti-CGRP não causem efeitos indesejáveis em humanos e animais (MAASSENVANDENBRINK et al., 2016), estudos mais recentes indicam que este peptídeo possui um papel regulatório no controle do metabolismo intermediário (LIMA et al., 2017). Por exemplo, Danaher et al. (2008) demonstraram que o CGRP afeta o metabolismo lipídico em músculos esqueléticos de ratos, promovendo aumento da degradação de triglicerídeos e da β -oxidação de ácidos graxos. Foi também demonstrado que o tratamento com CGRP *in vivo* (100 pmol/Kg por 60 minutos) em ratos aumenta a concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGLs) e lactato e diminui a de triglicerídeos, mas não causa mudanças nas concentrações plasmáticas de catecolaminas e insulina. Por outro lado, a administração periférica de CGRP na concentração de 50 μ g/Kg em ratos, aumentou os níveis plasmáticos de glucagon e diminuiu os de insulina (SUN et al., 2010). Contudo, ainda são escassas as informações na literatura acerca do papel do CGRP no controle do metabolismo de proteínas e, mais especificamente, na autofagia.

1.2 Autofagia

Autofagia refere-se a um processo catabólico celular em que organelas ou proteínas citoplasmáticas danificadas, disfuncionais ou nocivas são transportadas até o lisossomo para que assim sejam degradadas (MIZUSHIMA et al., 2008; RAVIKUMAR et al., 2010). Essa manutenção da degradação de componentes celulares é essencial para o crescimento, desenvolvimento e função de células normais (LEVINE; KROEMER, 2008). São conhecidos, basicamente, três tipos de autofagia denominadas como macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (AMC). A microautofagia consiste na invaginação da própria membrana lisossomal, engolfando conteúdos citoplasmáticos, enquanto a AMC está relacionada com a degradação de componentes marcados por chaperonas que são reconhecidos por receptores específicos na membrana lisossomal. A macroautofagia (aqui denominada de autofagia) é caracterizada pela formação do autofagossomo que se funde com lisossomo para a formação do autolisossomo (Figura 2).

O processo de autofagia ocorre em praticamente todas as células do organismo e é composto por três fases distintas: iniciação, alongamento e maturação. Como pode ser visualizado na Figura 2, a fase inicial da formação do autofagossomo requer ativação de Ulk1 (*Unc51-like kinase 1*) que está complexada a outras duas proteínas: Atg13 (*Autophagy-related protein 13*) e FIP200 (*kinase Family interactin protein of 200 kD*). O complexo Beclin1-PI3K III-p150 também é necessário nesta fase inicial. A PI3K-III (proteína quinase fosfatidilinositol-3-quinase de classe III) encontra-se complexada com Beclin-1 e esta interação é essencial para a geração de PIP3 (fosfatidilinositol-3-fosfato) e consequente formação do pré-autofagossomo (ALERS et al., 2012). Beclin-1 pode ser negativamente regulada por proteínas apoptóticas como Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e Bcl-x (*B-cell lymphoma – extra*) (DECUYPERE; PARYS; BULTYNCK, 2012). Outras proteínas interagem com estes complexos e induzem a autofagia, como AMBRA-1 (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*) (MARIA FIMIA et al., 2007), UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*) (LIANG et al., 2006) e BIF-1 (*Bax-interacting factor 1*) (TAKAHASHI et al., 2007).

A etapa seguinte de alongamento do autofagossomo requer duas reações: Inicialmente, Atg 5 conjuga-se com Atg 12, as quais se ligam a Atg 16L, formando um complexo que é recrutado até o autofagossomo (MIZUSHIMA et al., 2003). A

segunda reação envolve a proteína LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) que é clivada por Atg 4 dando origem à isoforma citosólica LC3-I. Por sua vez, LC3-I é conjugada com fosfatidiletanolamina (PE), por meio de reações envolvendo Atg 7 e 3, e assim é convertida à LC3-II. A isoforma LC3-II, ao contrário do complexo Atg5-Atg12-Atg16L, permanece associada à membrana do autofagossomo até a sua fusão com o lisossomo. Gabarap (*γ-aminobutyric receptor-associated protein*) é outra proteína essencial para a formação da membrana dupla do autofagossomo (KABEYA et al., 2000; TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2004). Dessa maneira, as proteínas LC3-II e Gabarap são importantes marcadores da atividade autofágica (KLIONSKY et al., 2016) (Figura 2).

A etapa de maturação do autofagossomo é caracterizada pela movimentação do mesmo em direção ao lisossomo, ao longo de microtúbulos. Este processo é finalizado pela fusão do autofagossomo com o lisossomo. A etapa de fusão envolve as proteínas ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), SNARES (*soluble NSF attachment receptor*), Rab7 (*Ras-related protein Rab-7a*) e o complexo protéico Classe C Vps (ATLASHKIN et al., 2003; GUTIERREZ et al., 2004; LEE et al., 2007). A proteína UVRAG recruta a maquinaria de fusão do autofagossomo, interagindo com proteínas do complexo C Vps e através dessa interação ativa Rab7, promovendo assim a fusão do autofagossomo com o lisossomo (LIANG et al., 2008). Outros fatores lisossomais como, por exemplo, a acidificação lisossomal, também são necessários para que ocorra a fusão do autofagossomo (YAMAMOTO et al., 1998) (Figura 2).

O lisossomo apresenta lúmen ácido (pH 4-5) e altas concentrações de hidrolases ácidas, dentre elas: proteases, glicosidases, nucleases, lipases e fosfatases. O requerimento de um pH ácido para a ativação destas enzimas, bem como seu isolamento físico pela membrana lisossomal são cruciais para evitar a digestão de constituintes celulares e extracelulares. As cathepsinas B, D, H e L são as principais proteases lisossomais e determinam a capacidade proteolítica dos lisossomos (BECHET et al., 2005).

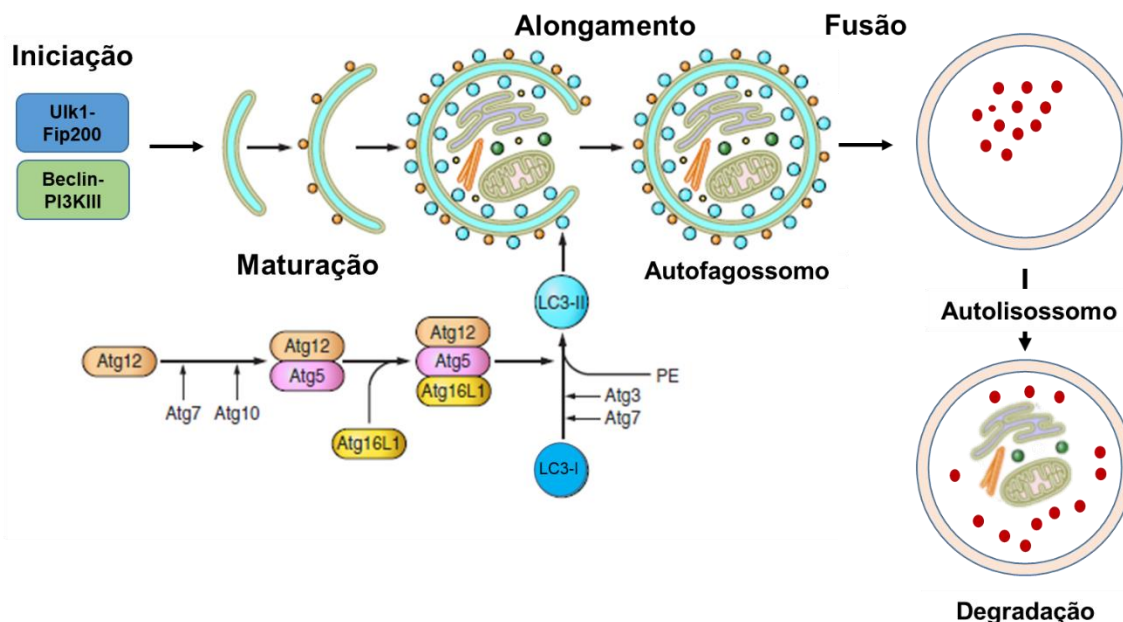


Figura 2: Representação esquemática do processo macroautofágico de entrega de substratos proteicos ao lisossomo. Ulk1: *Unc51-like kinase 1*; FIP200: *kinase Family interactin protein of 200 kD*; PI3K-III: proteína quinase fosfatidilinositol-3-quinase de classe III; Atgs: genes relacionados à autofagia; LC3: *microtubule-associated protein light chain 3* (Adaptado de MAEJIMA et al., 2015).

O processo autofágico é regulado por múltiplas cascatas de sinalização. Uma das mais bem descritas é a via de sinalização de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), um sensor de nutrientes celular que estimula a síntese proteica e inibe a autofagia (Ravikumar et al., 2004). A disponibilidade de nutrientes como aminoácidos e fatores de crescimento ativam mTOR, que por sua vez inibe a autofagia por meio da fosforilação de Ulk1 em resíduos de Ser⁷⁵⁷ (EGAN et al., 2011; KIM et al., 2011). Por outro lado, a diminuição de fatores de crescimento e a depleção de nutrientes inibem a atividade da mTOR e com isso ativam a autofagia, sendo este ajuste metabólico essencial para a sobrevivência celular (GANLEY et al., 2009).

A AMPK (proteína quinase ativada por AMPK) também possui um papel importante na regulação da atividade da mTOR. Sabe-se que a AMPK é bastante sensível ao estado energético da célula, sendo ativada pelo aumento da relação AMP/ATP. Dessa maneira, a ativação de AMPK leva à inibição da atividade da mTOR e ao consequente aumento da autofagia. AMPK também promove a autofagia diretamente por uma fosforilação estimulatória em Ulk1 nos resíduos de Ser³¹⁷ (EGAN et al., 2011; KHAN; KUMAR, 2012).

É bem estabelecido que FoxO (*Forkhead box class O*) é um importante regulador transcricional dos genes que codificam as proteínas autofágicas (ZHAO et al., 2010). Dessa forma, acredita-se que o sistema proteolítico autofágico/lisossomal seja negativamente regulado por uma via de sinalização envolvendo a fosforilação da Akt, que por sua vez fosforila e inativa FoxO (Mammucari et al. 2007). A via da Akt (ou proteína quinase B) é sabidamente estimulada pela insulina e fatores de crescimento como os IGFs (Fatores de crescimento semelhantes à insulina) (ALESSI; COHEN, 1998). Portanto, a redução destes fatores anabólicos observada em situações de demanda energética como o jejum e o diabetes mellitus contribui para a ativação da autofagia. De fato, Kanamori et al. (2009) demonstraram que há um aumento do fluxo autofágico muscular a partir de 12 horas de jejum em camundongos e este aumento prossegue até 3 dias de deprivação nutricional.

1.3 Regulação da autofagia pelo AMPc

A manutenção da massa dos diferentes tecidos do organismo depende de um fino balanço entre os processos de síntese e degradação de proteínas, cujas atividades são reguladas por fatores hormonais, neurais e nutricionais. O sistema proteolítico autofágico/lisossomal e a síntese proteica podem ser diretamente regulados pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS), sendo grande parte destes efeitos mediados pela cascata de sinalização do AMPc e ativação de PKA e/ou Epac1, que contêm domínios de ligação ao AMPc evolutivamente conservados. A descoberta da regulação da autofagia pelo SNS foi feita a partir de experimentos de nosso laboratório realizados, inicialmente, em músculos esqueléticos e no tecido adiposo marrom de roedores submetidos a diferentes modelos de simpatectomia (BAVIERA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012; SILVEIRA et al., 2014), ou ao tratamento *in vivo* e *in vitro* com β -agonistas (GONÇALVES et al., 2012) e inibidores da fosfodiesterase do AMPc (LIRA et al., 2011). Posteriormente, foi demonstrado o papel antiproteolítico das catecolaminas em cultura de cardiomiócitos primários. Os resultados obtidos mostraram, claramente que tanto a noradrenalina como agonistas adrenérgicos β 1 e β 2, reduzem a expressão dos genes autofágicos por meio da via de sinalização do AMPc/PKA (Paula-Gomes, 2013). Assim como as catecolaminas, sabe-se que grande parte das ações do CGRP envolve a sinalização do AMPc/PKA. Machado et al. (2016) investigaram o papel modulatório deste peptídeo e

demonstraram que o CGRP, via ativação do AMPc, reduz a proteólise em músculos EDL e *soleus* de ratos normais e desnervados. Nesse estudo, foi verificado que o sistema proteolítico autofágico/lisossomal é o responsável pelos efeitos anti-proteolíticos induzidos pelo CGRP, em condições *in vivo* e *in vitro*. Estes efeitos foram associados à maior fosforilação da Akt e de FoxO1 assim como à menor expressão de genes e proteínas relacionados ao controle do fluxo autofágico. Considerando que a autofagia está envolvida com a degradação dos receptores colinérgicos nicotínicos (AChRs), investigamos mais recentemente (MACHADO et al., 2019) os efeitos do CGRP na placa motora e observou-se que o tratamento sistêmico com este peptídeo atenuou a redução da área da sinapse muscular induzida pela secção do nervo motor e preveniu a indução de fluxo autofágico e genes relacionados à autofagia, fornecendo assim novas perspectivas de tratamento para as síndromes miastênicas congênitas.

Come base nas evidências citadas anteriormente que demonstram que o CGRP pode agir diretamente no coração e é capaz de controlar o metabolismo proteico no músculo esquelético por meio da cascata de sinalização do AMPc, tornou-se interessante estudar o papel deste peptídeo no metabolismo proteico cardíaco. Dessa forma, a hipótese do presente trabalho é que o CGRP, por meio do recrutamento da via canônica de sinalização do AMPc/PKA, iniba a proteólise autofágica lisossomal em coração de camundongos. A compreensão desta nova função do CGRP poderá contribuir futuramente para a aplicação deste peptídeo ou de seus antagonistas em patologias cardíacas como a insuficiência cardíaca e a cardiomiopatia diabética, doenças essas relacionadas com a alteração da massa cardíaca.

Objetivos

2. Objetivo geral

O presente estudo tem como principal objeto investigar os efeitos agudos do tratamento com CGRP na modulação da autofagia cardíaca em camundongos.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar temporalmente (15, 30 e 60 minutos) o efeito do CGRP na ativação da via de sinalização do AMPc no tecido cardíaco de camundongos e as alterações metabólicas (glicose, AGLs, glicerol e glicogênio hepático) e hormonais (insulina e catecolaminas) associadas;
2. Avaliar o conteúdo proteico dos principais marcadores autofágicos (LC3-II/LC3-I, p62 e Beclin1) no coração de camundongos tratados sistemicamente com o CGRP, ao longo do tempo;
3. Avaliar a marcação de LC3-II em ventrículos cardíacos de camundongos tratados com CGRP, após 60 minutos;
4. Avaliar o fluxo autofágico *in vivo* no coração, após 60 minutos do tratamento com CGRP;
5. Avaliar o conteúdo proteico cardíaco de LC3-II em resposta ao tratamento com o antagonista do CGRP (CGRP₈₋₃₇);
6. Avaliar o efeito do CGRP na autofagia cardíaca em uma condição de jejum de 24 horas;
7. Avaliar o efeito temporal do tratamento com CGRP na via de sinalização clássica da insulina/IGF-1 (Akt/FoxO1) e nas duas principais vias regulatórias do processo autofágico: mTOR/ULK^{Ser757} e AMPK/ULK^{Ser317}, em coração de camundongos alimentados.
9. Avaliar, em cultura primária de cardiomiócitos, o efeito temporal do CGRP nas vias de sinalizações de PKA/CREB e de Akt/mTOR.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, da linhagem C57/Bl6, provenientes do Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto (PCARP). Os camundongos com idade inicial de seis semanas de vida foram mantidos em grupos de cinco em isoladores em rack ventilado, no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica & Imunologia da FMRP-USP. Os animais receberam dieta balanceada (NUVILAB CR1 – NUVITAL) para roedores e água *ad libitum* em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $\pm 55\%$. Após completarem oito semanas de vida os animais foram divididos em grupos experimentais.

Os experimentos foram realizados sempre pela manhã, entre as 07 e 10 hs e o sacrifício dos animais foi realizado por deslocamento cervical ou decapitação (quando necessária coleta de sangue). Os corações foram imediatamente removidos, lavados com salina 0,9% e após a remoção dos átrios, artérias e veias, os ventrículos eram secos e pesados em balança digital (ACATEC BEM 0100®) para posterior homogeneização.

Para a cultura de cardiomiócitos foram utilizadas 40 ratas neonatas de até 3 dias de vida provenientes do Biotério Central. Estes animais foram sacrificados dentro do fluxo laminar no mesmo dia do experimento e os corações foram utilizados para preparação da cultura primária de cardiomiócitos.

3.2 Delineamento experimental

Protocolo experimental 1: Camundongos C57Bl6 alimentados foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo controle (Controle, n=5) tratado com salina 0,9% via subcutânea (s.c) e grupo CGRP (CGRP, n=15) tratado com uma injeção de CGRP (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ - via s.c.). O grupo CGRP foi subdividido em três grupos sacrificados após 15 (CGRP 15', n=5), 30 (CGRP 30', n=5) ou 60 minutos (CGRP 60', n=5). O grupo Controle foi sacrificado, após 15 minutos da injeção de salina, Em seguida, o sangue e o coração foram coletados para análises moleculares e bioquímicas (Figura 3).

