Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia

NATALIA LAUTHERBACH ENNES DA SILVA

**O efeito da urocortina 2 no metabolismo de
proteínas em músculos esqueléticos de
roedores**

Ribeirão Preto

2018

NATALIA LAUTHERBACH ENNES DA SILVA

**O efeito da urocortina 2 no metabolismo de
proteínas em músculos esqueléticos de
roedores**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –
USP para obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isis do Carmo Kettelhut

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lautherbach, Natalia Ennes da Silva

O efeito da urocortina 2 no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de roedores / Natalia Lautherbach Ennes da Silva ; orientadora, Isis do Carmo Kettelhut. – Ribeirão Preto, 2018.

152f. 30cm

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. Área de concentração: Fisiologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Urocortina 2. 2. Músculo esquelético. 3. Hipertrofia muscular
4. Sinalização intracelular. 5. Sistemas proteolíticos.

LAUTHERBACH, N. E. S. **O efeito da urocortina 2 no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de roedores.** Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Doutor 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: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

À minha muito amada mãe Denise Maria Lautherbach por sua presença constante em minha vida, pelo apoio em minhas decisões e pela vontade marcante de querer sempre desfrutar da felicidade de minhas realizações. A força de seu amor traz consigo a leveza e o equilíbrio necessários à minha caminhada.

Aos meus insubstituíveis avós maternos: Yolanda Machado Lautherbach (in memoriam) e Alcino Lautherbach (in memoriam) por terem sido, sem dúvida, os grandes incentivadores de minha trajetória profissional e da busca incessante pelos meus sonhos. Agradeço pelos ensinamentos sem os quais eu jamais seria capaz de até aqui chegar.

Ao meu afilhado Arthur Lautherbach de Faria por me permitir experimentar um sentimento tão doce e puro que é o de amar-te incondicionalmente! Você é capaz de me transformar a cada dia!

À minha querida madrinha Deise Maria Lautherbach por sempre me encorajar, pelo cuidado e pela preocupação com meu bem-estar e com o meu futuro! Agradeço por sempre ter acreditado em mim!

Amo muito vocês!!!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a **Deus** por sempre guiar meus passos, pelo amparo, por reger tudo ao seu tempo em minha vida e pela sustentação, principalmente, nos momentos mais difíceis de minha caminhada.*

*À minha mãe **Denise Maria Lautherbach** por todo cuidado, carinho, compreensão, incentivo e força desde o início de minha jornada para que esse momento tão esperado pudesse se concretizar. Gratidão eterna pela renúncia às suas vontades em detrimento de minha formação acadêmica. Todo seu auxílio foi imprescindível! Você é a representação da alegria contagiante de viver!*

*À minha admirável orientadora **Dra. Isis do Carmo Kettelhut** pelo exemplo a ser seguido de dedicação à carreira acadêmica e por todo comprometimento e zelo na orientação e correção deste trabalho. Agradeço imensamente pelas palavras de acolhimento, compaixão e ternura e, também pelo amparo emocional durante todos esses anos. Gratidão pela confiança, pelas oportunidades concedidas e por sempre me inspirar a ir além daquilo que se imagina ser possível!*

*Ao **Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes** por sempre me incentivar e encorajar, por me instigar o conhecimento e pelas fundamentais contribuições durante a realização deste trabalho.*

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

Ao meu pai **Carlos Henrique Ennes**, pelos preciosos conselhos e por sempre me estimular à buscar o que me completa e me faz sentir feliz. Obrigada por me ensinar que a vida pode ser tratada com mais leveza!

Aos meus queridos tios **Luiz Carlos Rodrigues Soares e Neuza Maria Lautherbach**, por todo zelo, cuidado, carinho e paciência ao longo desses anos. Obrigada por sempre acreditarem em mim!

Aos meus amados primos **Vitor José Lautherbach, Rosana Maria Lautherbach e Alexsandro Lautherbach de Faria**, por sempre me incentivarem e pelo amparo emocional e espiritual que vocês me oferecem. Amo-lhes.

Ao meu querido irmão **Thales Manzanni Ennes**, por todo seu amor e pelo exemplo de fraternidade, bondade e companheirismo. Amo você!

Ao meu inesquecível padrinho **Fernando Henrique Ennes** (in memorian), pelo exemplo de determinação e incentivo. Sua marcante personalidade deixou ensinamentos inestimáveis em minha vida!

À minha avó paterna **Ivete Alayde**, pelo carinho, cuidado, afeto e brincadeiras sempre divertidas durante o período de minha infância.

Ao **Tio Gildo** (in memorian), **Tia Maurinha e Mari**, uma família da qual me sinto parte e, principalmente, me sinto amparada e protegida. Gratidão pelo sincero anseio à minha evolução como ser humano.

Ao **Sr. Rôni**, por seu acolhimento, prontidão em conversar e ajudar e por me fazer perceber que não restam dúvidas sobre nossas atitudes e decisões quando escutamos o que o nosso coração é capaz de dizer. Obrigada pelos ensinamentos de caridade ao próximo!

À Neuza Zanon, pelos valiosos auxílios, pela eficiência na dinâmica experimental e pela paciência em todos os ensinamentos técnicos. Agradeço também pela companhia, preocupação e pelas conversas sempre agradáveis e muito divertidas!

À Antonieta Garófalo, por sua gentileza, serenidade, paciência e constante disponibilidade em ensinar e ajudar.

À Elza Filippin, pelo fundamental auxílio e apoio técnico durante os experimentos e pelos preciosos momentos de descontração e “prosas” divertidas na hora do café.

À Lilian Zorzenon, pela agradável convivência, paciência, prontidão, disponibilidade e ajuda para a realização dos experimentos.

Ao Victor Dias Galban pela gentileza e pela boa vontade em sempre querer ajudar, principalmente, no âmbito da tecnologia!

À Sílvia de Paula Gomes, pelos muitos ensinamentos de bancada e por sempre estar disposta à ajudar e ouvir (e muito!). Obrigada pelo exemplo de motivação experimental, amizade sincera e por me incentivar sempre a fazer o melhor que puder! Saudades de nossos dias de múltiplos experimentos!

À Flávia Aparecida Graça, por me inspirar admiração, pelo exemplo de ética experimental e pelos seus conselhos em forma de afetuosas palavras que sempre acalmam meu coração. Sua amizade ilumina minha vida!

Ao Heitor Bernardes, pelos inúmeros conselhos, pelo carinho, amparo e sustentação de um amigo verdadeiro. Obrigada pelo seu otimismo encorajador e por sempre estar disposto à conversar, se preocupar e ser tão prestativo!