Protocolo experimental 2: Camundongos C57Bl6 alimentados foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo controle (n=5) tratado com salina 0,9% (via s.c.); Grupo controle tratado previamente com colchicina por três dias (0,4 mg/Kg – via intraperitoneal) (Controle + Colchicina, n=5); Grupo CGRP (n=5) tratado com uma injeção de CGRP (100 µg/Kg- via s.c.); Grupo CGRP tratado previamente com colchicina por três dias (CGRP + Colchicina, n=5). Todos os animais foram sacrificados após 60 minutos da administração de CGRP ou salina e o coração foi coletado para análise do fluxo autofágico (Figura 3).

Protocolo experimental 3: Camundongos alimentados foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo tratado com salina (Controle, n=5) ou CGRP (CGRP 60', n=5). Após 60 minutos do tratamento, os animais foram sacrificados e o coração foi coletado e utilizado para análise da marcação proteica de LC3-II por imunofluorescência (Figura 3).

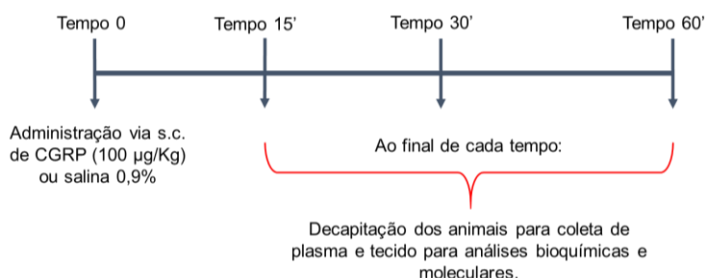
Protocolo experimental 4: Camundongos alimentados foram tratados com o antagonista (100 µg/Kg; via intraperitoneal) ou salina e 30 minutos após foram divididos em 4 grupos experimentais: Grupo tratado com salina (Controle, n=5); Grupo tratado com o antagonista (n=5); Grupo tratado com CGRP (CGRP, n=5); Grupo tratado com CGRP e antagonista (CGRP + antagonista, n=5). Após 90 minutos da injeção do antagonista, os animais foram sacrificados e o coração foi coletado e utilizado para análises moleculares (Figura 3).

Protocolo experimental 5: Camundongos C57Bl6 foram mantidos em jejum por 24 horas para ativação da autofagia. No dia do experimento, estes animais foram divididos nos seguintes grupos: Grupo controle (n=5) tratado com salina; Grupo controle tratado previamente com colchicina por três dias (Controle + Colchicina, n=5); Grupo tratado com uma injeção de CGRP (CGRP, n=5); Grupo CGRP tratado previamente com colchicina (CGRP + Colchicina, n=5). Todos os animais foram sacrificados após 60 minutos da administração de CGRP ou salina e o coração foi coletado para análise do fluxo autofágico (Figura 3).

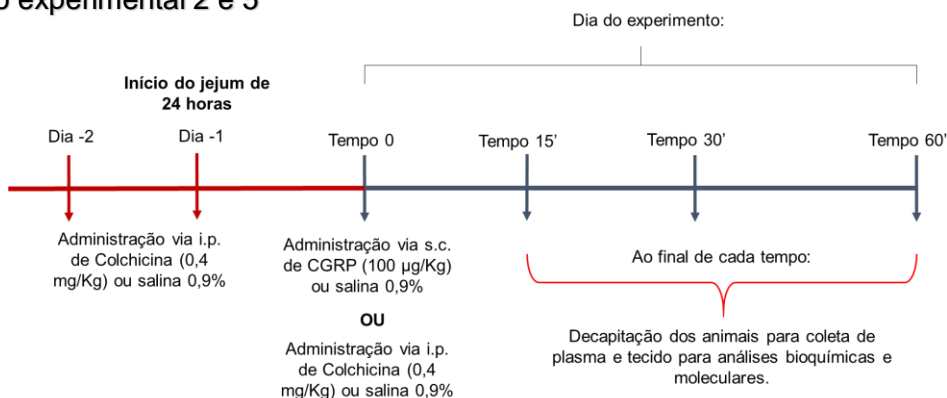
Protocolo experimental 6: Cardiomiócitos primários de ratos neonatos foram incubados na presença ou ausência do CGRP ($1\mu\text{M}$) para a análise das vias de sinalização.

Os protocolos experimentais estão esquematizados na figura 3.

Protocolo experimental 1



Protocolo experimental 2 e 5



Protocolo experimental 3



Protocolo experimental 4

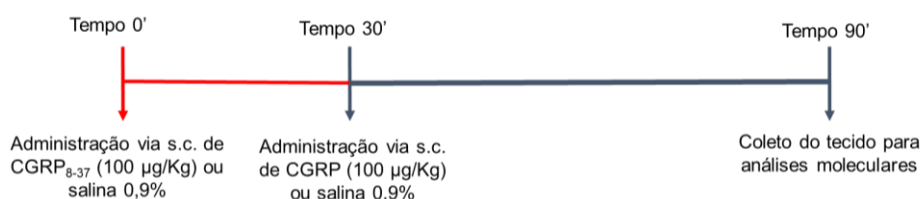


Figura 3: Esquematização dos protocolos experimentais.

3.3 Metodologia experimental

3.3.1 Análise *in vivo* do fluxo autofágico

Para a análise *in vivo* do fluxo autofágico, os grupos experimentais foram tratados com colchicina via intraperitoneal (i.p) (Sigma-Aldrich), na dose de 0,4 mg/Kg/dia ou veículo). A colchicina é uma droga capaz de bloquear a maturação do autofagossomo e, conseqüentemente, aumenta os níveis proteicos da LC3-II (JU et al., 2010). Os animais receberam três doses da droga, iniciando o tratamento dois dias antes do sacrifício. No dia do sacrifício, os animais receberam a injeção (i.p) uma hora antes da administração do CGRP (100 mg/Kg). Após a eutanásia, o ventrículo esquerdo foi retirado e as proteínas totais extraídas para a quantificação da LC3 pela técnica de Western blotting. O acúmulo da LC3-II no tratamento com colchicina reflete o fluxo autofágico conforme determinado, nas diretrizes para a investigação da autofagia (KLIONSKY et al., 2016).

3.3.2 Determinação de punctas de LC3 por imunofluorescência

O coração de animais tratados com salina ou CGRP por 60 minutos foram retirados e alocados em cassetes histológicos e permaneceram por 24 horas em paraformaldeído 10% em solução fosfato e água na geladeira. Após o período de 24 horas, o tecido passou por uma lavagem com álcool 50% e em seguida passou por um processo de desidratação com porcentagens crescentes de álcool: álcool 70%, 80%, 90%, 95%, álcool absoluto I, II e III todos por uma hora cada. Após este processo de desidratação o tecido seguiu para o processo de diafanização com xilol I, II e III por uma hora em cada. Em seguida o tecido era encaminhado para parafinização e passou por dois banhos em parafina: parafina I e II, ambos por duas horas em estufa a 60°C; então era submetido à vácuo de parafina por 10 minutos (Leica EG 1160®). O tecido foi cortado no micrótomo (Leica RM 2065®) em uma espessura de 6µm e as fatias foram colocadas em lâmina celanizada. Para o processo de imunofluorescência, a lâmina passou por processos de desparafinização com xilol e reidratação com álcool. A lâmina foi lavada com água destilada por duas vezes durante dois minutos cada. A recuperação antigênica foi feita com Citrato de Sódio (10 mM, pH 6,0) - 30 minutos a 55°C, seguida por um

tratamento com metanol gelado por dez minutos a 20°C. A lâmina foi bloqueada com Glicina (0,1 M) por 40 minutos, seguido por um bloqueio com BSA 5% por 40 minutos. Após bloqueio, a lâmina foi lavada três vezes com PBS por 5 minutos cada e permeabilizada em Triton X-100 0,5% diluído em PBS 1x por 30 minutos. A lâmina era novamente bloqueada com BSA 5% diluído em PBS 1x (solução de bloqueio) por duas horas e em seguida foi incubada com o anticorpo primário em solução de bloqueio *overnight* a 4°C (Anti-LC3b ab48394 – diluição de 1:2000). No dia seguinte, o anticorpo foi desprezado e a lâmina lavada com PBS 1x por três vezes durante 5 minutos cada. A incubação com anticorpo secundário foi feita em BSA 5% por uma hora (Anticorpo secundário 594 anti-rabbit, concentração 1:5000). Após uma hora repetiu-se o processo de lavagem com PBS e para marcação do núcleo utilizou-se DAPI 2ng/ml. Após marcação do núcleo, foram feitas três lavagens com PBS por cinco minutos cada, seguida por uma lavagem com água destilada. Foi colocada uma lamínula flambada e adicionada uma gota de Prolong Gold Antifade (P10144-Invitrogen). As lâminas foram analisadas em microscópio de imunofluorescência.

3.3.3 Cultura primária de cardiomiócitos de ratas neonatas

O coração de ratas Hannover neonatas (até 3 dias) foram retirados dentro da câmara de fluxo laminar e colocados em tampão ADS contendo NaCl (6,4mM), HEPES (18mM), NaH₂PO₄ (1mM), d-glucose (5,5mM), KCl (5,4mM) e MgSO₄ (0,4mM), pH7,4. Em seguida o tecido foi exposto a digestões enzimáticas com colagenase tipo II Worthinton® (37°C por 12 minutos). O produto das digestões foi transferido para um tubo Falcon® contendo 1ml de soro de bezerro (NCS) e centrifugados à 100rpm por 3 minutos. Após a centrifugação o pellet contendo as células foi ressuspendido em NCS. Para separar os miócitos dos fibroblastos, foi utilizado o gradiente de Percoll®. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com tampão ADS para remover todo o Percoll®, os miócitos foram plaqueados em placas de 6 poços em meio DMEM® contendo glicose, soro de bezerro (5%), soro de cavalo (10%) e streptomina/penicilina (1%) por 24 horas (KIM et al., 1995). No dia do experimento, o meio foi trocado para meio DMEM® com glicose e livre de soro. Os cardiomiócitos foram incubados na presença ou ausência de CGRP (1µM).

3.3.4 Determinação da Glicemia

A glicemia dos animais foi averiguada sempre antes do sacrifício dos animais através do uso de um glicosímetro da marca Accu-Chek®.

3.3.5 Determinação de ácidos graxos livres e glicerol

As concentrações plasmáticas de AGLs foram determinadas por meio do kit NEFA – Randox, que é um ensaio simples e colorimétrico, com um padrão de ácido palmítico e mede quantitativamente a concentração de AGLs (não esterificados) em várias amostras usando um formato de placa de microtitulação de 96 poços. As concentrações plasmáticas de glicerol foram determinadas por meio do kit enzimático comercial para dosagem de glicerol Bioclin da Quibasa®.

3.3.6 Determinação da insulina plasmática

A dosagem da insulina sérica foi feita com a utilização do kit comercial Rat/Mouse Insulin ELIZA EZRMI-13K (Millipore-EUA). Para isso, 10 µL de soro de cada amostra foram pipetados aos poços da placa de ELISA revestidos com anticorpo primário monoclonal anti-insulina previamente tratados com tampão de reação (0,025M EDTA; 0,08% azida sódica e 1% albumina bovina livre de ácidos graxos). Em seguida, foi adicionada solução anticorpo secundário ligado à biotina e incubado por duas horas à temperatura ambiente sob forte agitação. Depois acrescentada a solução contendo enzima peroxidase e, em seguida, o substrato 3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina. A reação foi interrompida após 15 minutos com solução HCl 0,3M. A quantidade de insulina presente em cada amostra é proporcional ao produto da reação da peroxidase com seu substrato, que pode ser quantificado por espectrofotometria, subtraindo-se os valores de absorbância obtidos para 590nm e para 450nm. Os resultados obtidos foram corrigidos em relação à regressão linear da curva padrão.

3.3.7 Determinação das catecolaminas

A avaliação indireta da atividade simpática foi feita por meio da mensuração do conteúdo de noradrenalina no coração e das catecolaminas no plasma dos animais utilizando-se método previamente padronizado em nosso laboratório (GAROFALO et al., 1996).

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical sob anestesia, o coração foi removido, lavado rapidamente em salina e homogeneizado em 5 ml de tampão contendo ácido perclórico 0,2N com EDTA 1mM e metabissulfito de sódio 1% como antioxidante. O homogenato foi centrifugado a 5000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de polietileno e foi adicionado 50 mg de albumina ativada, 1ml de tampão Tris 2M pH 8,9, contendo 0,5% de metabissulfito de sódio e 2,5% de EDTA e 20 µL do padrão interno bromidrato de 3,4-diidroxibenzilamina diluído 8 vezes. Os tubos foram agitados fortemente por 20 minutos em banho à temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma bomba à vácuo e a alumina foi lavada duas vezes com 3ml de solução lavadora contendo EDTA 20mM, Tris 2 M e metabissulfito de sódio 20%. Após cada lavagem, foi realizada uma centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. As catecolaminas foram eluídas da alumina por agitação com 800 µL de ácido perclórico 0,1 N durante 10 minutos. Alíquotas de 50 µl das amostras assim obtidas eram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) MODELO SAIMADZU PROEMINENCE®, acoplado a um detector eletroquímico DECADE LITE (ANTEC SCIENTIFIC®). Para a determinação das concentrações de adrenalina e noradrenalina plasmáticas, os animais foram sacrificados por decapitação sob anestesia e o sangue coletado em tubos de vidro heparinizados. Após centrifugação sob refrigeração a 4°C, alíquotas de 130 µl de plasma eram transferidas para tubos de plástico e o material processado e analisado como descrito anteriormente.

3.3.8 Análises das proteínas por *Westerb blotting*

Os ventrículos esquerdos de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram homogeneizados no aparelho TissueLyzerII (30Hz por 2 minutos) em 6 volumes do tampão TRIS-HCL (50mM; pH7,4; 4°C) contendo 150 mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (1 mM PMSF, 5µg/ml de aprotinina e 1 µg/ml de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10 mM ortovanadato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 100mM fluoreto de sódio). O homogenato foi centrifugado a 14000 rpm, 4°C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry e posteriormente para a determinação do conteúdo proteico por western blotting. A uma alíquota de sobrenadante foi adicionada ao tampão da amostra contendo SDS (4%), Tris-HCl (125 mM), glicerol (20%), DTT (100 mM), azul de bromofenol (2%, pH 6,8). A eletroforese em gel SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram aquecidas a 70°C por 10 minutos e aplicadas em sistema de mini gel vertical (modelo Protean III Cell BioRad®) de acrilamida:bisacrilamida com 0,75 mm de espessura e gel de separação variando de 6 a 18% de acordo com o peso molecular da proteína analisada. Foi utilizado padrão de peso molecular PageRuler™ Prestainer Protein LAdder (10-170 kDa; Fermentas LifeSciences, EUA). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico contendo tampão de corrida [Tris-HCl (25 mM e pH 8,4), glicina (115 mM), SDS (0,1%)], sob voltagem de 100 Volts, durante 2 horas.

Após a corrida eletroforética, o gel foi separado para a transferência (BioRad® TransBlot SD Cell, EUA) de acordo com o método descrito por Towbin et al. (1979). Inicialmente, o gel e a membrana de nitrocelulose (NC) foram colocados na solução de transferência contendo Tris (48 mM), glicina (39 mM), SDS (10%) e metanol (0,2 M), pH 7,4. Após a montagem do sistema, as proteínas presentes no gel de poli-acrilamida foram transferidas para a membrana de NC, sendo o processo de transferência realizado durante 30 minutos sob a amperagem de 400mA e voltagem fixa máxima de 25 volts, à temperatura ambiente. Após o término da transferência, a membrana de NC foi submetida a imunoblot, sendo incubada por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente em solução de leite desnatado em pó 10% em solução de TBS-T contendo Tris-HCl (0,02 M), NaCl (0,16 M) e Tween 20 (0,1%), pH

7,4. Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight a 4°C (aproximadamente 12 horas) com anticorpos primários das proteínas analisadas (Tabela 1). As diluições dos anticorpos primários foram realizadas em solução de TBS-T contendo 2,5% de albumina bovina sérica e 0,01% de azida sódica. Os anticorpos foram retirados e as membranas devidamente lavadas com solução de TBS-T, posteriormente incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente, como anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidases: Anti-IgG de coelho (Cell Signaling®) (diluição de 1:1000- 1:8000 em TBS-T), anti, IgG de camundongo (KPL®) (diluição de 1:500 – 1:10000 em TBS-T). Após a lavagem das membranas para remoção do excesso de anticorpo secundário não ligado, a membrana foi revelada em sistema de detecção de imagem ChemiDoc XRS+System (BioRad Laboratories Inc., EUA), variando entre 2 a 10 minutos após a adição do reagente de quimioluminescência, composto por Tris/HCl (1 M, Ph 8,5), luminol (250 mM), ácido cumárico (90 mM) e H₂O₂ (0,01%). As bandas reveladas foram fotografadas e quantificadas por densitometria utilizando o software ImageJ (Fiji is Just) versão 1.52d (*National Institutes of Health*, EUA). Após a quantificação densitométrica das proteínas, o valor obtido na análise foi dividido pela densitometria da β -actina, proteína constitutiva utilizada como referência em todos os experimentos. Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (*i.e* 100%).

Tabela 1: Concentração dos anticorpos primários e secundários usados no *Western Blotting*

Anticorpo (Ac)	Fornecedor	Concentração do Ac primário	Concentração do Ac secundário
Akt total	Cell signalling	1:1000	1:1000
AMPK total	Cell signalling	1:750	1:1000
CREB total	Cell signalling	1:500	1:1000
fosfo-Akt^{Ser473}	Cell signalling	1:1000	1:1000
fosfo-Akt^{Thr308}	Cell signalling	1:500	1:1000
fosfo-AMPK^{Thr172}	Cell signalling	1:1000	1:1000
fosfo-CREB^{Ser133}	Cell signalling	1:500	1:1000
fosfo-FoxO1^{Ser256}	Cell signalling	1:500	1:1000
fosfo-mTOR^{Ser2448}	Cell signalling	1:500	1:2000
fosfo-LHS^{Ser660}		1:1000	1:1000
fosfo-S6^{Ser235/236}	Cell signalling	1:1000	1:1000
fosfo-ULK1^{Ser317}	Cell signalling	1:500	1:1000
fosfo-ULK1^{Ser757}	Cell signalling	1:500	1:1000
FoxO1 total	Cell signalling	1:1000	1:1000
LC3b	Cell signalling	1:1000	1:1000
mTOR total	Cell signalling	1:500	1:2000
p62	PROGEN Biotechnik	1:750	1:3000
S6 total	Cell signalling	1:1000	1:1000
Substratos fosfo- (Ser/Thr) PKA	Cell signalling	1:1000	1:1000
ULK1 total	Cell signaling	1:500	1:1000
β-actina	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	1:5000

3.3.9 Avaliação da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

O RNA das amostras do ventrículo esquerdo dos corações foi extraído pelo método de Trizol™ (Invitrogen, EUA) e quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (260 nm). Após o tratamento de 1µg de RNA total com DNase, foi adicionado o primer oligo (dT) 12-18 (20 pmols; Invitrogen, EUA) e dNTPmix (10 mM) (PROMEGA) em volume total de 13µL, sendo as misturas preparadas em água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% e autoclavada). Após o aquecimento a 65°C por 5 minutos e posterior resfriamento a 4°C, seguiu-se a adição da enzima transcriptase reversa (Super Script IV) e demais reagentes (tampão de reação 5x SST IV, DTT, RNase Outinhibitor) e assim, a submissão ao ciclo 23°C-10 min, 55°C-10 min, 80°C-10 min e infinito a 4°C. Os cDNAs foram posteriormente submetidos ao PCR em tempo real utilizando-se Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen) com sequências de primers específicos descritos na tabela 2. Os resultados foram adquiridos em sistema de detecção Perkin-Elmer ABI Prism 7500 com os seguintes parâmetros: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto), seguido pelo ciclo de dissociação: 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto) e 95°C (15 segundos) para verificação de um produto através de análise pela curva melting. Para análise do RNAm, o nível relativo da expressão do gene de interesse foi calculado em referência à expressão de RPL39 (ribossomal protein 39), que representa o controle interno endógeno (housekeeper gene), utilizando-se o método $2^{-2\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2: Sequências dos primers utilizados para as reações de PCR em tempo real.

Gene	Sequência dos Primers
<i>LC3b</i>	<i>Forward:</i> CGTCCTGGACAAGACCAAGT <i>Reverse:</i> ATTGCTGTCCCGAATGTCTC
<i>Gabarap1</i>	<i>Forward:</i> CATCGTGGAGAAGGCTCCTA <i>Reverse:</i> ATACAGCTGGCCCATGGTAG
<i>Cathepsina L</i>	<i>Forward:</i> TGGACTGTTCTCACGCTCAAG <i>Reverse:</i> TCCGTCCTTCGCTTCATAGG
<i>PGC-1α</i>	<i>Forward:</i> AATCCAGCGTCTTAGCACT <i>Reverse:</i> TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA
<i>SIK1</i>	<i>Forward:</i> TCCACCACCAAATCTCACCG <i>Reverse:</i> GTTTCGGCGCTGCCTCTTC
<i>RPL39</i>	<i>Forward:</i> CAAAATCGCCCTATTCCTCA <i>Reverse:</i> AGACCCAGCTTCGTTCTCCT

3.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos resultados entre os grupos experimentais foi realizada através do test ONE WAY ANOVA (pós-teste Tukey), considerando $p < 0,05$ como nível de significância. Quando necessário foi utilizado o test “t” de Student, considerando $p < 0,05$.

Resultados

4. Resultados

4.1 Parâmetros metabólicos e hormonais

Os resultados do efeito do tratamento (s.c.) com CGRP, na dose de 100 µg/Kg, na glicemia, insulinemia e no conteúdo de glicogênio hepático estão apresentados na figura 4. Verifica-se que o tratamento com CGRP provocou um aumento na glicemia destes animais (~55%), em todos os tempos investigados. (figura 4A). Em concordância com este aumento da glicemia, observou-se que os animais tratados com CGRP apresentaram uma pronunciada redução das concentrações plasmáticas de insulina (~79%), quando comparados com os controles tratados com salina (figura 4B). Para verificar uma possível origem deste efeito hiperglicêmico, foi mensurado o glicogênio hepático dos animais controles e tratados, após 60 minutos (figura 4C). Não foram observadas alterações no conteúdo de glicogênio hepático, após 60 minutos do tratamento, em ambos os grupos. Estes primeiros resultados nos indicam que o CGRP possui importante papel na inibição da secreção de insulina, que resulta no aumento da glicose circulante.

O tratamento sistêmico com CGRP também provocou aumento na concentração plasmática de AGLs, após 30 minutos (~33%) (figura 5A) e diminuiu a concentração plasmática de glicerol, em 30 e 60 minutos (~50%), indicando um possível efeito lipolítico (figura 5B) acompanhado de uma maior utilização de glicerol. Como pode ser observado na figura 6, não houve alterações nas concentrações plasmáticas de adrenalina, entretanto houve redução significativa nas concentrações plasmáticas de noradrenalina, em relação ao controle, nos tempos de 15 (~83%) e 30 (~56%) minutos (figura 6A). Em relação ao conteúdo de noradrenalina no tecido cardíaco, não foram observadas diferenças entre os grupos controle e tratados (figura 6B).

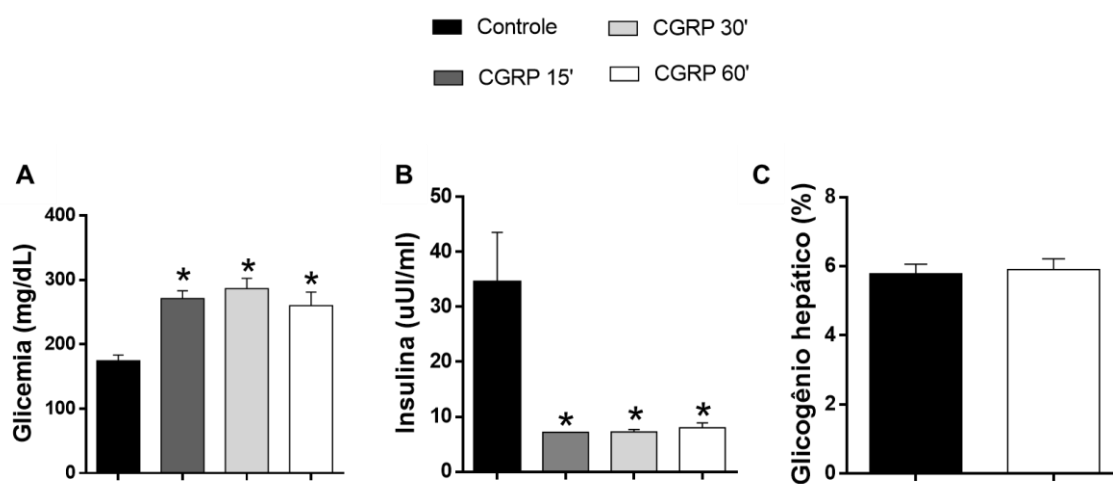


Figura 4: Efeito do tratamento com CGRP (100 µg/Kg; s.c), após 15, 30 e 60 minutos, na glicemia (A), insulinemia (B) e no conteúdo hepático de glicogênio (C) em camundongos alimentados. Os resultados são expressos como média ± EPM (n=5). *p<0,05 vs. o grupo controle tratado com salina.

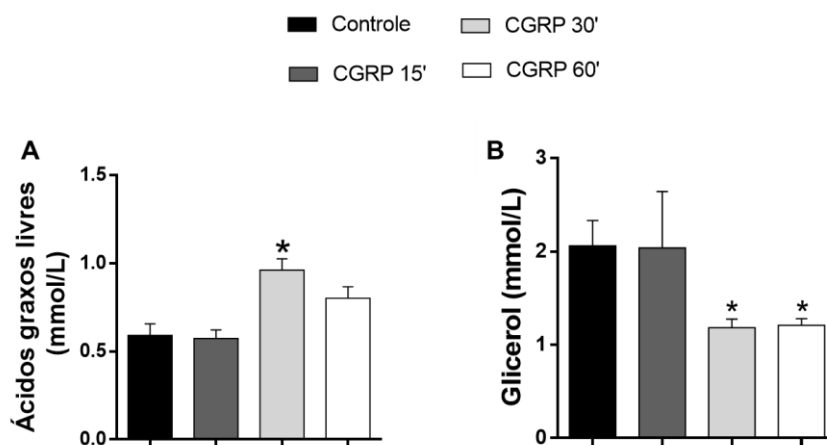


Figura 5: Efeito do tratamento com CGRP (100 µg/Kg; s.c), após 15, 30 e 60 minutos, nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (A) e glicerol (B) em camundongos alimentados. Os resultados são expressos como média ± EPM (n=5). *p<0,05 vs. o grupo controle tratado com salina.

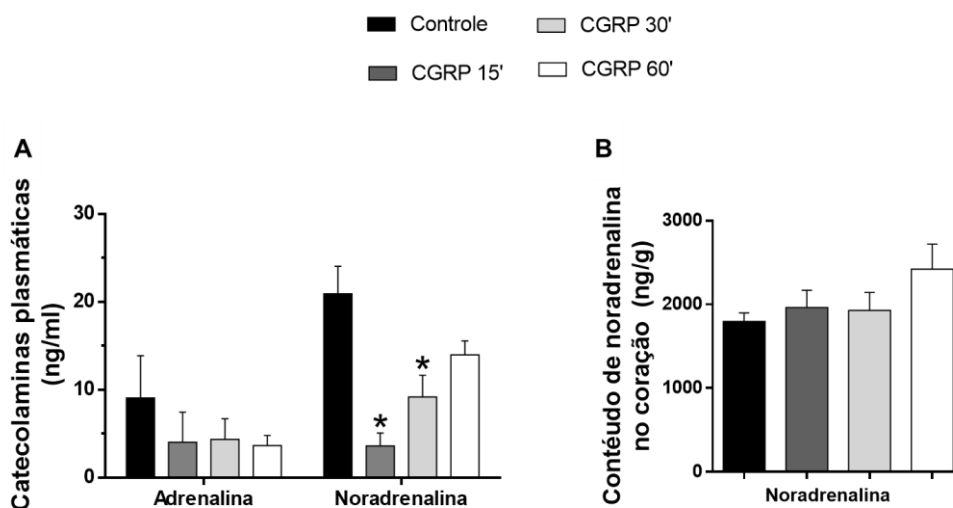


Figura 6: Efeito do tratamento com CGRP (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; s.c), após 15, 30 e 60 minutos nas concentrações plasmáticas de catecolaminas (A) e no conteúdo de noradrenalina no coração (B) de camundongos alimentados. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5). * $p < 0,05$ vs controle tratado com salina.

4.2 Parâmetros moleculares no coração de camundongos in vivo

4.2.1 Efeito do tratamento com CGRP na via de sinalização do AMPc

Tendo em vista que grande parte das ações do CGRP, em diferentes tecidos, envolve a participação da via de sinalização do AMPc (RUSSELL et al., 2014), o

presente estudo avaliou os componentes *downstream* ao AMPc no coração, em diferentes tempos após a administração da droga. Estes resultados estão apresentados na figura 7 e mostram que o tratamento sistêmico com CGRP foi capaz de aumentar significativamente o estado de fosforilação de CREB (~3x) logo após 15 minutos (figura 7B) sendo esta resposta rapidamente revertida no tempo de 60 minutos. Foi também observado aumento da fosforilação da Lipase Hormônio Sensível (55%) aos 30 minutos (figura 7B), uma proteína alvo de ação da PKA e que nos indica, indiretamente, a atividade desta quinase. Além disso, ao avaliarmos o conteúdo dos substratos fosforilados de PKA (figura 7C), verificou-se que houve uma tendência de aumento em resposta ao tratamento. Em concordância com estes resultados, observou-se um aumento significativo na expressão gênica de SIK1 (~2x) e uma tendência de aumento em PGC1- α , dois genes cujas expressões são sabidamente ativadas por CREB (figura 7D). Dessa maneira, o conjunto destes dados nos sugere que o CGRP é capaz de ativar rapidamente sua via de sinalização canônica no coração de camundongos alimentados, o que valida, portanto, nosso modelo experimental.

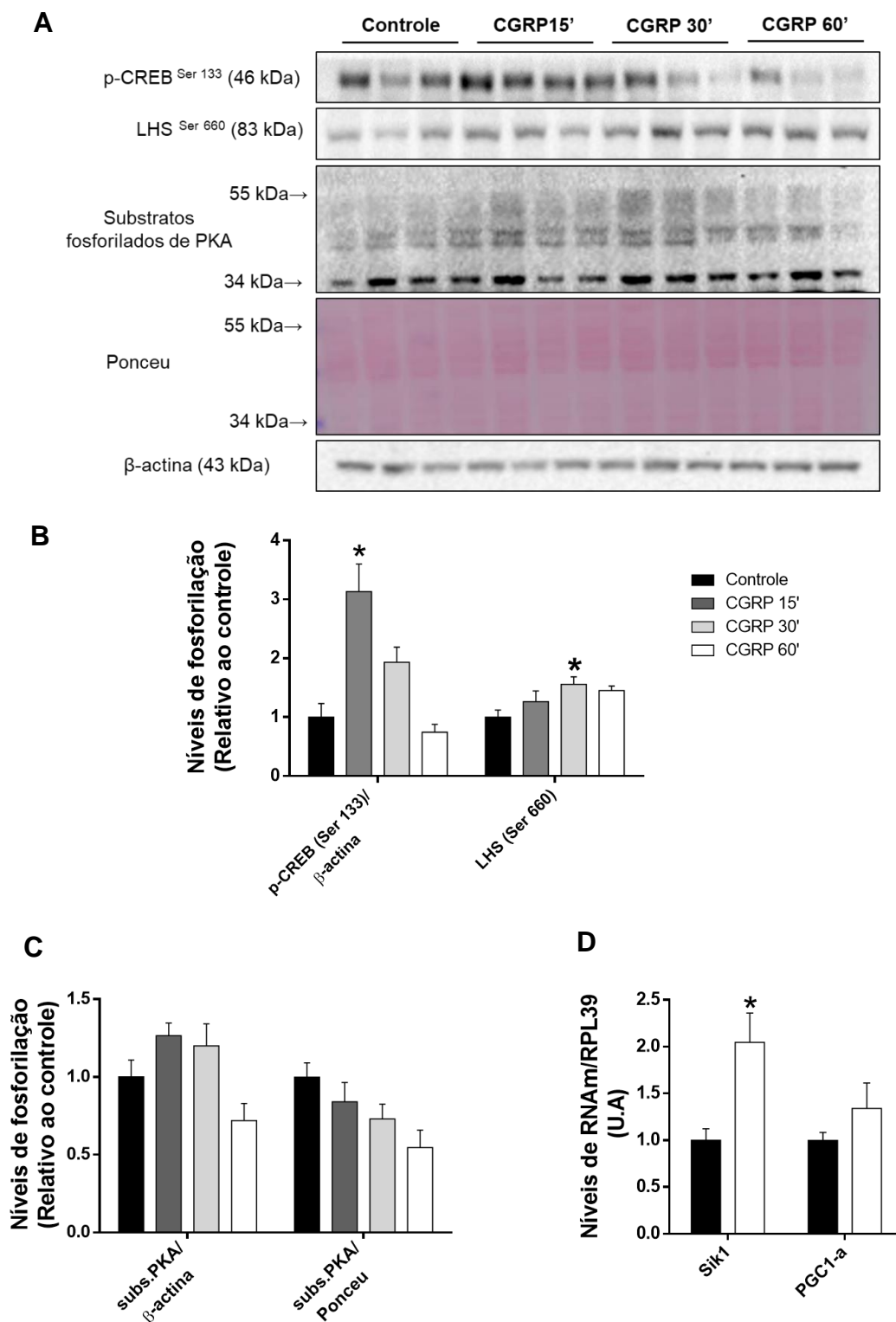


Figura 7: Efeito do tratamento com CGRP (100 μ g/Kg; s.c), após 15, 30 e 60 minutos, no estado de fosforilação de CREB^{Ser133}, LHS e dos substratos de PKA no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentadas nas figuras B e C. O efeito do CGRP, após 60 minutos, na expressão gênica de SIK1 e PGC1- α são mostrados na figura D. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5). *p<0,05 vs controle tratado com salina .

4.2.2 Efeito do tratamento com CGRP em diferentes marcadores autofágicos cardíacos

Baseados em estudos anteriores do nosso laboratório, no qual foi demonstrado que o CGRP é capaz de inibir a autofagia em músculo esquelético de camundongos desnervados (MACHADO et al., 2016), analisamos inicialmente o conteúdo proteico de dois marcadores autofágicos clássicos: LC3-II e p62. Como citado anteriormente, a forma lipidada LC3-II é responsável pela formação e expansão da membrana dupla do autofagossomo, enquanto que a p62/SQTM1 (*sequestosome 1*) é uma proteína que se liga a LC3-II, sendo degradada juntamente a ela pelo lisossomo (KLIONSKY et al., 2016). Nossos resultados demonstraram que o CGRP aumentou o conteúdo proteico de LC3-I (forma não lipidada) nos tempos de 15 (~2x) e 30 (69%) minutos e de LC3-II em 15 (56%), 30 (98%) e 60 (67%) minutos. Ao analisarmos a razão entre essas duas isoformas não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos tratados com CGRP e salina (figura 8B). Entretanto, há uma clara tendência de redução desta relação aos 15 minutos, indicando uma possível regulação inibitória da autofagia cardíaca pelo CGRP, neste intervalo de tempo. Em concordância com estes achados, o tratamento com CGRP foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de p62 (48%), em 15 minutos (figura 8C), o que indica menor degradação lisossomal. Outra importante proteína relacionada à iniciação da formação do autofagossomo é Beclin-1 (LIANG et al., 2008). Entretanto, ao analisá-la, não foi observada diferença em seu conteúdo proteico entre animais tratados com CGRP e salina (figura 8C).