*Ao **Dawit Albieiro Pinheiro**, por sempre me incentivar a transpor meus limites, me encorajar e por toda sua ajuda experimental e científica. Obrigada por seu apoio, sua amizade acolhedora e também pelo seu entusiasmo experimental contagiante!*

*Ao **Rafael Rossi Valentim**, exemplo de simplicidade, por sua amizade leal, pelas conversas sempre muito espirituosas e divertidas e pela preocupação sincera e incentivo científico!*

*Ao **Wiliam Silveira**, pela disponibilidade em ajudar e pela paciência de ensinar. Obrigada pelos conselhos científicos e afins, por sempre ter sido tão prestativo e pela agradável convivência e amizade!*

*Ao **Juliano Machado**, pela amizade marcante, conselhos espontâneos, por sempre me incentivar com muito otimismo, por acreditar em mim e se preocupar com meu bem-estar! Sua bondade é admirável!*

*Ao **Danilo Lustrino**, pelas opiniões autênticas, pela amizade e discussões científicas que sempre terminavam em comentários reflexivos!*

*À **Marluza Karlen Amarante**, pela amizade sincera e divertida, pelas longas conversas (rs), pela preocupação e por sempre torcer verdadeiramente pelo meu sucesso e pelas minhas conquistas!*

*Ao **Tiago Borges**, pela constante preocupação comigo desde que cheguei em Ribeirão Preto, pelo cuidado e pelas palavras sempre afetuosas e de incentivo!*

*Ao **Mouzarllem Barros**, a prova de que, de uma colaboração científica pode surgir uma linda amizade. Obrigada pela diversão contagiante!*

*À **Graziella Sodré**, pelo incentivo e pelas memoráveis conversas que sempre terminavam em muitas gargalhadas!*

*À **Franciele Przygodda**, pelos proveitosos momentos de convivência e discussões experimentais!*

*À **Samyra Buzelle**, pelas agradáveis conversas e risadas. Sua autenticidade é admirável!*

*Aos mais novos do laboratório, **Vinicius Taboni**, **Ana Paula Assis**, **Aline Zanatta**, **Karine Emanuelle** e **Natany Garcia** pelos momentos de diversão e conversas agradáveis, os quais tornam o ambiente leve e a rotina mais prazerosa! Vocês são muito queridos!*

*À **Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara** e ao aluno **Marcelo Pereira** do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelos experimentos de análise da função muscular.*

*Aos funcionários do departamento de fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à **Elisa** e à **Cláudia** pela notável paciência com minhas dúvidas e pela generosidade e disponibilidade em buscar soluções para os eventuais percalços da pós-graduação. Ao **Fernando** pela solidariedade e constante boa vontade em ajudar.*

Ao apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPESP.

Επίγραφε

*“Ouvindo a razão pra seguir adiante,
Renúncia ao lazer, coração assim diz.
Ausência do lar, noutra terra distante,
Nutrindo coragem – chegar sempre quis.”*

Luiz Carlos Rodrigues Soares

Resuma

RESUMO

LAUTHERBACH, N. E. S. **Os efeitos da urocortina 2 no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de roedores.** 152f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A urocortina 2 (Ucn2) é um peptídeo que pertence à família dos fatores liberadores de corticotrofina (CRF) e, assim como seu receptor específico CRF2R β (*corticotropin releasing factor receptor type 2 β*), encontram-se expressos no músculo esquelético. Embora tenha sido demonstrado que o tratamento sistêmico com Ucn2 seja capaz de induzir hipertrofia e prevenir a perda de massa muscular, nada se conhece acerca dos mecanismos moleculares através dos quais a Ucn2 desempenha suas ações biológicas. O principal objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação da Ucn2 no músculo esquelético de roedores para o aparecimento da resposta hipertrófica e a possível participação das vias de sinalização Akt/mTOR, Akt/Foxo e ERK1/2 neste efeito anabólico. Para isto foi utilizado o modelo de transfecção *in vivo* da Ucn2 pelo método da eletroporação em músculos *tibialis anterior* de camundongos. Nestes músculos foram quantificados: 1) o estado de fosforilação de componentes efetores destas vias; 2) moléculas sinalizadoras da via autofágica; 3) a taxa de síntese proteica *in vivo* e 4) a expressão de genes relacionados à atrofia muscular (atrogenes). Outra metodologia utilizada para verificar o efeito direto da Ucn2 na musculatura esquelética foi a incubação *in vitro* de músculos *soleus* e EDL isolados de roedores com este peptídeo a fim de investigar a taxa de degradação proteica total, bem como a atividade dos sistemas proteolíticos lisossomal, ubiquitina-proteassoma e dependente de Ca⁺². A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias promoveu hipertrofia e preveniu a atrofia em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais e submetidos ao modelo de desnervação motora isquiática.

Este crescimento muscular induzido pela Ucn2 *in vivo* foi associado a ativação das vias de sinalização AMPc/PKA/CREB, AMPc/Epac, Akt/mTOR/S6, Akt/mTOR/4E-BP1 e ERK1/2/eIF4E com consequente estimulação da síntese proteica. Em concordância, utilizando uma técnica de manipulação genética *in vivo*, demonstramos que a hipertrofia promovida pela Ucn2 é dependente da estimulação das cascatas de sinalização ativadas por Akt e ERK1/2. Ademais, essa alteração fenotípica promovida pela Ucn2 induziu melhora da resistência à fadiga muscular, sendo este impacto funcional dependentente de ERK1/2, mas não de Akt. Além disso, a superexpressão da Ucn2 induziu “*shifting*” para o tipo de fibra oxidativa (tipo I), sendo esta plasticidade possivelmente mediada por PGC-1 α , o que pode ter contribuído pelo menos em parte, para o efeito benéfico promovido pela Ucn2 na função muscular. O efeito antiatrófico da Ucn2 *in vivo* foi associado à estimulação da via Akt/Foxo1,3 concomitante com a redução da atividade transcricional de Foxo, resultando na diminuição da expressão da E3-ligase atrogin-1 e do gene autofágico LC3. Em paralelo, a Ucn2 *in vivo* promoveu inibição do fluxo autofágico, inferido pelo acúmulo das proteínas LC3-I, LC3-II e p62 nestes músculos. Corroborando os achados *in vivo*, os efeitos antiproteolíticos da Ucn2 *in vitro* parecem ser mediados pelo AMPc e envolvem a supressão da atividade do sistema lisossomal/autofágico em músculos EDL de ratos normais. Portanto, além da participação de efetores *dowsntream* do AMPc, como PKA e EPAC, diferentes quinases participam dos efeitos biológicos da Ucn2 na musculatura esquelética. Esses resultados são importantes para caracterizar novas estratégias terapêuticas capazes de atuar no combate à atrofia muscular em diversas situações catabólicas.

Palavras-chave: Urocortina 2. Hipertrofia muscular. Sinalização intracelular. Autofagia

Abstract

ABSTRACT

LAUTHERBACH, N. E. S. **The urocortin 2 effects on protein metabolism in skeletal muscles of rodents.** 152f. Thesis (Doctorate) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Urocortin 2 (Ucn2) is a peptide that belongs to corticotrophin releasing factors (CRF) family and, as well as its specific receptor CRF2R β (corticotropin releasing factor receptor type 2 β), are expressed in skeletal muscle. Although it has been demonstrated that Ucn2 systemic treatment is able to induce hypertrophy and prevent loss of muscle mass, nothing is known about the molecular mechanisms through which Ucn2 plays its biological actions. The main objective of this work was to investigate the Ucn2 mechanism of action in rodent skeletal muscle for the appearance of the hypertrophic response and the possible participation of Akt/mTOR, Akt/Foxo and ERK1/2 signaling pathways in this anabolic effect. For this, an *in vivo* transfection model of Ucn2 was used by the electroporation method in *tibialis anterior* muscles of mice. Were quantified in these muscles: 1) the phosphorylation state of effector components of these pathways; 2) signaling molecules of the autophagic pathway; 3) the rate of protein synthesis *in vivo* and 4) the expression of genes related to muscle atrophy (atrogenes). Another methodology used to verify the direct effect of Ucn2 in skeletal muscle was the incubation of *soleus* and EDL muscles isolated from rodents with this peptide *in vitro* in order to investigate the total rate of protein degradation, as well as the activity of the lysosomal, ubiquitin-proteasome and Ca⁺² dependent proteolytic systems. Ucn2 overexpression *in vivo* for 14 days promoted hypertrophy and prevented atrophy in *tibialis anterior* muscles of normal mice and submitted to the sciatic motor denervation model. This muscle growth induced by Ucn2 *in vivo* was associated with the activation of

cAMP/PKA/CREB, cAMP/Epac, Akt/mTOR/S6, Akt/mTOR/4E-BP1 and ERK1/2/eIF4E signaling pathways with consequent stimulation of protein synthesis. In agreement, using a genetic manipulation technique *in vivo*, we demonstrated that the hypertrophy promoted by Ucn2 is dependent on the stimulation of the signaling cascades activated by Akt and ERK1/2. In addition, this phenotypic alteration promoted by Ucn2 induced an improvement in muscle fatigue resistance, being this functional impact dependent on ERK1/2, but not on Akt. Moreover, Ucn2 overexpression *in vivo* induced the shift to type I oxidative fiber, and this plasticity is possibly mediated by PGC-1 α , which may have contributed at least in part to the beneficial effect promoted by Ucn2 in muscle function. The anti-atrophic effect of Ucn2 *in vivo* was associated with the stimulation of Akt/Foxo1,3 pathway concomitant with the reduction of Foxo transcriptional activity, resulting in a decrease in the expression of the atrogin-1 E3-ligase and of the autophagic gene LC3. In parallel, Ucn2 *in vivo* promoted inhibition of autophagic flow, inferred by the accumulation of LC3-I, LC3-II and p62 proteins in these muscles. Corroborating the *in vivo* findings, the antiproteolytic effects of Ucn2 *in vitro* appear to be mediated by cAMP and involve the suppression of lysosomal/autophagic system activity in EDL muscles of normal rats. Thus, in addition to the participation of cAMP downstream effectors, such as PKA and EPAC, different kinases participate in the biological effects of Ucn2 on skeletal muscle. These results are important to characterize new therapeutic strategies able to prevent muscular atrophy in several catabolic situations.

Keywords: Urocortin 2. Muscular hypertrophy. Intracellular signaling. Autophagy

LISTA DE SIGLAS

AC	Adenilato Ciclase
Akt	Proteína quinase B
Atg	Genes relacionados à autofagia
AMP	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato cíclico
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
CRF	<i>Corticotrophin-releasing factor</i>
CRF1R	<i>Corticotrophin-releasing factor 1 receptor</i>
CRF2R	<i>Corticotrophin-releasing factor 2 receptor</i>
E1	Enzima ativadora de Ub
E2	Enzima carreadora de Ub
E3	Enzima ligante de Ub
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
eif4E	<i>Eucaryotic translation initiation factor 4E</i>
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EPM	Erro padrão da média

Foxo	Forkhead box class O
Gabarap	γ -aminobutyric acid receptor-associated protein
GSK3- β	Glicogênio sintase quinase 3- β
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina – I
IRS	Substrato do receptor de insulina
LC3	<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MKP-1	Fosfatase 1 da MAPK
mTOR	Proteína alvo da rapamicina de mamíferos
MuRF1	<i>Muscle RING (Really Interesting New Gene) Finger – 1</i>
MYH	<i>Myosin heavy chain</i>
PDK	Proteína quinase dependente de fosfatidilinositol
PI3K	Quinase de fosfoinosídeos na posição 3
p70 ^{S6K}	Proteína quinase S6 da subunidade ribossomal de 70kDa
PAF	Pré-autofagossoma
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>

PHAS-1/4E-BP1	Proteína ligante do eIF4E
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
<i>s.c.</i>	Subcutâneo
S6K1/p70S6K	Proteína quinase S6 da subunidade ribossomal de 70kDa
UA	Unidades arbitrárias
Ub	Ubiquitina
UbP	Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma
Ucn1	Urocortina 1
Ucn2	Urocortina 2
Ucn3	Urocortina 3

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistemas proteolíticos intracelulares	2
<i>1.1.1. Sistema Proteolítico lisossomal.....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2. Sistema Proteolítico ubiquitina-proteassoma</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3. Sistema Proteolítico dependente de cálcio.....</i>	<i>7</i>
1.2. A urocortina 2 (Ucn2) e o sistema urocortinérgico	8
<i>1.2.1. A Ucn2 como um peptídeo modulador da massa muscular esquelética</i>	<i>10</i>
1.3. Principais vias de sinalização envolvidas no controle do metabolismo de proteínas na musculatura esquelética.....	12
<i>1.3.1. Via de sinalização clássica Akt/Foxo.....</i>	<i>12</i>
<i>1.3.2. Via de sinalização MEK/ERK1/2</i>	<i>15</i>
<i>1.3.3. Via de sinalização AMPc/PKA.....</i>	<i>17</i>
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Animais	21
3.2. Modelos atroficos	21
<i>3.2.1. Desnervação motora isquiática (DEN).....</i>	<i>21</i>
<i>3.2.2. Jejum</i>	<i>22</i>
3.3. Plasmídeos	22
3.4. Cultura de linhagem de células musculares	23
<i>3.4.1. Transfecção in vitro em cultura de células C2C12.....</i>	<i>24</i>
<i>3.4.2. Transfecção in vivo por eletroporação</i>	<i>24</i>

3.5. Determinação das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc).....	28
3.6. Quantificação da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real.....	29
3.7. Western blot	32
3.8. Avaliação da síntese proteica <i>in vivo</i> pelo método SUNSET (<i>surface sensing of translation</i>) em músculos <i>tibialis anterior</i>.....	34
3.9. Avaliação <i>in vivo</i> da atividade transcricional de Foxo pelo ensaio do repórter duplo da luciferase	35
3.10. Delineamento experimental para avaliação da atividade proteolítica <i>in vitro</i> em músculos esqueléticos isolados de ratos e camundongos.....	36
3.10.1. Procedimentos para incubação.....	37
3.10.2. Medida da velocidade de degradação proteica	38
3.10.3. Delineamento experimental para avaliação da atividade da via proteolítica ubiquitina-proteassoma.....	39
3.10.4. Delineamento experimental para avaliação da atividade da via proteolítica lisossomal/autofágica	40
3.10.5. Delineamento experimental para avaliação da atividade da via proteolítica dependente de Ca^{+2} modelo “free-stretch”	41
3.11. Avaliação da função muscular <i>in vivo</i> em músculos <i>tibialis anterior</i>	43
3.12. Análises histológicas de músculos <i>tibialis anterior</i>	44
3.12.1. Coloração com hematoxilina e eosina	44
3.12.2. Ensaio de Imunofluorescência para marcação do peptídeo Ucn2	45
3.12.3. Ensaio de Imunofluorescência para marcação do tipo de fibra muscular e medida da área de secção transversa	46
3.13. Análise estatística	46
4. RESULTADOS	48
4.1. Caracterização do modelo experimental	48