Considerando que a LC3-II, mas não a LC3-I, foi aumentada significativamente no intervalo de 60 minutos e esta resposta poderia indicar aumento da autofagia, analisou-se neste período de tempo o número de estruturas positivas (*punctas*) de LC3-II pela marcação com anti-LC3 por imunofluorescência (figura 9). Nesta análise, não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e o tratado, entretanto o grupo tratado apresentou uma tendência de aumento no número de *punctas*.

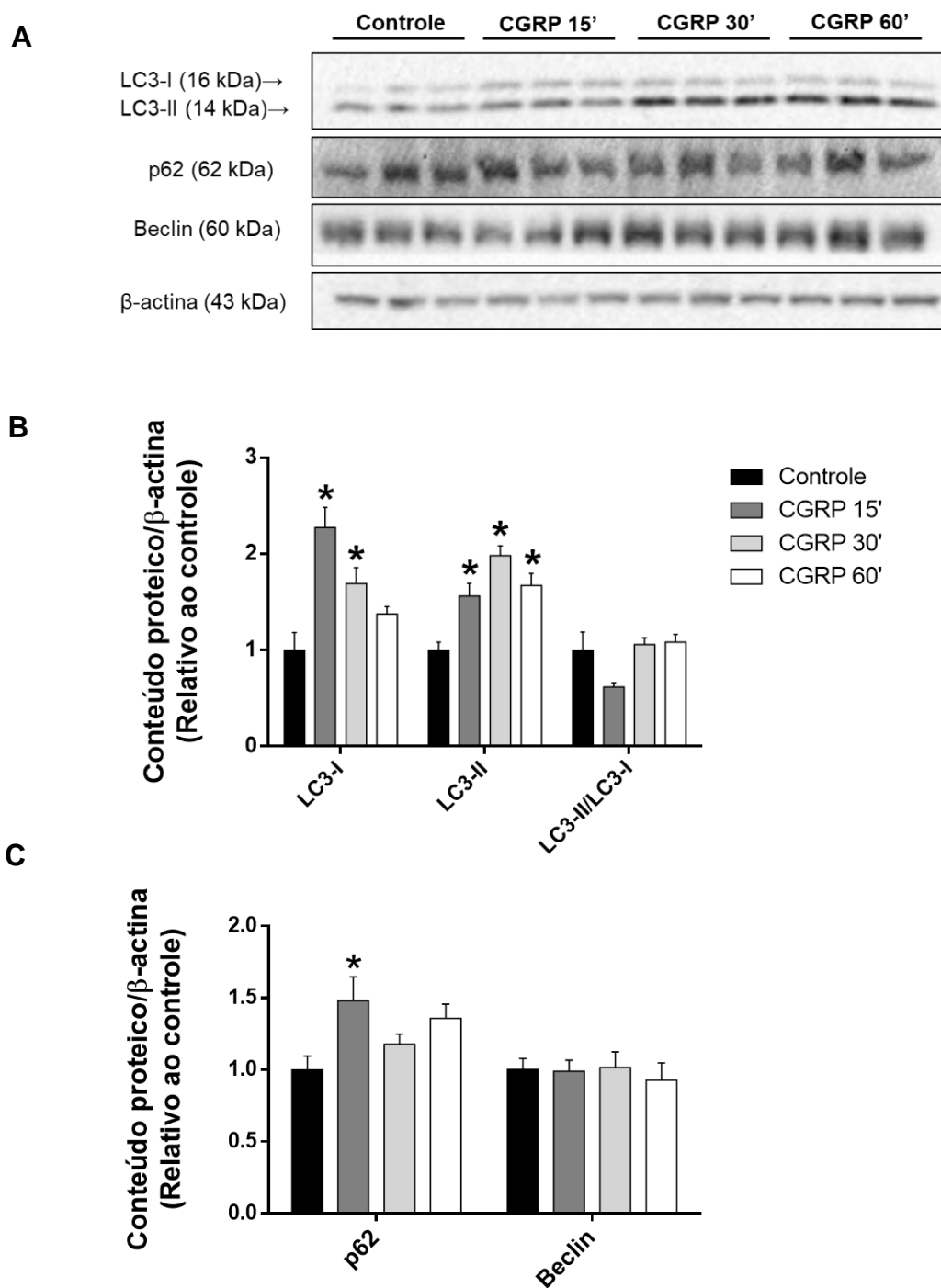


Figura 8: Efeito do tratamento com CGRP (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; s.c), após 15, 30 e 60 minutos, no conteúdo proteico de marcadores autofágicos: LC3-I e LC3-II, p62 e Beclin no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentados nas figuras B e C. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5). * $p < 0,05$ vs controle tratado com salina.

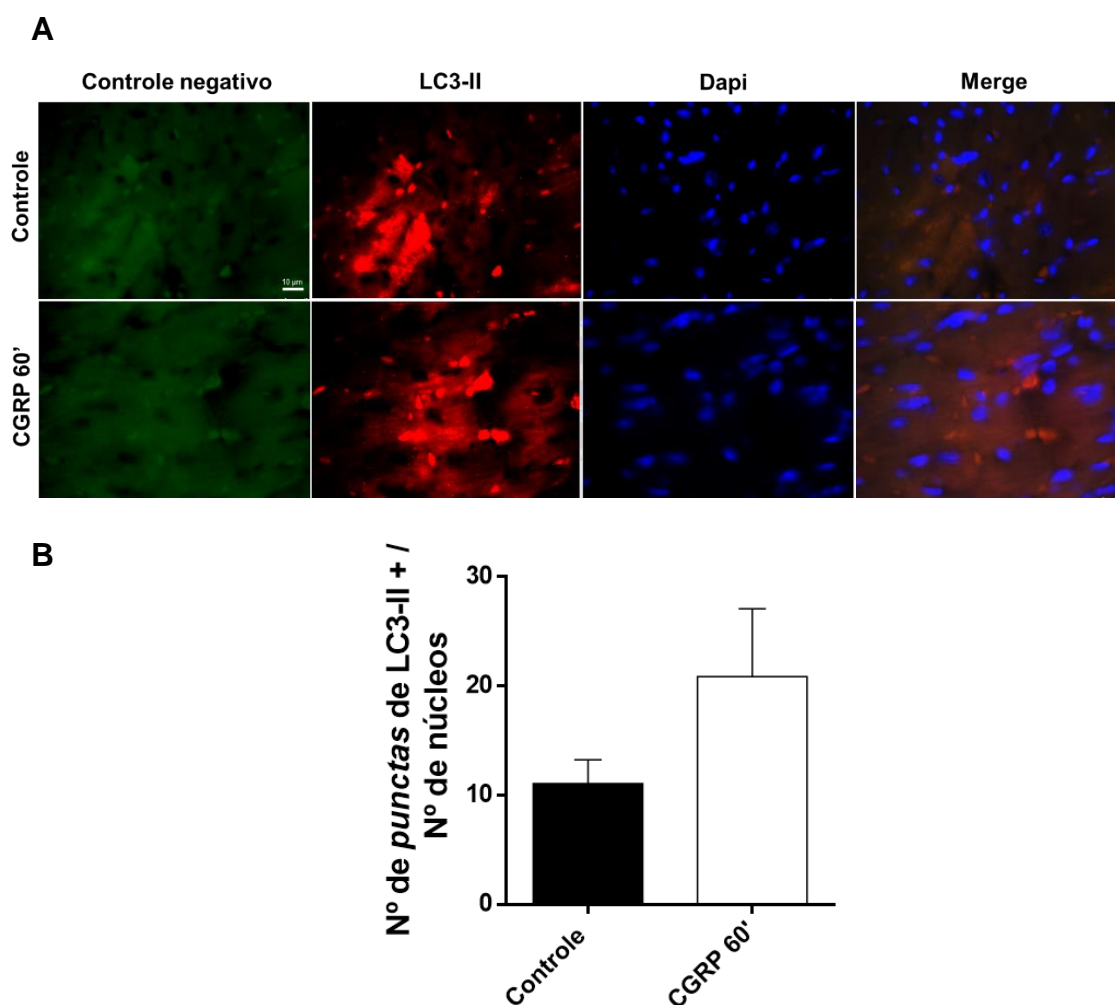


Figura 9: Imagens microscópicas representativas do efeito do CGRP (100 µg/Kg; s.c), após 60 minutos, no número de *punctas* positivas para LC3-II no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Expressão quantitativa do número de *punctas* de LC3-II corrigida pelo número de núcleos (B). Marcação em vermelho de LC3-II por imunofluorescência. O controle negativo foi obtido através da omissão da fluorescência. Os núcleos foram corados com DAPI e aparecem marcados em azul. Os resultados são expressos como média±EPM. Magnificação de 100x. A barra representa 10 µm.

Para melhor compreender se os efeitos sistêmicos do CGRP no acúmulo de LC3-II eram devido ao aumento da autofagia ou a uma menor degradação do autofagossomo pelo lisossomo, realizou-se um experimento de avaliação do fluxo autofágico, após 60 minutos de tratamento com salina ou CGRP. O fluxo autofágico foi estimado por meio do tratamento (i.p.) com colchicina. Esta droga inibe a fusão do autofagossomo com o lisossomo e por evitar a degradação, todo aumento do conteúdo proteico de LC3-II reflete um aumento da formação e, portanto, do fluxo autofágico. Inicialmente, nossos resultados mostram que o tratamento com colchicina foi eficiente, uma vez que esta droga aumentou o conteúdo proteico de LC3-II em coração de animais controles quando comparados com controles tratados com salina (figura 10B). Verificou-se também que o tratamento com CGRP não foi capaz de provocar um aumento adicional no conteúdo de LC3-II em animais tratados com colchicina, o que sugere que o aumento observado no conteúdo proteico de LC3-II pode ser decorrente da inibição da fusão do autofagossomo com o lisossomo e da consequente degradação desta estrutura e não de um aumento do processo autofágico.

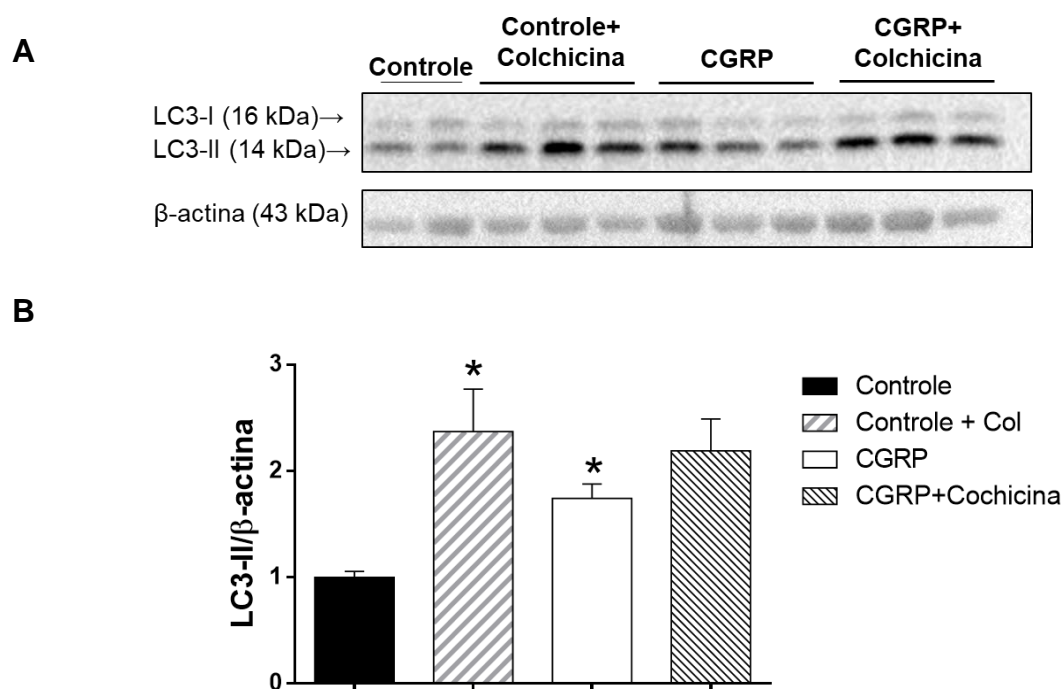


Figura 10: Efeito do tratamento com CGRP (100 μ g/Kg; s.c), após 60 minutos, no fluxo autofágico no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentados na figura B. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5). *p<0,05; vs controle tratado com salina.

4.2.3 Efeito do tratamento com o antagonista do CGRP (CGRP₈₋₃₇) na razão LC3-II/LC3-I

No presente estudo, investigou-se o efeito do tratamento com o antagonista do CGRP (CGRP₈₋₃₇) no conteúdo proteico de LC3-II, na presença ou não do agonista. Estes resultados estão apresentados na figura 11A e B, onde se pode observar que o tratamento com CGRP sozinho aumentou significativamente o conteúdo proteico de LC3-I (~2x) e LC3-II (~70%), após 60 minutos enquanto que a razão LC3-II/LC3-I não foi alterada. Entretanto, verifica-se claramente um pronunciado aumento (~2x) desta razão no grupo tratado apenas com o antagonista (~2x) quando comparado ao controle indicando aumento da autofagia. Este aumento também se mantém em coração de animais tratados com CGRP e o antagonista. Interessante também observar que o antagonista foi capaz de bloquear totalmente o aumento da forma não lipidada de LC3-I, em animais tratados com CGRP. Estes resultados nos permitem sugerir que o CGRP endógeno exerce um controle inibitório tônico da autofagia cardíaca em situações basais.

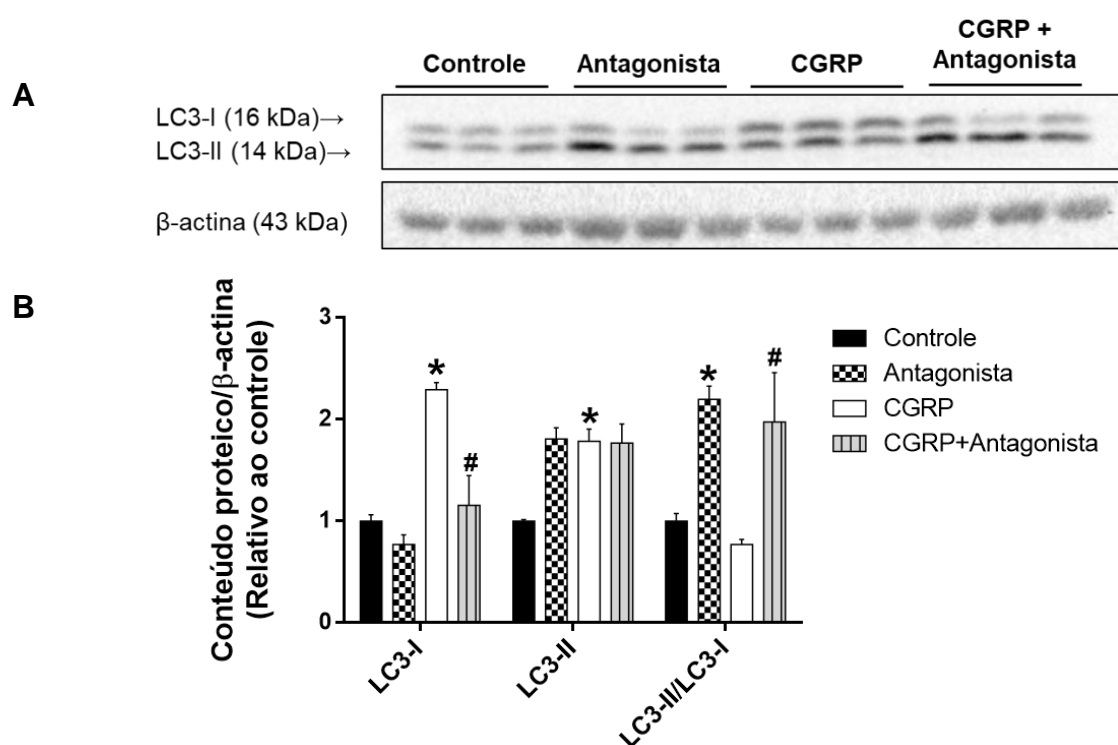


Figura 11: Efeito do tratamento com antagonista do CGRP (100 µg/Kg; s.c) no conteúdo proteico de LC3-I e LC3-II no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentados na figura B. Os resultados são expressos como média ± EPM (n=5). *p<0,05; #p<0,05 vs CGRP.

4.2.4 Efeito do tratamento com CGRP no fluxo autofágico do coração de camundongos jejuados

É bem estabelecido na literatura que o jejum é um modelo experimental de resistência à insulina e que leva à ativação da autofagia em coração de camundongos (KANAMORI et al., 2009). Dessa maneira, para confirmar a hipótese de que o CGRP exerce um controle inibitório da autofagia cardíaca em uma situação fisiológica de demanda energética, procedeu-se a avaliação do fluxo autofágico em coração de camundongos expostos ao jejum de 24h e tratados com CGRP e/ou colchicina. Os resultados destes experimentos estão apresentados na figura 12. Como esperado, observou-se um aumento (~2x) do conteúdo proteico de LC3-II no coração de animais em jejum e tratados com colchicina quando comparados aos animais apenas em jejum, o que confirma então que o estado de jejum aumenta o fluxo autofágico no tecido cardíaco. Ao analisar o efeito do CGRP no grupo jejuado tratado com colchicina, observa-se claramente uma diminuição do conteúdo de LC3-II (~50%). Este conjunto de dados mostra claramente que o CGRP exerce efeitos inibitórios no fluxo autofágico no músculo cardíaco de camundongos jejuados.

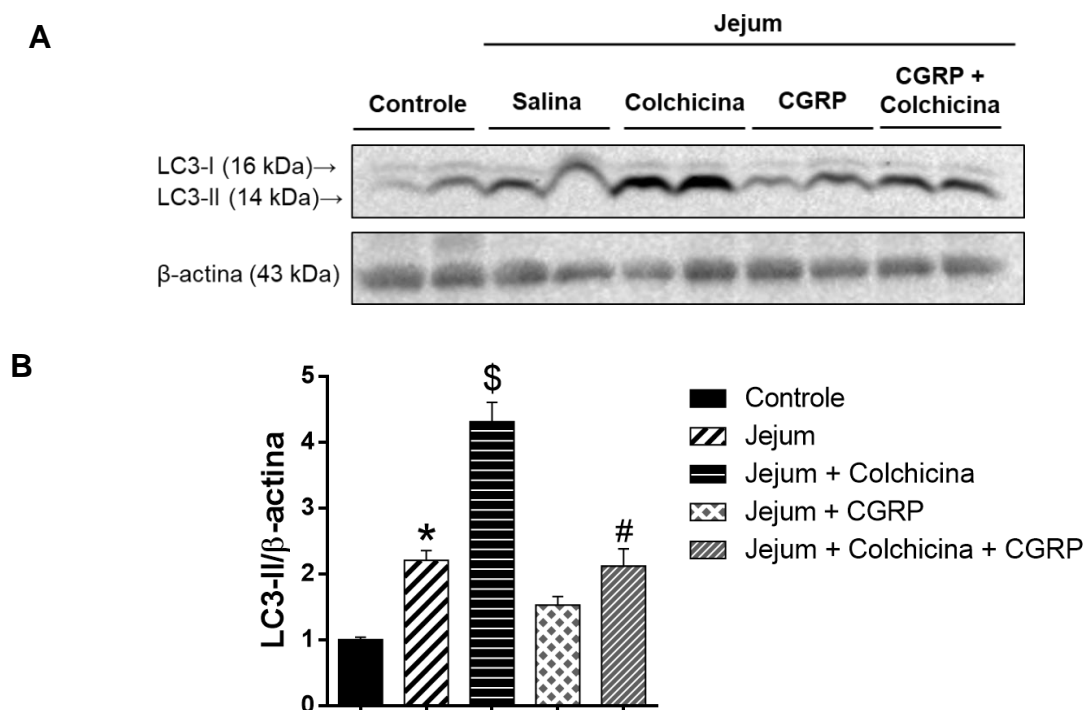


Figura 12: Efeito do tratamento com CGRP (100 µg/Kg; s.c), após 15 minutos, no fluxo autofágico no músculo cardíaco de camundongos jejuados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentados na figura B. Os resultados são expressos como média ± EPM (n=5). *p<0,0,5 vs controle; \$ p<0,05 vs jejum; #p<0,05 vs jejum+colchicina.

4.2.5 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de AKT/FoxO

Considerando que a Akt é uma proteína chave envolvida na ativação de vias anabólicas e inibição de vias catabólicas relacionadas ao metabolismo de proteínas, incluindo a autofagia, avaliamos o efeito do tratamento com CGRP no estado de fosforilação de Akt e FoxO1, um fator transcricional envolvido na ativação de genes autofágicos e que é regulado negativamente por Akt. A figura 13 mostra que o tratamento com CGRP, em todos os tempos, diminuiu significativamente a fosforilação de Akt em resíduos de Ser⁴⁷³ (40%, 60% e 70% respectivamente) e Thr³⁰⁸ (~60% em todos os grupos tratados). Entretanto, ao observar o estado de fosforilação de FoxO1 em Ser²⁵⁶ em coração de animais tratados com CGRP não se observou diferença significativa entre o grupo tratado e o controle. O conteúdo total tanto de Akt como de FoxO1 não foi alterado em coração de animais tratados com CGRP. Os valores da densitometria das respectivas proteínas fosforiladas foram corrigidas tanto pelas proteínas totais quanto pela β -actina (figura 13B, C e D).

Com a finalidade de verificar se o aumento no conteúdo proteico de LC3-I e II poderia ser decorrente de uma maior atividade transcricional mediada por FoxO1, avaliou-se a expressão de genes autofágicos: LC3b, Cathepsina L e Gabarap1L. A figura 14 mostra que a expressão destes genes não foi regulada pelo CGRP, o que sugere que o efeito modulatório do CGRP na autofagia cardíaca em animais alimentados envolve um mecanismo pós-transcricional.

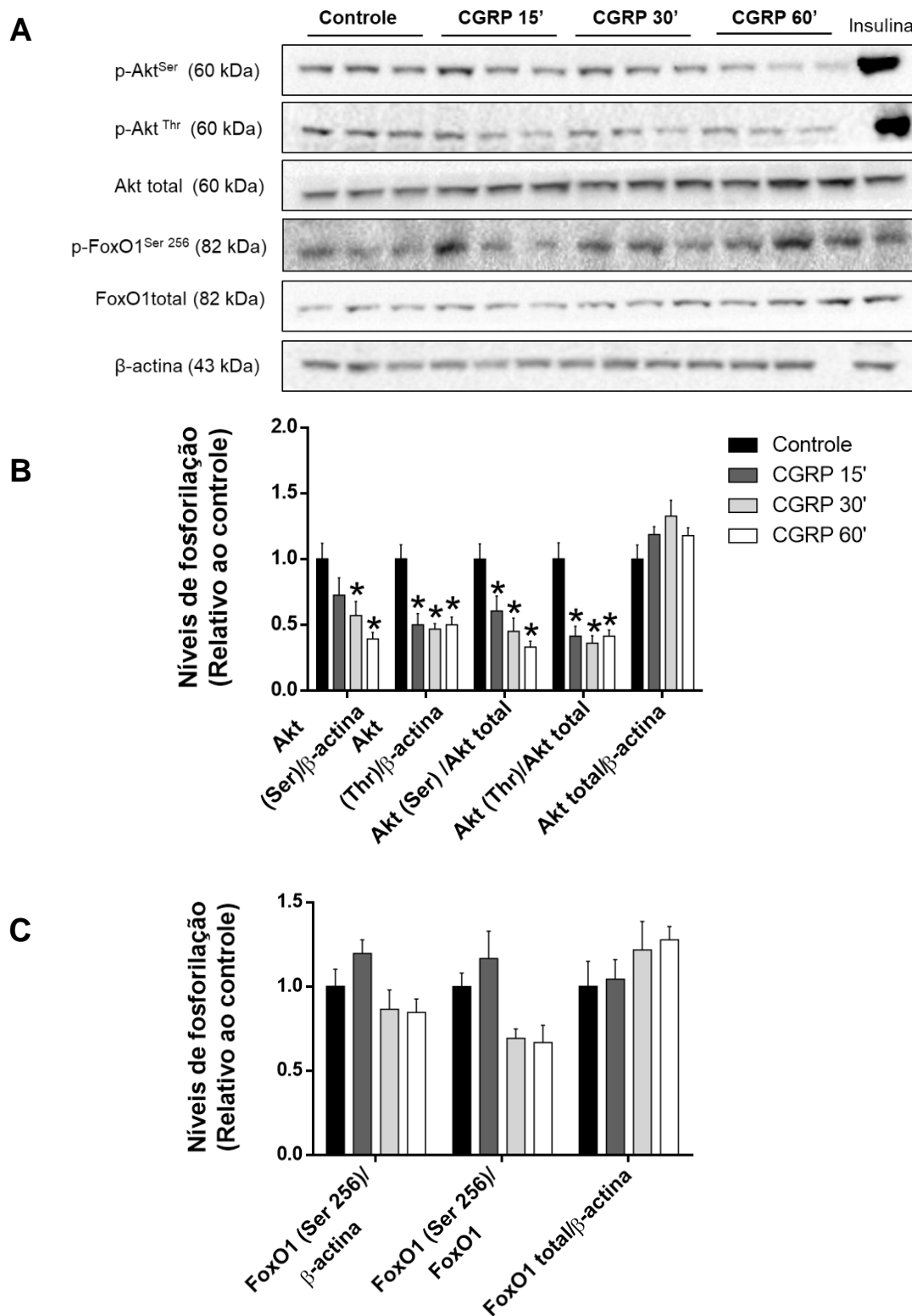


Figura 13: Efeito do tratamento com CGRP (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; s.c), após 15, 30 e 60 minutos, no estado de fosforilação e conteúdo proteico total de Akt (Ser⁴⁷³), Akt (Thr³⁰⁸) e FoxO1 (Ser²⁵⁶) no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentados nas figuras B e C. O tratamento com insulina (5U) *in vivo* foi utilizada como controle positivo. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5). *p<0,05 vs controle tratado com salina.

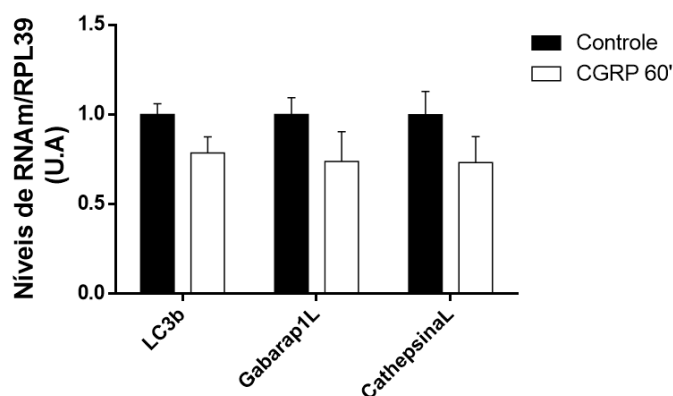


Figura 14: Efeito do tratamento com CGRP (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; s.c), após 60 minutos, na expressão de genes relacionados à autofagia e alvos de FoxO1. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5).

4.2.6 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de mTOR

É bem estabelecido que mTOR é fosforilada (Ser²⁴⁴⁸) e ativada por Akt, sendo uma proteína chave na estimulação da síntese proteica. Em paralelo, mTOR promove a fosforilação e inibição de Ulk1 em Ser⁷⁵⁷, uma das proteínas responsáveis pela iniciação da formação do autofagossomo (EGAN et al., 2011). Nossos resultados mostram que o tratamento *in vivo* com CGRP, no período de 15 minutos, aumentou a fosforilação de mTOR em resíduo de Ser²⁴⁴⁸ (~2x), de S6 em Ser^{235/236} (~4x), um substrato da p70 (alvo direto de mTOR) e de Ulk1 em Ser⁷⁵⁷ (~2x) (Figura 15A e B). Estes efeitos foram observados quando os valores densitométricos das proteínas fosforiladas mTOR e S6 foram corrigidas pela β -actina, mas não por suas proteínas totais, cujos valores tenderam a aumentar em resposta ao tratamento.

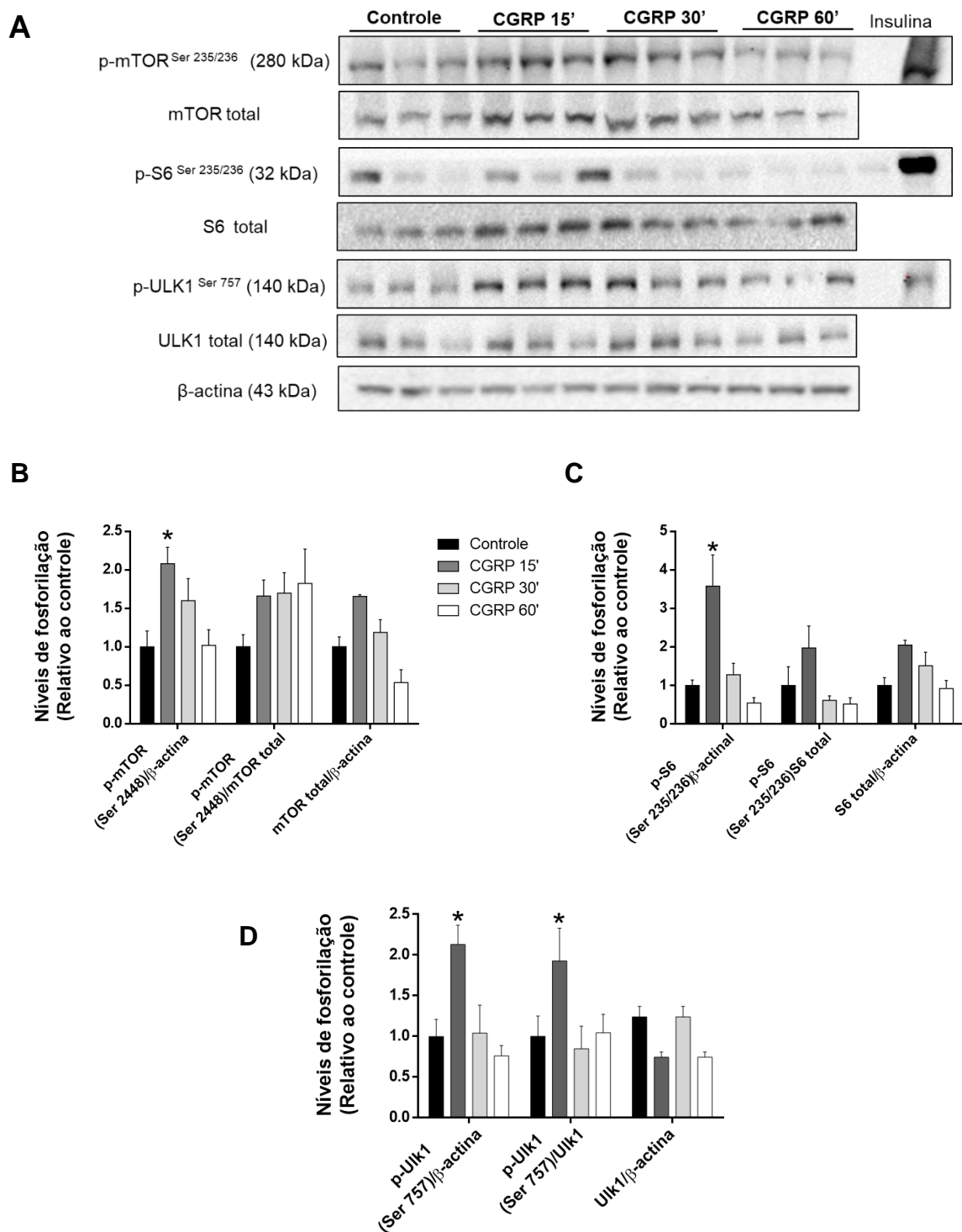


Figura 15: Efeito do tratamento com CGRP (100 μ g/Kg; s.c) após 15, 30 e 60 minutos, no estado de fosforilação e conteúdo proteico total de mTOR (Ser²⁴⁴⁸), S6 (Ser^{235/236}) e Ulk1 (Ser⁷⁵⁷) no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentados nas figuras B, C e D. O tratamento com insulina (5U) *in vivo* foi utilizada como controle positivo. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5). *p<0,05 vs controle.

4.2.7 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de AMPK

A proteína quinase AMPK, quando fosforilada, pode aumentar a autofagia por meio da regulação inibitória da atividade de mTOR e controle estimulatório em Ulk1 via fosforilação do resíduo de Ser³¹⁷. A figura 16 mostra que o tratamento *in vivo* com CGRP, quando comparado ao controle, aumentou a fosforilação de AMPK (30%) e de Ulk1 em Ser³¹⁷ (80%), sendo ambos efeitos observados após 15 minutos da injeção. A fosforilação de AMPK pelo CGRP foi apenas observada quando esta foi corrigida pela β -actina e não foi pelo conteúdo total desta proteína.