4.1.1. Superexpressão in vitro da Ucn2 em células musculares C2C12 não-diferenciadas (mioblastos)	48
4.1.2. Superexpressão in vivo da Ucn2 em músculos <i>tibialis anterior</i> de camundongos.....	50
4.2. Efeitos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da Ucn2 na modulação da massa e no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de roedores	56
4.2.1. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 na massa muscular de camundongos normais	56
4.2.2. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 na massa muscular de camundongos submetidos a condições atroficas.....	58
4.3. Vias de sinalização intracelulares ativadas pela superexpressão <i>in vivo</i> da Ucn2 no músculo esquelético	60
4.3.1. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 na regulação de componentes da via de sinalização canônica AMPc/PKA/CREB.....	61
4.3.2. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 na regulação de componentes das vias de sinalização clássica Akt/mTOR.....	67
4.3.3. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 na regulação de componentes das vias de sinalização das MAP quinases.....	74
4.3.4. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 na taxa de síntese proteica em músculos <i>tibialis anterior</i> de camundongos normais	77
4.3.5. Efeito da superexpressão in vivo dos plasmídeos contendo o gene <i>dnAkt</i> ou <i>mkp1</i> na hipertrofia induzida pela Ucn2 em músculos <i>tibialis anterior</i> de camundongos normais.....	80
4.3.6. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 no estado de fosforilação dos receptores de insulina/IGF-1	82
4.3.7. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2 na regulação de componentes da via de sinalização clássica Akt/Foxo	85

4.4. Efeito da superexpressão <i>in vivo</i> da Ucn2 na expressão das Ub-ligases, dos genes autofágicos e na atividade transcricional de Foxo em músculos <i>tibialis anterior</i> de camundongos normais	88
4.5. Efeito <i>in vitro</i> da Ucn2 na proteólise total e na atividade dos sistemas proteolíticos ubiquitina-proteassoma, lisossomal/autofágico e dependente de Ca^{+2} em músculos EDL de camundongos e ratos normais e atroficos.....	91
4.6. Efeito da superexpressão <i>in vivo</i> da Ucn2 na modulação dos marcadores autofágicos, LC3-II e p62 em músculos <i>tibialis anterior</i> de camundongos normais	97
4.7. Efeito da superexpressão <i>in vivo</i> da Ucn2, <i>dnAkt</i> e <i>mkp1</i> na força e na resistência à fadiga musculares em <i>tibialis anterior</i> de camundongos normais	100
4.8. Efeito da superexpressão <i>in vivo</i> da Ucn2 no conteúdo proteico das miosinas de cadeia pesada de contração lenta e de contração rápida em músculos <i>tibialis anterior</i> de camundongos normais	104
4.9. Efeito da superexpressão <i>in vivo</i> da Ucn2 na área de secção transversa das fibras musculares e no conteúdo proteico da MYH IIa e MYH IIx/IIb	106
5. DISCUSSÃO	107
5.1. A Ucn2 e a regulação da síntese de proteínas na musculatura esquelética	108
5.2. A Ucn2 e a regulação da degradação de proteínas na musculatura esquelética	114
5.3. A Ucn2 e a regulação da função e da plasticidade das fibra musculares	121
6. CONCLUSÃO.....	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético representa cerca de 40-50% da massa corporal total, sendo um dos mais importantes tecidos de controle do metabolismo em mamíferos, adaptando-se rapidamente a mudanças em suas demandas fisiológicas e metabólicas (HINKLE *et al.*, 2003a; NADER, 2005). As proteínas que compõem o músculo estriado esquelético estão sob contínuo *turnover*, ou seja, são constantemente hidrolisadas a aminoácidos e novamente sintetizadas e, por conseguinte, a regulação da massa muscular ocorre através do fino e preciso balanço entre estes processos dinâmicos de degradação e síntese proteica. Sendo assim, mesmo uma pequena redução na síntese e/ou um modesto incremento na degradação, se mantidos, podem resultar em atrofia muscular. Por outro lado, a relação inversa desses processos configura o estado de hipertrofia muscular (EPSTEIN, MITCH e GOLDBERG, 1996; GOLL *et al.*, 1998).

A depleção da massa muscular esquelética está presente em numerosas situações catabólicas, como por exemplo, imobilização (APPELL, 1990), jejum (BATES e MILLWARD, 1983; KETTELHUT *et al.*, 1994), sepse (BREULLIÉ *et al.*, 1998; LIRA *et al.*, 2007), tratamento com glicocorticoides (FORMICA *et al.*, 1997), desnervação motora isquiática (HADDAD *et al.*, 1997; HASSELGREN, 1999) e diabetes *mellitus* tipo I (PEPATO *et al.*, 1996). É sabido que a atrofia muscular presente nessas condições é oriunda, principalmente, do incremento da degradação de proteínas (LECKER *et al.*, 1999; LECKER e GOLDBERG, 2002), que por sua vez, consiste em um processo complexo e precisamente regulado que ocorre fisiologicamente em praticamente todos os tipos celulares (RECHSTEINER, 1987). O estabelecimento de processos atroficos envolve a interação orquestrada, seletiva e cooperada de três grandes sistemas proteolíticos intracelulares, sendo extenso o interesse acerca da contribuição individual de cada um: sistemas lisossomal,

ubiquitina proteassoma (UbP) e dependente de cálcio (Ca^{+2}) (JACKMAN e KANDARIAN, 2004), sendo os dois primeiros os mais estudados. Considerando que a atrofia muscular, acompanhada de consequente redução da força, são os fatores majoritários responsáveis pela morbidade e mortalidade de pacientes (LECKER e GOLDBERG, 2002) é de extrema relevância o conhecimento de mecanismos de ação moleculares de drogas que minimizam e/ou inibem a degradação proteica e estimulem os processos de síntese em situações patológicas, promovendo assim a manutenção da massa muscular.

1.1. Sistemas proteolíticos intracelulares

1.1.1. Sistema proteolítico lisossomal

O sistema proteolítico lisossomal foi a primeira via proteolítica intracelular descrita na literatura e, como o próprio nome sugere, é caracterizado pela degradação de macromoléculas no interior do lisossomo (BLOMMAART *et al.*, 1997). Esta organela 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 ativação destas enzimas, bem como o seu isolamento físico pela membrana lisossomal são cruciais para evitar a digestão de constituintes celulares e extracelulares. As catepsinas B, D, H e L são as principais proteases lisossomais e determinam a capacidade proteolítica dos lisossomos, sendo as catepsinas B e L as principais proteases ativadas em situações de atrofia muscular (BECHET *et al.*, 2005). Essas enzimas são responsáveis por degradar grande parte das proteínas extracelulares e de membrana endocitadas bem como proteínas citoplasmáticas e organelas (TANIDA *et al.*, 2004). Os substratos alcançam as enzimas intralisossomais através

de três processos autofágicos: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia (BECHET *et al.*, 2005; BLOMMAART *et al.*, 1997).