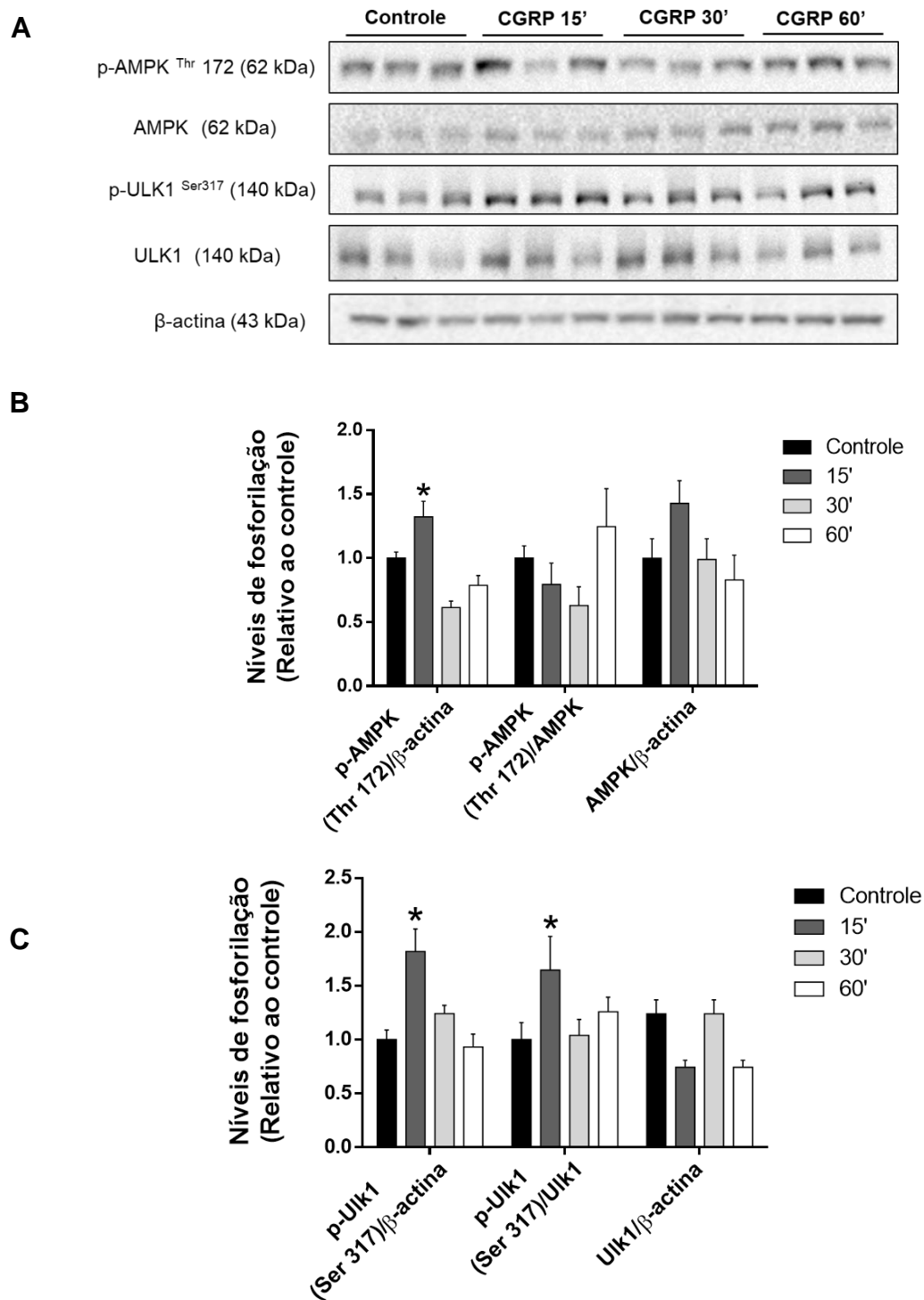


Figura 16: Efeito do tratamento com CGRP (100 μ g/Kg; s.c), após 15, 30 e 60 minutos, no estado de fosforilação e conteúdo proteico total de AMPK (Thr¹⁷²) e Ukl1 (Ser³¹⁷) no músculo cardíaco de camundongos alimentados (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentados nas figuras B e C. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=5). *p<0,05 vs controle tratado com salina.

4.3 Parâmetros moleculares em cardiomiócitos de ratos neonatos

4.3.1 Efeitos do tratamento com CGRP na via de sinalização de PKA/CREB e de Akt/mTOR

Com o objetivo de investigar o efeito direto do CGRP na ativação de proteínas anti-autofágicas, foram realizados experimentos em cultura primária de cardiomiócitos de ratos neonatos incubados na presença ou ausência deste peptídeo na concentração de 1 μ M. Com o objetivo de mimetizar o modelo experimental *in vivo* foi avaliada a sinalização durante 15, 30 e 60 minutos. De forma semelhante ao observado *in vivo*, o CGRP, após 15 minutos de incubação foi capaz de aumentar a fosforilação de CREB em Ser¹³³ (~2,5x) (figura 17A e B). Neste mesmo período, verificou-se um aumento significativo na fosforilação de Akt Ser⁴⁷³ (~2x) e uma forte tendência ao aumento do estado de fosforilação de proteínas *downstream* como mTOR Ser²⁴⁴⁸ e Ulk1 Ser⁷⁵⁷ (figura 18 A e B). Em conjunto, estes resultados sugerem que a via da Akt/mTOR/Ulk1 pode ser diretamente ativada pelo CGRP em cardiomiócitos neonatos.

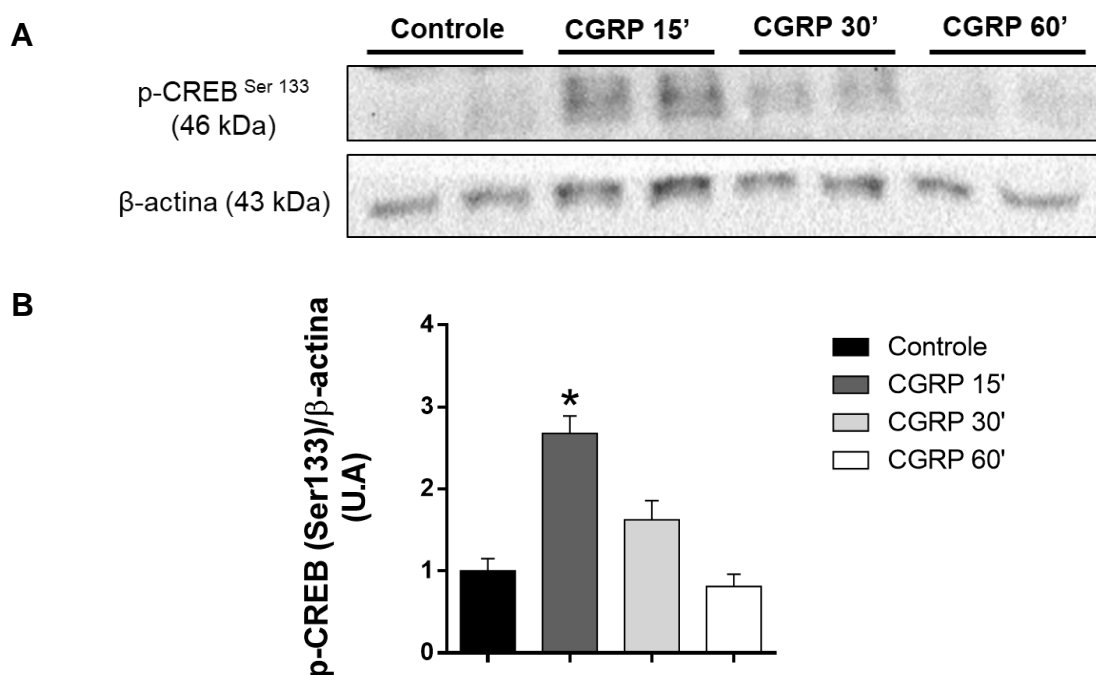


Figura 17: Efeito temporal do tratamento com CGRP (1 μ M), após 15, 30 e 60 minutos, no estado de fosforilação de CREB Ser¹³³ em cultura primária de cardiomiócitos (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentadas na figura B. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=3). *p<0,05 vs controle.

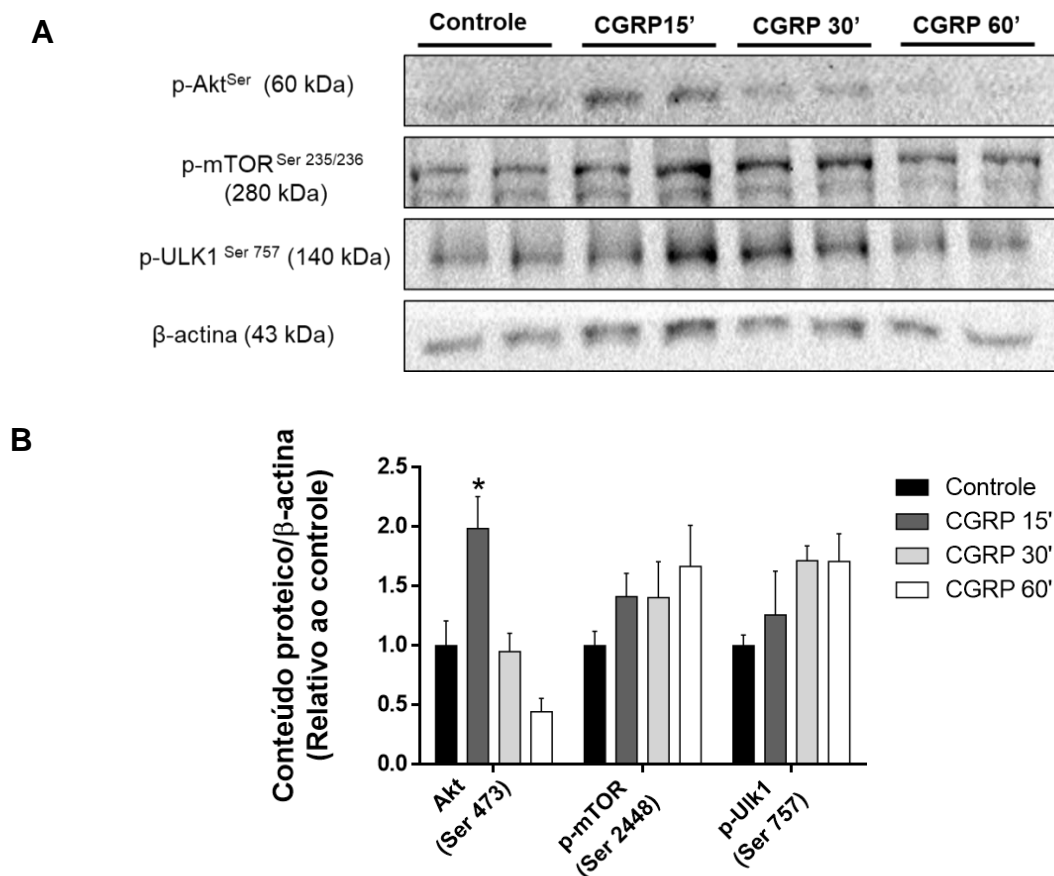


Figura 18: Efeito do tratamento com CGRP (1 μ M), após 15, 30 e 60 minutos, no estado de fosforilação de Akt Ser⁴⁷³, mTOR Ser²⁴⁴⁸, Ulk1 Ser⁷⁵⁷ em cultura primária de cardiomiócitos (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas estão apresentadas na figura B. Os resultados são expressos como média \pm EPM (n=3). *p<0,05 vs controle.

Discussão

5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos *in vivo* do tratamento agudo com CGRP na autofagia cardíaca, bem como em vias de sinalizações relacionadas ao controle dos processos de síntese e degradação de proteínas.

A análise inicial dos efeitos sistêmicos induzidos pelo CGRP, na dose de 100 µg/Kg, mostrou alterações metabólicas importantes na regulação de carboidratos e lipídios que indicam uma ação diabetogênica deste peptídeo. Verificou-se que o tratamento com CGRP aumentou a glicemia e causou uma diminuição acentuada das concentrações plasmáticas de insulina. Estes efeitos foram observados logo após 15 minutos da injeção da droga e se mantiveram até 60 minutos. Em concordância com estes achados, Pettersson et al. (1986) demonstraram que, após 6 minutos de administração intravenosa de CGRP (3,2 µg/Kg) em ratos, ocorre aumento da glicemia associado com uma diminuição significativa das concentrações plasmáticas de insulina. Entretanto, os mecanismos intracelulares responsáveis por estes efeitos ainda não são conhecidos. A somatostatina é um hormônio produzido pelas células delta do pâncreas e pelas células D do antro gástrico e é bem conhecido por ser um inibidor fisiológico da secreção endógena de insulina (ALBERTI et al., 1973). Dunning & Taborsky, (1987) foram um dos primeiros a relatar que o CGRP é um potente estimulador da secreção gástrica de somatostatina, mas com pequena influência na secreção deste hormônio pelo pâncreas. Mais recentemente, Egerod et al. (2015) confirmaram estes resultados ao demonstrar que o CGRP liberado pela inervação sensorial das células D antrais é capaz de aumentar a liberação de somatostatina. Desta forma, um possível aumento dos níveis circulantes de somatostatina causado pelo CGRP poderia explicar a diminuição da insulinemia observada em nossos animais. Por outro lado, não se pode descartar um efeito direto do CGRP nas células beta pancreáticas. Ishizuka et al. (1988) observaram uma ação inibitória direta do CGRP na liberação de insulina em cultura de células de ilhotas pancreáticas sem alteração na secreção de somatostatina. Outro estudo *in vitro* demonstrou que o CGRP tem um potencial fisiológico de diminuir a primeira fase de secreção da insulina (TANAKA; KASHIWAGI; KOIZUMI, 2013).

Uma das ações mais importantes da insulina é a de promover a captação de glicose pelo músculo (esquelético e cardíaco) e tecido adiposo. Ao se acoplar a seu receptor do tipo tirosina quinase, a insulina ativa uma cascata de sinalização que resulta no translocamento de GLUT-4 para a membrana celular e no consequente aumento da captação de glicose por estes tecidos. Como há possivelmente uma diminuição da secreção de insulina em nossos animais, pode-se sugerir que haja menor sensibilidade muscular à glicose (HUANG; CZECH, 2007; THONG; DUGANI; KLIP, 2005). Entretanto, ainda não está estabelecido se o aumento da glicemia induzido pelo CGRP é resultante ou não da hipoinsulinemia. Yamaguchi et al. (1990) sugeriram que a inibição da secreção de insulina não desempenha um papel importante na ação hiperglicêmica do CGRP. De fato, há evidências de que o CGRP seja capaz de causar resistência periférica à insulina. Em células musculares L6, o CGRP aumentou o conteúdo de AMPc e reduziu em até 70% a captação de 2-deoxiglicose induzida pela insulina (KREUTTER; ORENA; ANDREWS, 1989). Molina et al. (1990) também demonstraram que o CGRP *in vitro* inibiu os efeitos da insulina na captação de hexose em miócitos da linhagem BC3H1. Portanto, é possível que o aumento da glicemia demonstrado no presente estudo seja resultante da inibição da captação de glicose induzida pela ação direta do CGRP na musculatura esquelética e cardíaca.

O aumento da produção hepática de glicose, estimulada diretamente ou indiretamente pelo CGRP via inibição da insulina, poderia também explicar o aumento da glicemia. Uma vez que não se observou redução do conteúdo do glicogênio hepático nos animais tratados com CGRP quando comparados aos controles, pode-se sugerir uma eventual participação da via da neoglicogênese na indução da hiperglicemia. Moore et al., (1999) demonstraram, em cães não anestesiados, que a infusão de CGRP é capaz de aumentar a produção endógena de glicose, sendo este efeito resultante de ações intra-hepáticas do CGRP e de seus efeitos indiretos na estimulação do fluxo de substratos para a neoglicogênese. No presente estudo, observou-se uma diminuição da concentração plasmática de glicerol, o que poderia ser resultante de uma maior captação deste substrato pelo fígado para a geração de glicose “de novo” levando ao aumento da glicemia. Futuros estudos são necessários para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas alterações do metabolismo de carboidratos em animais tratados agudamente com CGRP.

Há relatos prévios na literatura de que o CGRP possa regular o metabolismo lipídico em diferentes tecidos (LIMA et al., 2017). De fato, nossos resultados mostram que este peptídeo, após 30 minutos, foi capaz de elevar a concentração plasmática de AGLs indicando um possível aumento da lipólise. Aveseh et al. (2018), recentemente, também encontraram efeitos semelhantes em ratos tratados com CGRP por via intravenosa e sugeriram que a resposta lipolítica no tecido adiposo epididimal era mediada pela via da fosfolipase C. Outro estudo *in vivo* demonstrou que o CGRP aumenta a β -oxidação e estimula a mobilização de lipídeos em músculos esqueléticos (DANAHER et al., 2008), sendo estes efeitos mediados pela ativação da AMPK. No presente estudo, também se verificou que o CGRP foi capaz de ativar a AMPK, o que sugere que esta quinase possa também estar envolvida no aumento da β -oxidação de lipídios no músculo cardíaco de camundongos.

Tendo em vista evidências anteriores da literatura de que o CGRP poderia interferir com a atividade do Sistema Nervoso Simpático, avaliou-se neste estudo o efeito temporal do CGRP no conteúdo cardíaco de noradrenalina assim como nas concentrações plasmáticas das catecolaminas. Nesse contexto, verificou-se que a administração do peptídeo não alterou o conteúdo de noradrenalina no coração. Resultados similares foram encontrados por Burgdorf et al. (2005) onde o tratamento com CGRP (5 μ mol/L) não alterou o conteúdo cardíaco de noradrenalina em ratos. Entretanto, observou-se uma clara diminuição da concentração plasmática de noradrenalina, após 30 minutos do tratamento. Uma vez que foi observado uma tendência à redução da adrenalina plasmática nestes animais, pode-se sugerir que o CGRP exerça efeitos inibitórios nos processos de síntese e/ou secreção das catecolaminas pelas células cromafins na porção medular da adrenal. A presença do CGRP na glândula adrenal foi confirmada por estudos de imunohistoquímica. De acordo com estes estudos, o CGRP poderia ser secretado pelas células cromafins e agir nas células vizinhas de uma forma parácrina ou até mesmo de uma forma neurócrina, após ser liberado por terminações sensoriais da glândula (KURAMOTO; KONDO; FUJITA 1987). A inibição exercida pelo CGRP na secreção de catecolaminas pelas células cromafins poderia ser explicada por uma interação entre o CGRP e o receptor nicotínico presente nessas células. De fato, as células cromafins expressam uma grande quantidade de receptores nicotínicos (DI

ANGELANTONIO et al., 2003) e o CGRP, ao se ligar a estes receptores, deprime o sinal nicotínico de uma forma extremamente rápida (GINIATULLIN et al., 1999).

O achado da redução das concentrações plasmáticas de noradrenalina induzida pelo CGRP no presente trabalho está de acordo com os dados de Liu et al. (2017) que realizaram experimentos em camundongos nocautes para CGRP (CGRP^{-/-}). Neste estudo foram mensuradas as concentrações urinárias de normetanefrina (metabólito de noradrenalina) e observou-se que os animais CGRP^{-/-} apresentavam uma maior excreção deste metabólito. Outros autores também demonstraram efeitos inibitórios do CGRP na atividade simpática e sugeriram que estes efeitos estão relacionados a uma depressão na regulação da hemodinâmica cardiovascular sistêmica (GANGULA et al., 2000; OH-HASHI et al., 2001). Entretanto, há na literatura dados controversos aos nossos. FISHER et al. (1983) verificaram que uma injeção intracerebroventricular de CGRP em ratos aumenta as concentrações plasmáticas de noradrenalina por até 40 minutos. Em 2001, Tortorella et al. (2001) demonstraram que o CGRP estimula a secreção de catecolaminas em adrenais de ratos, em experimentos *ex vivo*. As divergências encontradas sobre as ações modulatórias do CGRP no Sistema Nervoso Neurovegetativo nestes diferentes estudos podem ser explicadas pelo tipo de espécie estudada, tempo de tratamento com CGRP, via de administração, etc. É bastante conhecido que as catecolaminas plasmáticas, principalmente a noradrenalina, via adrenoceptores alfa, inibem a secreção de insulina, promovem glicogenólise e neoglicogênese e podem ainda interferir negativamente na captação de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético (LANG, 1999; MIGLIORINI et al., 1989; SACCA et al., 1983). Portanto, independentemente dos mecanismos envolvidos na resposta inibitória do CGRP na medula da adrenal que levou à redução das concentrações plasmáticas de noradrenalina observada neste estudo, é pouco provável que este efeito tenha contribuído para as alterações metabólicas e hormonais discutidas anteriormente.

Em seguida, investigou-se se o tratamento com CGRP seria capaz de ativar sua via canônica de sinalização no coração. Os resultados mostraram que o CGRP aumentou rapidamente o estado de fosforilação de CREB (em 15 minutos) e de LHS (em 30 minutos), além de causar uma tendência de aumento da fosforilação de substratos de PKA, o que indica a eficácia do tratamento na ativação da via de sinalização do AMPc no coração. Estes resultados estão de acordo com diferentes estudos anteriores. Ishikawa et al. (1988) concluiu que o efeito ionotrópico positivo

do CGRP em átrios de cobaias é atribuído à ativação da adenilato cicase e o subsequente aumento do AMPc intracelular. Também há relatos na literatura de que o CGRP causa vasodilatação na aorta por um mecanismo dependente do aumento das concentrações intracelulares de AMPc (KUBOTA et al., 1985). O efeito transitório do CGRP na ativação da via do AMPc observado em nosso estudo pode ser explicado tanto pela meia-vida curta do peptídeo (~10 minutos) (KRAENZLIN et al., 1985), assim como pela interação entre o seu receptor do tipo GPCR à β -arrestina. Esta proteína é conhecida por provocar a internalização desses receptores, após o seu acoplamento ao agonista, e a rápida interrupção da transdução do sinal (GINGELL; HENDRIKSE; HAY, 2019).

Vários trabalhos de nosso laboratório demonstraram que o Sistema Nervoso Simpático, por meio da ativação dos adrenoceptores β_2 e da cascata de sinalização do AMPc/PKA, desempenha um importante papel fisiológico no controle do metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos (BAVIERA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2012; GRAÇA et al., 2013; NAVEGANTES; MIGLIORINI; KETTELHUT, 2002; SILVEIRA et al., 2014) e no tecido adiposo marrom de roedores (PRZYGODDA, 2016). Em concordância com estes estudos, Paula-Gomes (2013) demonstrou que a noradrenalina, em cultura primária de cardiomiócitos, ativa tanto Akt quanto PKA e inibe FoxO, resultando na inibição de processos proteolíticos Ubiquitna-proteassoma e autofágico/lisossomal. Assim como as catecolaminas, o CGRP é um neuropeptídeo que, ao se ligar no receptor GPCR, também age pela via do AMPc e ativa a via de sinalização de PKA/CREB, como demonstrado no presente trabalho. Embora seja descrito na literatura inúmeros efeitos do CGRP no coração, seus efeitos na regulação do metabolismo de proteínas neste tecido são totalmente desconhecidos.

Portanto, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que este neuropeptídeo exerce um papel modulatório na autofagia cardíaca em camundongos. Verificou-se que o tratamento com CGRP aumentou o conteúdo proteico de LC3, tanto na sua forma citosólica não lipidada (LC3-I), quanto na sua forma lipidada (LC3-II). A interpretação desses dados deve ser feita com bastante cautela, uma vez que todo aumento de LC3-II pode ser devido a duas causas diferentes: ao aumento da produção desta molécula e, portanto, na formação da estrutura do autofagossomo ou de sua menor degradação (*clereance*) pelo lisossomo, em uma situação de fluxo autofágico reduzido. Para que isto fosse

esclarecido, avaliamos o fluxo autofágico em coração de animais alimentados tratados com colchicina, uma droga que previne a degradação do autofagossomo por meio da inibição da sua fusão com o lisossomo. Nestes experimentos, observou-se que o acúmulo esperado de LC3-II no coração de animais tratados com colchicina não foi aumentado pelo tratamento com CGRP, após 60 minutos, o que sugere que o aumento no conteúdo proteico das isoformas de LC3 em animais tratados com este neuropeptídeo seja decorrente de uma inibição do fluxo autofágico. Várias outras evidências encontradas neste estudo reforçam esta hipótese. Embora a razão LC3-II/LC3-I (marcador de formação do autofagossomo) não tenha sido significativamente alterada nos tempos de 30 e 60 minutos, houve uma importante tendência de queda desta razão no tempo de 15 minutos, indicando mais uma vez inibição do processo autofágico. Neste intervalo, também se observou um aumento significativo do conteúdo proteico de p62, um importante substrato autofágico que é degradado pelos lisossomos após a sua fusão com o autofagossomo e utilizado como marcador de autofagia. Além disso, a análise da expressão do gene que codifica a LC3 assim como a quantificação desta proteína por imunofluorescência não mostrou diferenças significativas entre os corações de animais tratados com CGRP ou salina, no tempo de 60 minutos.

Considerando as dificuldades de se comprovar os efeitos inibitórios do CGRP na autofagia cardíaca, em uma situação basal, avaliou-se o fluxo autofágico em animais submetidos ao jejum de 24 horas, uma condição que sabidamente leva ao aumento da autofagia em diferentes tecidos (RAVIKUMAR et al., 2010). Nestes experimentos, o tratamento com CGRP, após 15 minutos, reduziu drasticamente o conteúdo proteico de LC3-II. É interessante verificar que um efeito totalmente oposto, ou seja aumento do conteúdo de LC3-II e da razão LC3-II/LC3-I, foi observado em corações de animais alimentados tratados com o antagonista seletivo do CGRP. Em conjunto, estes resultados mostram que o CGRP exerce um potente efeito inibitório no sistema autofágico/lisossomal cardíaco estão totalmente de acordo com os estudos realizados por Machado et al. (2016), que demonstraram efeitos semelhantes na musculatura esquelética de roedores, tanto em condições basais como atroficas. Por outro lado, evidências mais recentes indicam que o CGRP pode controlar o metabolismo ósseo por meio da inibição da apoptose e ativação da via autofágica (YANG et al., 2017). Esses dados se contrapõem aos

descritos no músculo esquelético e cardíaco e indicam que o papel do CGRP na regulação da autofagia é tecido-dependente.

Com relação à investigação das vias de sinalizações relacionadas ao controle do metabolismo proteico (síntese e degradação), o presente estudo mostra que o tratamento com CGRP, em todos os tempos analisados, causou uma diminuição do estado de fosforilação e, muito provavelmente, da ativação enzimática da Akt, em seus dois resíduos de fosforilação (Ser⁴⁷³ e Thr³⁰⁸). A Akt é uma proteína chave na regulação do metabolismo de proteínas, pois além de estimular a síntese proteica e inibir a autofagia via mTOR, promove fosforilação e inativação de FoxO, um fator transcricional que sabidamente aumenta a transcrição dos genes atroficos e relacionados ao sistema autofágico/lisossomal (LEE et al., 2011; OUDIT et al., 2004). Considerando nossos dados *in vitro* que mostram que o CGRP é capaz de aumentar a fosforilação desta quinase, em cardiomiócitos primários, é possível sugerir que a inibição da Akt observada em resposta ao tratamento *in vivo* seja um efeito indireto resultante da redução dos níveis plasmáticos de insulina. Efeitos semelhantes a estes foram observados em coração de ratos diabéticos e revertidos pelo tratamento sistêmico com insulina (PAULA-GOMES et al., 2013). Por outro lado, Umoh et al. (2014) demonstraram que corações de ratos perfundidos com CGRP, por 45 minutos, apresentaram uma diminuição da expressão gênica de Akt. Nossos dados também mostram que, ao contrário da Akt, não houve alteração do estado de fosforilação de FoxO1 em Ser²⁵⁶ e da expressão de genes autofágicos. Uma explicação razoável para estes dados, aparentemente controversos, é que o CGRP possa estimular no coração um outro intermediário como, por exemplo, a PKA, que tenha a capacidade de fosforilar Foxo e desta forma se contrapor à inibição da da Akt promovida pela hipoinsulinemia. De fato, os experimentos realizados por Silveira et al. (2014) em músculos esqueléticos e de Lee et al. (2011) em células endoteliais demonstraram que a PKA fosforila diretamente FoxO1 de forma independente da Akt. Futuros experimentos precisam ser realizados para confirma se a PKA exerce efeito semelhante em cardiomiócitos. Em conjunto, estes dados nos permitem sugerir que os efeitos inibitórios do CGRP *in vivo* na autofagia cardíaca em camundongos alimentados não são mediados pela via de sinalização de Akt/FoxO.

Como previamente citado, mTOR é uma Ser/Thr quinase, alvo de Akt e está envolvido na regulação da síntese proteica, crescimento celular, biogênese

ribossomal, etc. Além disso, é bem estabelecido que mTOR inibe a autofagia, sendo esta ação mediada pela fosforilação inibitória de Ulk1 em Ser⁷⁵⁷, proteína chave na iniciação da formação do autofagossomo (KIM et al., 2011). Nossos achados mostram claramente um aumento da fosforilação de mTOR em Ser²⁴⁴⁸, de S6 em Ser^{235/236} e de Ulk1 em Ser⁷⁵⁷ em coração de camundongos, logo após 15 minutos do tratamento com CGRP. O tratamento de cardiomiócitos com CGRP *in vitro*, durante este mesmo período de tempo, causou apenas uma tendência de aumento de fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) e Ulk1 (Ser⁷⁵⁷). A ativação de mTOR observada em resposta ao tratamento agudo com CGRP *in vivo* é independente da ação de Akt e provavelmente mediada pela PKA. Liu et al. (2016) demonstraram que a sinalização β-adrenérgica, via PKA, é capaz de ativar mTOR e aumentar fosforilação de S6 independente de Akt em adipócitos marrons. Há outros estudos na literatura que demonstram que o AMPc pode ativar mTOR. Por exemplo, foi relatado que o TSH (Hormônio Estimulante da Tireoide) ativa a S6K1 no epitélio da tireoide de maneira dependente do AMPc (BLANCQUAERT et al., 2010). Jhala et al., (2003) demonstraram que o hormônio incretina GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*) aumenta a sobrevivência e a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas por meio da via de sinalização de PKA/CREB. Dessa forma, sugerimos que a fosforilação de mTOR aqui observada em coração de camundongos é decorrente da ativação da via canônica de sinalização do AMPc/PKA/CREB induzida pelo CGRP. Como a ativação de mTOR também resultou na fosforilação do resíduo inibitório de Ulk1, pode-se também especular que esta seja a via de sinalização pela qual o CGRP inibe a autofagia cardíaca, logo após os primeiros 15 minutos de sua administração, tanto em animais alimentados como em jejuados.

A via de sinalização de mTOR e da AMPK geralmente se opõem na regulação do metabolismo de proteínas. Enquanto mTOR é ativada em situações de abundância de nutrientes, a AMPK está ativa em resposta à deprivação nutricional. Desta forma, todo aumento intracelular na razão AMP/ATP leva à ativação da AMPK, que por sua vez pode ativar o processo autofágico por meio da fosforilação em Ulk1 no resíduo de Ser³¹⁷ (KIM et al., 2011). Nosso trabalho corrobora estudos anteriores realizados em outros órgãos e tecidos (DANAHER et al., 2008) e demonstra, pela primeira vez na literatura, que o CGRP foi capaz de aumentar transitoriamente a fosforilação de AMPK em resíduos de Thr¹⁷² em coração de camundongos. Em concordância com este achado, verificou-se também que o

resíduo estimulatório de Ulk1 (Ser³¹⁷) pela AMPK foi fosforilado pelo tratamento *in vivo* com CGRP. O efeito dual do CGRP em vias de sinalização opostas na regulação autofágica (mTOR e AMPK) pode explicar, pelo menos em parte, porque o efeito anti-autofágico do CGRP observado em coração de camundongos alimentados é extremamente fugaz e não se mantém ao longo do tempo (figura 19).

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que de forma semelhante aos seus efeitos no músculo esquelético e às ações das catecolaminas no músculo e no TAM, o CGRP controla o metabolismo de proteínas em coração de camundongos por meio de ações inibitórias da proteólise autofágica/lisossomal. A descoberta desta nova função do CGRP poderá contribuir futuramente para a melhor compreensão do papel deste peptídeo em situações patológicas caracterizadas por alterações da massa cardíaca, como a insuficiência cardíaca e a cardiomiopatia diabética.

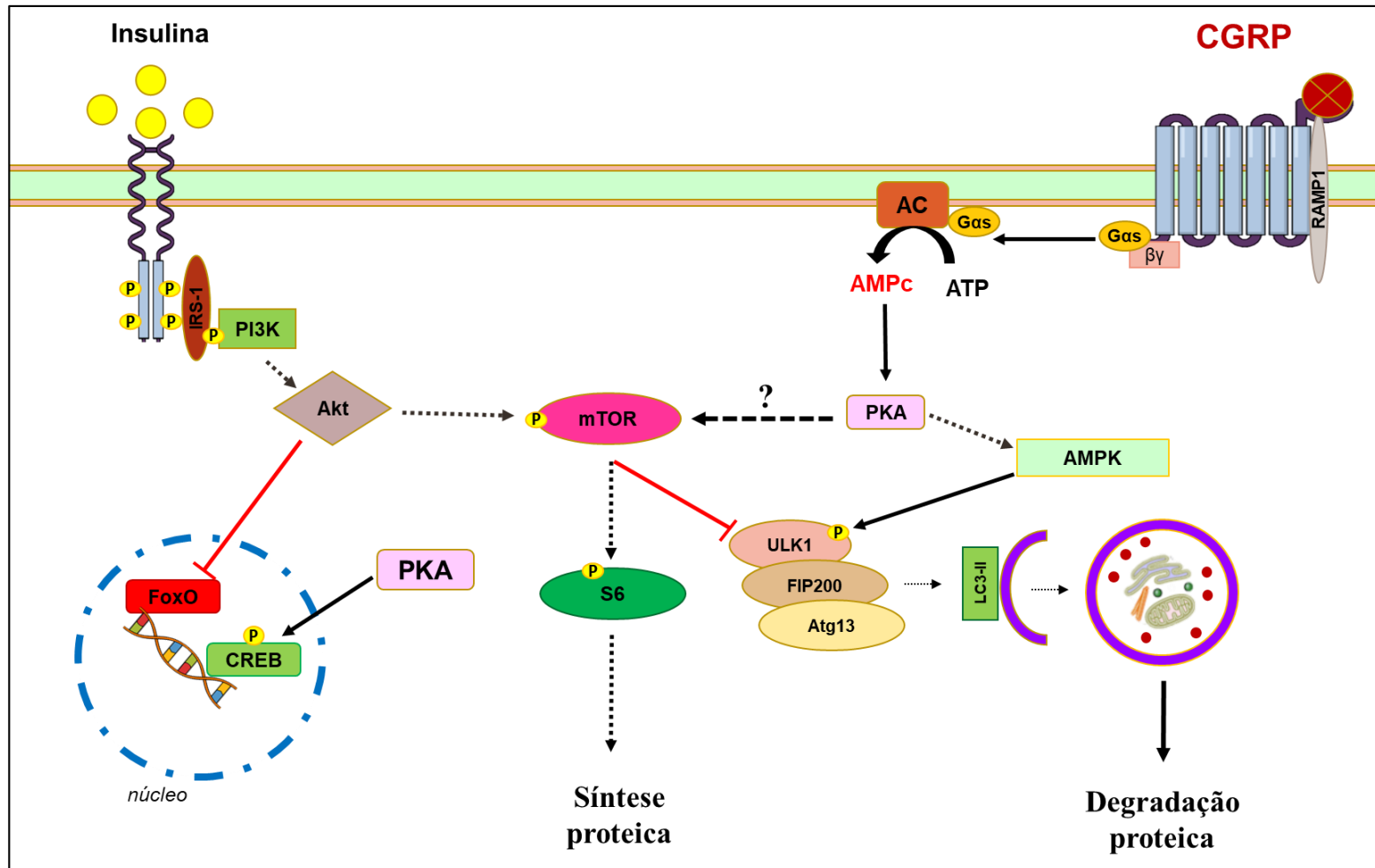


Figura 19: Representação esquemática das vias envolvidas no tratamento farmacológico com CGRP (100 µg/Kg) no músculo estriado cardíaco e investigadas neste trabalho. Setas contínuas representam ativação direta. Setas pontilhadas representam outras proteínas envolvidas na etapa. Seta tracejada representa mecanismo de ação ainda não conhecido.