Na musculatura esquelética os substratos alcançam as enzimas intralisossomais principalmente através da macroautofagia, também denominada de autofagia e assim, denominada a partir de agora neste trabalho (BLOMMAART *et al.*, 1997). Este processo é ilustrado na Figura 1, sendo inicialmente caracterizado pela formação no citosol de uma membrana de camada dupla que envolve o substrato proteico, chamada inicialmente de pré-autofagossoma (PAF), que por sua vez, dá origem ao autofagossomo (KLIONSKY e EMR, 2000). Por conseguinte, este vacúolo então se funde ao lisossomo determinando a degradação do substrato proteico (TANIDA *et al.*, 2004).

Figura 1: Representação esquemática do processo macroautofágico. Atg1, Atg5, Atg12, proteínas autofágicas 1, 5 e 12; PAS, pré-autofagossoma; PI3K_{III}, fosfatidilinositol 3-quinase da classe III; LC3, *microtubule-associated protein light chain 3*; GABARAP, *γ-aminobutyric acid receptor-associated protein* (Modificado de BECHET *et al.*, 2005).

Há mais de 30 genes identificados relacionados à autofagia, sendo denominados de atg (XIE e KLIONSKY, 2007). O complexo multiproteico Beclin1 e enzima Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), uma PI3K_{III} (fosfatidilinositol 3-quinase de classe III), em conjunto com o

conjugado Atg5-12 são importantes para iniciar o processo de isolamento da membrana dupla e formar o PAF (BECHET *et al.*, 2005; GENG e KLIONSKY *et al.*, 2008). As Atg5-12 são essenciais para a macroautofagia, já que este processo se encontra supresso em células deficientes em Atg5. Células de mamíferos expressam três proteínas homólogas à Atg8, identificadas inicialmente em leveduras: LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*), Gabarap (*γ -aminobutyric acid receptor-associated protein*) e GATE 16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa*) (TANIDA *et al.*, 2004). A LC3 e a Gabarap são essenciais para a formação da membrana dupla do autofagossomo (TANIDA *et al.*, 2004), sendo a LC3 apresentada sob duas formas: LC3-I e LC3-II. A primeira é formada pela clivagem da região carboxi-terminal da LC3 pela Atg4B. A transformação de LC3-I em LC3-II é catalisada pelas Atg3 e Atg7 e permite a ligação de LC3-II a um fosfolípido de membrana (fosfatidiletanolamina), o que facilita a translocação de LC3 do citosol para a membrana (GENG e KLIONSKY, 2008). O interesse pela participação e regulação da via proteolítica lisossomal na regulação do metabolismo de degradação de proteínas vem se tornando cada vez mais evidente. O aumento da expressão do RNAm, bem como da atividade, das catepsinas B, D e L foi observado em músculos de roedores submetidos a diferentes modelos indutores de atrofia muscular, como sepse, tratamento com dexametasona, desuso e também em pacientes com distrofia muscular de Duchenne (TAILLANDIER *et al.*, 1996; DEVAL *et al.* 2001; SANADA *et al.*, 1978; SANO *et al.*, 1988; KATUNUMA *et al.*, 1978; DARDEVET *et al.*, 1995)

1.1.2. Sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma (UbP)

O sistema proteolítico UbP é o responsável pela maior parte da degradação proteica intracelular que ocorre nos tecidos dos mamíferos (ROCK *et al.*, 1994), estando sua atividade

elevada em quadros de catabolismo severo, como: sepse, desnervação, diabetes e jejum (BODINE *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001; JAGOE *et al.*, 2002; LECKER *et al.*, 2004).

A degradação de proteínas pelo sistema UbP é realizada por um complexo enzimático multicatalítico, conhecido como proteassoma 26S (BAUMEISTER *et al.*, 1998), presente no núcleo e no citoplasma de células eucarióticas (KISSELEV e GOLDBERG, 2001). Os substratos do proteassoma incluem moléculas sinalizadoras, supressores de tumores, reguladores do ciclo celular, fatores de transcrição, proteínas anti-apoptóticas (por exemplo, Bcl-2), dentre outros (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). O proteassoma 26S é formado pelo complexo proteolítico 20S e por um ou dois complexos regulatórios 19S. O complexo 19S contém subunidades (Rpn10 e Rpn13) e ATPses que reconhecem e clivam a cadeia poliubiquitinada, respectivamente, com consequente liberação do substrato proteico que então será degradado pelo complexo 20S (ZWICKL *et al.*, 1999; LIU; JACOBSON, 2013). O complexo 20S, por sua vez, é um cilindro formado por 4 anéis empilhados: 2 anéis α que se complexam com a subunidade regulatória 19S e 2 anéis β centrais responsáveis pela atividade catalítica do proteassoma. Existem três subunidades β que contêm sítios os ativos nomeados segundo sua atividade enzimática específica: hidrolase de peptidil-glutamil (β 1), tripsina-like (β 2) e quimiotripsina-like (β 5) (GROLL *et al.*, 2001), as quais degradam o substrato em peptídeos de 3 a 22 aminoácidos (KISSELEV *et al.*, 1999).

No entanto, o proteassoma só reconhece o substrato se este já tiver sofrido o processo de ubiquitinação, uma modificação pós-traducional, que consiste na ligação covalente com várias moléculas de ubiquitina (Ub), culminando na marcação do substrato proteico com uma cadeia poliubiquitinada que será então reconhecida pelo proteassoma 26S (Figura 2) (GLICKMAN e CIECHANOVER, 2002; PICKART, 2004). O processo de ubiquitinação requer a ativação da Ub livre e o seu carregamento até a proteína-alvo e envolve a participação de uma cascata enzimática, que compreende as enzimas: E1 – enzima ativadora de Ub, E2 –

enzima conjugadora de Ub e E3 – enzima ligadora de Ub ou Ub-ligase. A enzima E1 ativa a molécula de Ub em um processo dependente de ATP e a transfere para a proteína carregadora E2 que, por sua vez, apresenta a Ub para a enzima E3. A Ub-ligase é responsável por reconhecer com especificidade o substrato proteico, catalisando a transferência da molécula de Ub para o substrato (LECKER, GOLDBERG e MITCH, 2006). Este processo se repete várias vezes criando uma cauda poliubiquitinada que marca o substrato a ser degradado pelo proteassoma 26S (WILKINSON, 1999; PICKART, 2001).

Figura 2. Representação esquemática do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma. (*E1*) enzimas ativadoras de Ub, (*E2*) enzimas conjugadoras de Ub e (*E3*) enzimas ligadoras de Ub. (Ub – Ubiquitina) (Modificado de JACKMAN e KANDARIAN, 2004).

As E3 ligases MuRF1 (*Muscle RING Finger 1*) e atrogin-1, também conhecida como MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*), são específicas da musculatura esquelética e estão envolvidas no reconhecimento e na degradação de proteínas contráteis musculares como actina, miosina de cadeia pesada e troponina. A expressão destas Ub-ligases encontram-se elevadas em vários estados catabólicos como o câncer, insuficiência renal, sepse, queimadura, desnervação, diabetes e jejum (BODINE *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001; JAGOE *et al.*,

2002; LECKER *et al.*, 2004). Bodine *et al.* (2001) demonstraram que camundongos com mutação genética de MuRF1 e atrogin-1 apresentaram resistência à atrofia induzida pela desnervação motora isquiática por 14 dias em músculo gastrocnêmio, salientando o importante papel das E3 ligases como fatores chaves na degradação de proteínas miofibrilares induzida pelo sistema UbP.