Conclusão

6. Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- (1) Em situações basais, o tratamento agudo sistêmico com CGRP afeta o metabolismo de carboidratos e lipídios e resulta em efeitos diabetogênicos caracterizados por hiperglicemia e hipoinsulinemia. Além disso, o CGRP ativa a lipólise e reduz a concentração plasmática de noradrenalina;
- (2) No coração de animais alimentados, o CGRP ativa rapidamente a via de sinalização do AMPc e inibe o sistema autofágico/lisossomal, sendo esta resposta também observada em situações de jejum.
- (3) O efeito inibitório do CGRP na autofagia cardíaca é provavelmente mediado pela via da mTOR que causa uma fosforilação inibitória em Ulk1. Entretanto, este efeito anti-proteolítico é rapidamente revertido pela ativação da AMPK e a consequente ativação de Ulk1;
- (4) Embora o CGRP seja capaz de ativar diretamente a fosforilação de Akt em cardiomiócitos, seu efeito anti-autofágico no coração não é mediado pela via de sinalização da Akt/Foxo.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

AIYAR, N. et al. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 19, p. 11325–9, 10 maio 1996.

ALBERTI, K. G. M. M. et al. INHIBITION OF INSULIN SECRETION BY SOMATOSTATIN. **The Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1299–1301, 8 dez. 1973.

ALERS, S. et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 1, p. 2–11, jan. 2012.

ALESSI, D. R.; COHEN, P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, n. 1, p. 55–62, 1 fev. 1998.

AMARA, S. G. et al. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, v. 298, n. 5871, p. 240–244, 15 jul. 1982.

ATLASHKIN, V. et al. Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 15, p. 5198–207, ago. 2003.

AVESEH, M. et al. Serum calcitonin gene-related peptide facilitates adipose tissue lipolysis during exercise via PIPLC/IP3 pathways. **Endocrine**, v. 61, n. 3, p. 462–472, 13 set. 2018.

BAVIERA, A. M. et al. Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 3, p. E702–E708, mar. 2007.

BAVIERA, A. M. et al. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 315, n. 1–2, p. 104–12, fev. 2010.

BECHET, D. et al. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 2098–2114, out. 2005.

BELL, D. et al. Hypertrophic effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin on adult mammalian ventricular cardiomyocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 27, n. 11, p. 2433–43, 1 nov. 1995.

BELL, D. et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) increases cell surface area and induces expression of skeletal alpha-actin ANP mRNA in hypertrophying neonatal cardiomyocytes. **Regulatory peptides**, v. 71, n. 1, p. 1–7, 23 jul. 1997.

BLANCQUAERT, S. et al. cAMP-Dependent Activation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Thyroid Cells. Implication in Mitogenesis and Activation of CDK4. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 7, p. 1453–1468, jul. 2010.

BRAIN, S. D. et al. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. **Nature**, v. 313, n. 5997, p. 54–6, 1985.

BRAIN, S. D.; GRANT, A. D. Vascular Actions of Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 903–934, jul. 2004.

BURGDORF, C. et al. Calcitonin gene-related peptide does not interact with sympathetic activity in myocardial ischemia. **Regulatory Peptides**, v. 125, n. 1–3, p. 99–102, 15 fev. 2005.

CHEN, L. et al. Role of TRPV1 Channels in Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109842, out. 2014.

CHIBA, T. et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 256, n. 2, p. E331–E335, fev. 1989.

DANAHER, R. N. et al. Evidence that α -Calcitonin Gene-Related Peptide Is a Neurohormone that Controls Systemic Lipid Availability and Utilization. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 154–160, jan. 2008.

DECUYPERE, J.-P.; PARYS, J. B.; BULTYNCK, G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. **Cells**, v. 1, n. 3, p. 284–312, 6 jul. 2012.

DI ANGELANTONIO, S. et al. Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. **The European journal of neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 2313–22, jun. 2003.

EDVINSSON, L. et al. CGRP as the target of new migraine therapies — successful translation from bench to clinic. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 6, p. 338–350, 24 jun. 2018.

EGAN, D. et al. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. **Autophagy**, v. 7, n. 6, p. 643–4, jun. 2011.

EGEROD, K. L. et al. Transcriptional and Functional Characterization of the G Protein-Coupled Receptor Repertoire of Gastric Somatostatin Cells. **Endocrinology**, v. 156, n. 11, p. 3909–3923, 1 nov. 2015.

FISHER, L. A. et al. Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. **Nature**, v. 305, n. 5934, p. 534–6, 1983.

GALLAI, V. et al. Vasoactive Peptide Levels in The Plasma of Young Migraine Patients With and Without Aura Assessed Both Interictally and Ictally. **Cephalalgia**, v. 15, n. 5, p. 384–390, 1 out. 1995.

GANGULA, P. R. et al. Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 470–5, jan. 2000.

GANLEY, I. G. et al. ULK1-ATG13-FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297–12305, 1 maio 2009.

GAO, F. et al. TRPV1 Activation Attenuates High-Salt Diet-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis through PPAR- δ Upregulation. **PPAR research**, v. 2014, p. 491963, 24 jul. 2014.

GAROFALO, M. A. et al. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 60, n. 3, p. 206–8, 12 set. 1996.

GIBBINS, I. L. et al. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. **Neuroscience Letters**, v. 57, n. 2, p. 125–130, 12 jun. 1985.

GINGELL, J. J.; HENDRIKSE, E. R.; HAY, D. L. New Insights into the Regulation of CGRP-Family Receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 1, p. 71–83, 1 jan. 2019.

GINIATULLIN, R. et al. Calcitonin gene-related peptide rapidly downregulates nicotinic receptor function and slowly raises intracellular Ca²⁺ in rat chromaffin cells in vitro. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 2945–53, 15 abr. 1999.

GOADSBY, P. J.; EDVINSSON, L.; EKMAN, R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 2, p. 193–196, 1 fev. 1988.

GONÇALVES, D. A. P. et al. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 1, p. E123–E133, jan. 2012.

GRAÇA, F. A. et al. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 12, p. E1483–E1494, 15 dez. 2013.

GUO, Z. et al. Independent roles of CGRP in cardioprotection and hemodynamic regulation in ischemic postconditioning. **European Journal of Pharmacology**, v. 828, p. 18–25, 5 jun. 2018.

GUTIERREZ, M. G. et al. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2687–97, 1 jun. 2004.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 Glucose Transporter. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 4, p. 237–252, 4 abr. 2007.

ISHIKAWA, T. et al. Positive inotropic effect of calcitonin gene-related peptide mediated by cyclic AMP in guinea pig heart. **Circulation research**, v. 63, n. 4, p. 726–34, out. 1988.

ISHIZUKA, J. et al. Effect of calcitonin gene-related peptide on glucose and gastric inhibitory polypeptide-stimulated insulin release from cultured newborn and adult rat islet cells. **Regulatory Peptides**, v. 20, n. 1, p. 73–82, 1988.

ITO, H. et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and hypertrophy of cardiomyocytes. **Heart and vessels**, v. Suppl 12, p. 15–7, 1997.

IYENGAR, R.; HILDEBRANDT, J. D. **G protein pathways. Volume 344, Part B, G proteins and their regulators.** [s.l.] Elsevier, 2001.

JHALA, U. S. et al. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. **Genes & development**, v. 17, n. 13, p. 1575–80, 1 jul. 2003.

JU, J.-S. et al. Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 929–935, 27 out. 2010.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO journal**, v. 19, n. 21, p. 5720–8, 1 nov. 2000.

KANAMORI, H. et al. Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 5, p. 1705–14, maio 2009.

KATORI, T. et al. Calcitonin Gene-Related Peptide In Vivo Positive Inotropy Is Attributable to Regional Sympatho-Stimulation and Is Blunted in Congestive Heart Failure. **Circulation Research**, v. 96, n. 2, p. 234–243, 4 fev. 2005.

KASTIN, Abba (Ed.). **Handbook of biologically active peptides.** Academic press, 2013.

KEE, Z.; KODJI, X.; BRAIN, S. D. The Role of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in Neurogenic Vasodilation and Its Cardioprotective Effects. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1249, 19 set. 2018.

KHAN, S. H.; KUMAR, R. Role of an intrinsically disordered conformation in AMPK-mediated phosphorylation of ULK1 and regulation of autophagy. **Mol. BioSyst.**, v. 8, n. 1, p. 91–96, 1 dez. 2012.

KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 132–141, 23 fev. 2011.

KIM, N. N. et al. Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac

myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 269, n. 3, p. E426–E437, set. 1995.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.

KRAENZLIN, M. E. et al. Infusion of a novel peptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) in man. Pharmacokinetics and effects on gastric acid secretion and on gastrointestinal hormones. **Regulatory peptides**, v. 10, n. 2–3, p. 189–97, mar. 1985.

KREUTTER, D.; ORENA, S. J.; ANDREWS, K. M. Suppression of insulin-stimulated glucose transport in L6 myocytes by calcitonin gene-related peptide. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 164, n. 1, p. 461–7, 16 out. 1989.

KUBOTA, M. et al. Calcitonin gene-related peptide stimulates cyclic AMP formation in rat aortic smooth muscle cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 132, n. 1, p. 88–94, 15 out. 1985.

KURAMOTO, H.; KONDO, H.; FUJITA, T. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. **Cell and tissue research**, v. 247, n. 2, p. 309–15, fev. 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LANG, J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 1–2, p. 3–17, jan. 1999.

LEE, J.-A. et al. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. **Current biology : CB**, v. 17, n. 18, p. 1561–7, 18 set. 2007.

LEE, J.-W. et al. Protein Kinase A- α Directly Phosphorylates FoxO1 in Vascular Endothelial Cells to Regulate Expression of Vascular Cellular Adhesion Molecule-1 mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6423–6432, 25 fev. 2011.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, 11 jan. 2008.

LI, J. et al. Alpha-calcitonin gene-related peptide is protective against pressure overload-induced heart failure. **Regulatory Peptides**, v. 185, p. 20–28, 10 ago. 2013.

LI, J.; WANG, D. H. Development of angiotensin II-induced hypertension: role of CGRP and its receptor. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 1, p. 113–8, jan. 2005.

- LI, Y. J. et al. Calcitonin gene-related peptide-induced preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. **European journal of pharmacology**, v. 311, n. 2–3, p. 163–7, set. 1996.
- LIANG, C. et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 688–698, jul. 2006.
- LIANG, C. et al. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. **Nature cell biology**, v. 10, n. 7, p. 776–87, jul. 2008.
- LIMA, W. G. et al. Role of calcitonin gene-related peptide in energy metabolism. **Endocrine**, v. 58, n. 1, p. 3–13, 2017.
- LIRA, E. C. et al. Phosphodiesterase-4 inhibition reduces proteolysis and atrogenes expression in rat skeletal muscles. **Muscle and Nerve**, v. 44, n. 3, p. 371–381, 2011.
- LIU, D. et al. Activation of mTORC1 is essential for β -adrenergic stimulation of adipose browning. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 5, p. 1704–1716, 2 maio 2016.
- LIU, T. et al. Endogenous Calcitonin Gene-Related Peptide Regulates Lipid Metabolism and Energy Homeostasis in Male Mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 5, p. 1194–1206, 1 maio 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LU, J. T. et al. Mice Lacking α -Calcitonin Gene-Related Peptide Exhibit Normal Cardiovascular Regulation and Neuromuscular Development. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 99–120, ago. 1999.
- MAASSENVANDENBRINK, A. et al. Wiping Out CGRP: Potential Cardiovascular Risks. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 9, p. 779–788, 1 set. 2016.
- MACHADO, J. et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagic-lysosomal proteolysis through cAMP/PKA signaling in rat skeletal muscles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 72, p. 40–50, mar. 2016.
- MACHADO, J. et al. α -Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagy and calpain systems and maintains the stability of neuromuscular junction in denervated muscles. **Molecular Metabolism**, 3 jul. 2019.
- MAEJIMA, Y. et al. Recent progress in research on molecular mechanisms of autophagy in the heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 4, p. H259–H268, 15 fev. 2015.
- MAGGI, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-

transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in neurobiology**, v. 45, n. 1, p. 1–98, jan. 1995.

MAMMUCARI, C. et al. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 458–471, dez. 2007.

MARIA FIMIA, G. et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1121–5, jun. 2007.

MCLATCHIE, L. M. et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. **Nature**, v. 393, n. 6833, p. 333–339, maio 1998.

MIGLIORINI, R. H. et al. Rapid activation of gluconeogenesis after intracerebroventricular carbachol. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 257, n. 4, p. E486–E490, out. 1989.

MIZUSHIMA, N. et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 9, p. 1679–88, maio 2003.

MIZUSHIMA, N. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069–75, 28 fev. 2008.

MOLINA, J. M. et al. Induction of insulin resistance in vivo by amylin and calcitonin gene-related peptide. **Diabetes**, v. 39, n. 2, p. 260–5, 1 fev. 1990.

MOORE, M. C. et al. Insulin- and glucagon-independent effects of calcitonin gene—related peptide in the conscious dog. **Metabolism**, v. 48, n. 5, p. 603–610, 1 maio 1999.

NAVEGANTES, L. C. C.; MIGLIORINI, R. H.; DO CARMO KETTELHUT, I. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 5, n. 3, p. 281–6, maio 2002.

NEW, H. V.; MUDGE, A. W. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. **Nature**, v. 323, n. 6091, p. 809–811, 30 out. 1986.

OH-HASHI, Y. et al. Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in α CGRP. **Circulation Research**, v. 89, n. 11, p. 983–990, 2001.

ODUIT, G. Y. et al. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 37, n. 2, p. 449–471, 2004.

PAULA-GOMES, S. **Papel da insulina e das catecolaminas na expressão de componentes de vias proteolíticas no coração e em cultura de cardiomiócitos de roedores**. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2013.

PAULA-GOMES, S. et al. Insulin Suppresses Atrophy- and Autophagy-related

Genes in Heart Tissue and Cardiomyocytes Through AKT/FOXO Signaling. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 12, p. 849–855, 11 jun. 2013.

PETTERSSON, M. et al. Calcitonin gene-related peptide: Occurrence in pancreatic islets in the mouse and the rat and inhibition of insulin secretion in the mouse. **Endocrinology**, v. 119, n. 2, p. 865–869, 1986.

PRZYGODDA, F. **Mecanismos e vias de sinalização envolvidos na ação anabólica da inervação simpática no tecido adiposo marrom de ratos**. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2016.

RANDHAWA, P. K.; JAGGI, A. S. A Review on Potential Involvement of TRPV1 Channels in Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, p. 107424841770705, 2017.

RAVIKUMAR, B. et al. Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, p. 1383–1435, 2010.
RUSSELL, F. A. et al. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 94, n. 4, p. 1099–142, out. 2014.

SACCA, L. et al. Role of gluconeogenesis in epinephrine-stimulated hepatic glucose production in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 245, n. 3, p. E294–E302, set. 1983.

SANCHEZ, J. .; KRAUSE, J. .; CORTRIGHT, D. . The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. **Neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 373–381, 23 nov. 2001.

SILVEIRA, W. A. et al. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 1, p. 11–19, 1 jul. 2014.

STEINER, T. J.; STOVNER, L. J.; BIRBECK, G. L. Migraine: the seventh disabler. **The journal of headache and pain**, v. 14, n. 1, p. 1, 10 jan. 2013.

SUN, J.-Y. et al. ORIGINAL ARTICLE: The approach to the mechanism of calcitonin gene-related peptide-inducing inhibition of food intake. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 5, p. 552–560, out. 2010.

TAKAHASHI, Y. et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 1142–1151, 23 out. 2007.

TANAKA, H.; KASHIWAGI, R.; KOIZUMI, T. Inhibition of Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) has the Potential to Extend First-phase Insulin Secretion. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 121, n. 05, p. 280–285, 14 maio 2013.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2503–2518, 1 dez. 2004.

THONG, F. S. L.; DUGANI, C. B.; KLIP, A. Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway. **Physiology**, v. 20, n. 4, p. 271–284, ago. 2005.

TORTORELLA, C. et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP), acting via CGRP type 1 receptors, inhibits potassium-stimulated aldosterone secretion and enhances basal catecholamine secretion from rat adrenal gland. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 261–4, 1 set. 2001.

UMOH, N. A. et al. Calcitonin Gene-Related Peptide Regulates Cardiomyocyte Survival through Regulation of Oxidative Stress by PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. **Annals of clinical and experimental hypertension**, v. 2, n. 1, p. 1007, jan. 2014.

UNNING, B. E. D.; TABORSKY, G. J. Calcitonin Gene-Related Peptide : A Potent and Selective. v. 120, n. 5, p. 1774–1781, 2015.

WANG, X.; FISCUS, R. R. Calcitonin gene-related peptide increases cAMP, tension, and rate in rat atria. **The American journal of physiology**, v. 256, n. 2 Pt 2, p. R421-8, fev. 1989.

YAMAGUCHI, A. et al. Calcitonin gene-related peptide and induction of hyperglycemia in conscious rats in vivo. **Diabetes**, v. 39, n. 2, p. 168–174, 1990.

YAMAMOTO, A. et al. Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells. **Cell Structure and Function**, v. 23, n. 1, p. 33–42, 1998.

YANG, D. et al. Activation of TRPV1 by Dietary Capsaicin Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation and Prevents Hypertension. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 2, p. 130–141, ago. 2010.

YANG, A. et al. Effect of calcitonin gene-related peptide on MC3T3-E1 osteoblast apoptosis and autophagy induced by serum starvation. **Hua xi kou qiang yi xue za zhi= Huaxi kouqiang yixue zazhi= West China journal of stomatology**, v. 35, n. 2, p. 133-138, 2017.

ZAHNER, M. R. et al. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. **The Journal of physiology**, v. 551, n. Pt 2, p. 515–23, set. 2003.

ZHAO, J. et al. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 472–483, dez. 2007.

ZHAO, Y. et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. **Nature cell biology**, v. 12, n. 7, p. 665–75, jul. 2010.