Vale destacar que as Ub-ligases (atrogin-1 e MuRF1), as proteínas lisossomais/autofágicas LC3, Gabarap, bem como a protease lisossomal catepsina L fazem parte de um programa de genes atrofícos, denominados de **atrogenes** e, portanto, são marcadores de degradação proteica. Isto significa dizer que estes genes são expressos ou suprimidos de maneira coordenada em músculos esqueléticos submetidos à condições catabólicas.

1.1.3. Sistema proteolítico dependente de cálcio

O sistema dependente de cálcio (Ca^{+2}) conta com a participação de duas cisteína-proteases citosólicas principais: micro-calpaína (μ -calpaína ou calpaína I) ativada em concentrações de 5 a 50 μM de Ca^{+2} (INOMATA *et al.*, 1983), e a milicalpaína (m-calpaína ou calpaína II) ativada em concentrações de Ca^{+2} entre 200 e 1000 μM (INOMATA *et al.*, 1983). As calpaínas estão normalmente presentes no citosol sob um estado inativo (SUZUKI *et al.*, 1995) pela ação da calpastatina, um inibidor endógeno específico dessas proteases, e se tornam ativas em situações em que há uma perturbação na homeostase do Ca^{+2} citosólico culminando no conseqüente aumento da proteólise muscular (TIDBALL; SPENCER, 2000). Estudos demonstram que a atrofia induzida por desnervação, queimadura e sepse está associada à elevação da concentração intracelular de Ca^{+2} (TIDBALL; SPENCER, 2000) ocasionando, portanto, a ativação do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} . Além disso, a

degradação proteica presente em modelos de sepse e imobilização por suspensão da cauda foi suprimida com drogas capazes de restaurar as concentrações intracelulares de Ca^{+2} (WAGATSUMA *et al.*, 2002). Tidball e Spencer (2002) demonstraram que a superexpressão da calpastatina em músculo *soleus* atenuou a atrofia induzida pelo modelo de desuso em músculos *soleus* de camundongos, quando comparado aos animais selvagens evidenciando a importância da participação das calpaínas na indução da proteólise muscular.

Conforme o exposto anteriormente, a maior parte da proteólise miofibrilar é atribuída à participação da atividade do proteassoma 26S (SOLOMON *et al.*, 1998; TAILLANDIER *et al.*, 1996), apesar de ser bem estabelecido a incapacidade desse sistema enzimático multicatalítico em degradar proteínas contráteis intactas (SOLOMON *et al.*, 1998). No entanto, as proteínas estruturais miofibrilares titina, vinculina, nebulina, dentre outras, são sabidamente substratos das calpaínas, apesar destas serem ineficientes em degradar os filamentos de actina e miosina (SORIMACHI, ONO e SUZUKI, 2000). Nesse sentido, as calpaínas podem ser importantes nas etapas iniciais da proteólise muscular, já que, parecem viabilizar as proteínas miofibrilares, já parcialmente degradadas, para o processo de ubiquitinação em modelos atroficos.

Todos estes sistemas proteolíticos são controlados por fatores hormonais, neurais e nutricionais, cujos mecanismos moleculares ainda são assunto de intensa investigação.

1.2. A urocortina 2 (Ucn2) e o sistema urocortinérgico

A urocortina 2 (Ucn2) consiste em um peptídeo de 38 aminoácidos, também conhecido como peptídeo relacionado à estresse/copina (SRP) (REYES *et al.*, 2001; HSU e HSUEH, 2001), membro da família de neuropeptídeos do fator liberador de corticotrofina

(CRF), da qual também fazem parte os homólogos CRF, a urotensina 1, a sauvagina, a urocortina 1 e a urocortina 3 (HSU e HSUEH, 2001). As ações fisiológicas desses peptídeos são desencadeadas pela ligação e, consequente ativação individual, de dois tipos de receptores, CRF1R (*corticotrophin-releasing factor 1 receptor*) (CHEN *et al.*, 1993) e CRF2R (α , β , γ) (*corticotrophin-releasing factor 2 receptor*) (KISHIMOTO *et al.*, 1995; LOVENBERG *et al.*, 1995; PERRIN *et al.*, 1995). A Ucn2 e a Ucn3 são agonistas seletivos do CRF2R (HSU e HSUEH, 2001; LEWIS *et al.*, 2001), ao passo que o CRF, a Ucn1 e a sauvagina possuem afinidade para ambos os receptores (PERRIN *et al.*, 1999; DAUTZENBERG *et al.*, 2001).

A expressão da Ucn2 foi inicialmente demonstrada em poucas regiões do sistema nervoso central de ratos, precisamente em neurônios hipotalâmicos relacionados ao estresse, tais como os núcleos arqueado e paraventricular e, em regiões responsáveis por funções cognitivas, como o *locus coeruleus* (REYES *et al.*, 2001). Posteriormente, estudos mostraram a presença de Ucn2 no núcleo supraóptico, na subdivisão magnocelular, nos núcleos motores do tronco cerebral (trigeminal, facial e hipoglosso), nos núcleos motores do corno ventral da medula espinhal e nos lobos anterior e intermediário/posterior da hipófise de ratos (HSU e HSUEH, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2005). Além disso, foram descritas projeções aferentes urocortinérgicas para células do núcleo dorsal da Rafe (LUITEN *et al.*, 1985; SIM e JOSEPH, 1991; PEYRON *et al.*, 1997), sabidamente um sítio primário de neurônios serotoninérgicos responsáveis pela regulação de respostas associadas à ansiedade e ao comportamento durante situações de estresse (DINAN, 1996; CARRASCO e VAN DE CAR, 2003; LOWRY, 2002). Coste *et al.* (2000) e Bale *et al.* (2000) demonstraram aumento da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e hipersensibilidade ao estresse em camundongos *knockout* para CRF2R. Esses achados permitiram sugerir uma regulação da Ucn2 sobre este eixo, hipótese reforçada por Chen *et al.* (2003), que demonstraram um efeito direto dos

glicocorticóides na indução da expressão gênica de Ucn2 em linhagem de células neuronais NG108-15. De fato, Neufeld-Cohen *et al.* (2010), mostraram que camundongos *knock-out* para Ucn1/Ucn2 apresentaram acentuado fenótipo ansiolítico associado à redução da atividade do eixo HPA e aumento dos níveis de expressão de serotonina em regiões centrais associadas à regulação da circuitaria de resposta ao estresse. Dessa forma, o papel central da Ucn2 como um dos mediadores das ações do sistema urocortinérgico tem sido foco de intensa investigação e, sugere-se que este peptídeo seja um moderador endógeno das ações desencadeadas pelo eixo HPA em situações de estresse. Dentre as ações periféricas já descritas da Ucn2 destacam-se: efeito cardioprotetor (BALE *et al.*, 2004; BRAR *et al.*, 2004), redução da ingestão alimentar e da velocidade de esvaziamento gástrico (HSU e HSUEH, 2001), indução de vasodilatação periférica (WILEY e DAVENPORT, 2004) e ações hipertrófica e anti-atrófica na musculatura esquelética (HINKLE *et al.*, 2003a; HINKLE *et al.*, 2003b; HINKLE *et al.*, 2004)

1.2.1. A Ucn2 como um peptídeo modulador da massa muscular esquelética

Os efeitos biológicos da Ucn2 são mediados pela ativação do seu receptor específico CRF2R sendo no músculo esquelético expressa a isoforma CRF2R β (LOVENBERG *et al.*, 1995; HINKLE *et al.*, 2004; SAMUELSSON *et al.*, 2004). A expressão de ambos, tanto do receptor quanto de seu ligante específico, o peptídeo Ucn2, na musculatura esquelética, sugerem uma ação autócrina/ parácrina urocortinérgica, a qual é foco de crescente interesse científico. A primeira evidência de que a ativação do CRF2R seria capaz de controlar a massa muscular foi reportada por Hinkle *et al.*, (2003a), que demonstraram que o tratamento com o análogo não-seletivo sauvagina (10 dias; mini-pump: 0,3 ou 1,0 mg/kgdia), reverteu a atrofia induzida pela desnervação em músculos *tibialis anterior* e gastrocnêmio medial de

camundongos *knockout* para CRF1R. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a administração sistêmica de Ucn2 (10; 30; 100 e 300 µg/kg/dia; s.c.) preveniu a atrofia em músculos *tibialis anterior* e gástronêmio medial de ratos e camundongos submetidos aos modelos de desnervação motora isquiática (9 dias), desuso (9 dias) e tratamento com dexametasona (9 dias; 1,2 mg/kg/dia, ofertada nos bebedouros de água) (HINKLE *et al.*, 2003b). O tratamento sistêmico com PG-873637 (8 semanas; mini-pump), um agonista seletivo do CRF2R, promoveu um discreto aumento da massa absoluta dos músculos *soleus* e EDL (*extensor digitorum longus*) de camundongos normais e *mdx* (modelo de distrofia muscular de Duchenne) concomitante com redução da atividade plasmática da enzima creatina quinase, um marcador de dano muscular (HALL *et al.*, 2007). Interessante destacar, que o tratamento com Ucn2 também promoveu hipertrofia em músculos de animais normais e distróficos (HINKLE *et al.*, 2003b; HINKLE *et al.*, 2004; REUTENAUER-PATTE *et al.*, 2012).

Embora esses achados evidenciem que a Ucn2 seja capaz de modular a massa muscular sob condições fisiológicas e patológicas, os mecanismos moleculares envolvidos nas ações deste peptídeo são ainda desconhecidos. Sabe-se que o CRF2R é um receptor acoplado à proteína G (GPCR), especificamente à subunidade estimulatória G_{as}, que por sua vez, estimula a enzima adenilil ciclase, aumentando assim as concentrações intracelulares de AMPc. A Ucn2 é capaz de estimular a produção de AMPc *in vitro* em miotubos C2C12 (KUPERMAN *et al.*, 2011) e em tecido muscular isolado (gástronêmio medial e *tibialis anterior*) de camundongos (HINKLE *et al.*, 2003a; HINKLE *et al.*, 2003b). Apesar de ser bem conhecida que a estimulação da via de sinalização do AMPc é capaz de promover hipertrofia e combater a atrofia em diversos modelos de perda de massa muscular, como desnervação, desuso, sepse, câncer e distrofinopatias (BERDEAUX; STEWART, 2012), não são ainda conhecidos os alvos intracelulares regulados pela Ucn2.

Com o objetivo de compreender os mecanismos moleculares envolvidos nas ações da Ucn2 nas alterações da massa muscular, o **principal interesse deste trabalho** foi investigar se a Ucn2 além do seu papel estimulador da formação do AMPc, era também capaz de alterar a atividade de vias de sinalização clássicas como Akt/Foxo e MEK/ERK1/2, sabidamente envolvidas no controle dos processos metabólicos de síntese e degradação de proteínas na musculatura esquelética e, um possível *cross-talking* entre estas e a via urocortinérgica canônica.

1.3. Principais vias de sinalização envolvidas no controle do metabolismo de proteínas na musculatura esquelética

1.3.1. Via de sinalização clássica Akt/Foxo

A via de sinalização clássica da insulina/IGF-1 se inicia pela ligação do hormônio ao seu receptor específico de membrana, o IR (receptor de insulina), uma proteína com atividade tirosina quinase intrínseca. Essa ligação leva a autofosforilação do IR em resíduos de tirosina, ativando-o, promovendo assim a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS's) e a interação destes com várias proteínas que contém o domínio SH₂, entre elas a subunidade p85 da proteína PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase). Em seguida, a PI3K promove a fosforilação do fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, convertendo-o em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Este, por sua vez, ancora as proteínas PDK (proteína quinase dependente de fosfatidilinositol) e Akt, também conhecida como PKB (proteína quinase B). Após ancoramento na membrana, a PDK1 promove a fosforilação da Akt em resíduos de treonina (Thr³⁰⁸), essencial para sua atividade catalítica (ALESSI *et al.*, 1997). No entanto, para sua estabilização e atividade máxima é essencial uma segunda fosforilação de Akt, em

resíduos de Ser⁴⁷³, realizada pelo complexo 2 da *mammalian target of rapamycin* (mTORC2) (SARBASSOV *et al.*, 2005). Uma vez ativa, Akt se desliga da membrana e se transloca para o citoplasma ou núcleo, podendo então modificar a atividade de várias proteínas através da sua atividade serina/treonina quinase. Dentre seus alvos *downstream* destaca-se o *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), um inibidor da proteína mTOR (INOKI *et al.*, 2002), sabidamente um alvo clássico envolvido na estimulação dos processos de síntese proteica. Ao ser fosforilado pela Akt, TSC2 se torna inativo, resultando na consequente ativação de mTOR, que por sua vez, é capaz de fosforilar e ativar, dentre outras proteínas-alvo, a p70S6 kinase (p70S6K) com consequente ativação da proteína ribossomal S6 (S6), estimulando assim a síntese proteica. Além disso, mTOR também pode fosforilar o complexo PHAS-1/4E-BP1 (*phosphorylated heat and acid stable protein regulated by insulin-1/eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein-1*) liberando, dessa forma, o fator de iniciação eIF4E (*eucaryotic translation initiation factor 4E*), que agora ativo pode então se ligar ao eIF4G (*eucaryotic translation initiation factor 4G*) formando o complexo de iniciação eIF4F, iniciando o processo de tradução do RNAm (HARA *et al.*, 1997; ZONCU *et al.*, 2011). Bodine *et al.*, 2001 demonstraram que a superexpressão por 7 dias de um plasmídeo contendo a forma constitutivamente ativa de Akt (c.a. Akt) promoveu hipertrofia dos músculos *tibialis anterior* de camundongos normais e submetidos ao modelo de desnervação motora isquiática (7 dias) e, que este efeito foi abolido após a administração de rapamicina, um inibidor de mTOR, mostrando o papel da cascata de sinalização ativada pela Akt na promoção do crescimento muscular *in vivo*. Corroborando estes achados, a rapamicina foi capaz de bloquear a ativação de p70S6K e este efeito foi associado à redução do crescimento muscular *in vitro* (ROMMEL *et al.*, 2001) e *in vivo* (PALLAFACCHINA *et al.*, 2002).

Além da ação biológica, bem caracterizada, da Akt na indução da hipertrofia, é bem descrito a atuação dessa quinase na prevenção da atrofia muscular através da inibição dos

fatores de transcrição Foxo (*forkhead box*) (OUDIT *et al.*, 2004; NADER, 2005). Estes, por sua vez, estão predominantemente localizados no núcleo, sob a forma ativa e, portanto, são capazes de induzir a transcrição dos atrogenes (ZHAO *et al.*, 2007). A fosforilação de Foxo pela Akt em resíduos de serina ou treonina o libera de sua ligação ao DNA, permitindo assim, que Foxo seja sequestrado pela proteína 14-3-3, translocando-o do núcleo para o citosol, promovendo sua inativação. Inversamente, quando Akt está inativa, Foxo é defosforilado e, assim, importado para o núcleo, onde poderá exercer a sua atividade transcricional e, consequentemente, induzir a transcrição de atrogenes e consequente degradação de proteínas (BIRKENKAMP e COFFER, 2003). Stitt *et al.* (2004) demonstraram *in vivo* que o tratamento intramuscular local com IGF-1 promoveu redução da expressão do RNAm das E3 ligases atrogin-1 e MURF-1, revertendo parcialmente a perda de massa induzida pela desnervação motora isquiática em músculos gastrocnêmio medial, o que pode ser explicado pela ativação de Akt, a qual promove inibição de Foxo, redução da transcrição dos atrogenes com consequente inibição da degradação de proteínas neste modelo. Corroborando estes achados, Sandri *et al.* (2004) demonstraram que miotubos C2C12 submetidos aos modelos de atrofia induzidos pela incubação em meio com ausência de nutrientes ou pelo tratamento com dexametasona apresentaram aumento da expressão de atrogin-1, associado à redução da fosforilação de Akt e Foxo e ao aumento do conteúdo proteico nuclear de Foxo 1 e 3.

Interessante que, apesar da aparente ação modulatória positiva na massa muscular, a Ucn2 parece exercer um efeito contrário no metabolismo de carboidratos. Camundongos *knockout* para Ucn2 apresentaram aumento da sensibilidade à insulina e não desenvolveram resistência a este hormônio quando submetidos à dieta hiperlipídica. Além disso, miotubos C2C12 incubados com Ucn2 apresentaram redução da fosforilação de Akt e ERK1/2 induzida pelo hormônio insulina (CHEN *et al.*, 2006), sugerindo um possível *cross-talk* entre a via de sinalização da insulina e da Ucn2. Dessa forma, considerando que a Ucn2 é capaz de regular a

massa muscular, a **primeira hipótese** a ser investigada neste trabalho é a de que os efeitos hipertróficos e antiatróficos da Ucn2 envolvem a participação das vias de sinalização Akt/mTOR e Akt/Foxo, respectivamente.

1.3.2. Via de sinalização MEK/ERK1/2

As MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) constituem uma família de serina/treonina quinases, ativadas por estímulos extracelulares, tais como citocinas, mitógenos, hormônios e fatores de crescimento, como IGF-1. A ativação do receptor do tipo tirosina quinase pelo IGF-1 promove a sua autofosforilação com consequente ligação da proteína SH₂ adaptadora Grb2 (*growth-factor-receptor-bound-2*), que por sua vez, recruta a proteína SOS (*son of sevenless*), uma proteína trocadora de GDP por GTP, estimulando Ras. Uma vez ativa, Ras pode interagir e ativar Raf, também conhecida como MAPKKK (MAPK *kinase kinase*) (GEYER e WITTINGHOFER, 1997), que promove a fosforilação e ativação de MEK1/2 (MAPKK), que por sua vez, é responsável pela fosforilação de MAPK (WHITMARSH e DAVIS, 1998; SCHAEFFER *et al.*, 1999). Agora ativas, as MAPKs podem fosforilar inúmeros substratos nucleares e citosólicos e, assim, regular processos celulares vitais como crescimento, embriogênese, diferenciação celular e apoptose. Até o presente momento foram descritas, pelo menos, quatro componentes da família das MAPKs: ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*), JNK (*c-Jun-amino-terminal kinase*), p38 MAPK e ERK5 (NISHIDA e GOTOH, 1993; ROBINSON e COBB, 1997; DAVIS, 2000). Dentre estas, as ERKs têm sido apresentadas como proteínas emergentes para a regulação e manutenção da massa muscular esquelética.

A redução da atividade da cascata de sinalização Ras/ERK1/2 está associada com perda de massa e força do músculo bíceps braquial em ratos senescentes (RAHNERT *et al.*,

2010), bem como com a distrofia muscular presente na doença Emery-Dreifuss (MUCHIR *et al.*, 2013). Além disso, ERK1/2 parecem ser essenciais para a manutenção da morfologia das fibras musculares e para garantir a integridade das junções neuromusculares em *tibialis anterior* em camundongos normais (SEABERG *et al.*, 2015). Entretanto, muito pouco se conhece sobre os efeitos moleculares das ERKs na regulação do metabolismo de proteínas na musculatura esquelética. Sabe-se que ERK1/2 podem fosforilar Foxo em resíduos de Ser^{294;344;425} *in vitro*, o que permite maior interação de Foxo com a Ub-ligase MDM2 (*mouse double minute 2*), com consequente, aumento da degradação de Foxo pelo proteassoma (YANG *et al.*, 2008). Dessa forma, pode-se inferir uma reduzida atividade transcricional de Foxo induzida por ERK1/2, resultando em redução da expressão dos atrogenes e da degradação proteica (YANG *et al.*, 2008). Além desse aparente efeito anti-atrófico, as ERKs também parecem estar envolvidas com o crescimento muscular, o que sugere um possível *cross-talk* entre a cascata das MAPKKK e de Akt/Foxo, principal responsável pelo controle do metabolismo de proteínas no músculo esquelético. Haddad e Adams (2004) demonstraram que a co-infusão local (14 dias) de IGF-1 e de PD-098059, um inibidor de MEK/ERK, aboliu o efeito hipertrófico induzido pelo IGF-1 em músculo *plantaris* de ratos normais. De fato, dados da literatura demonstraram a participação de ERK1/2 na ativação de mTOR *in vivo*, independente da via clássica PI3K/Akt, com consequente indução de hipertrofia no modelo de sobrecarga em músculos *plantaris* de camundongos normais (HADDAD e ADAMS, 2004). Esses achados *in vivo* corroboram os resultados obtidos por Shi *et al.* (2009), que demonstraram que a ausência da atividade de ERK1/2, em miotubos C2C12, foi associada à redução da fosforilação de Akt e ao aumento da expressão do RNAm de atrogin-1 e MuRF-1, com consequente indução da atrofia muscular *in vitro*.

Assim, a **segunda hipótese** investigada no presente trabalho é a de que os efeitos antiproteolítico e hipertrófico da Ucn2 são dependentes da via de sinalização MEK/ERK1/2.

1.3.3. Via de sinalização AMPc/PKA

Os receptores acoplados à proteína G associados à isoforma $G_{\alpha s}$, como o CRF2R, quando ativos, promovem a ativação da subunidade $G_{\alpha s}$ (troca de GDP por GTP) e a dissociação de α de $\beta\gamma$, liberando assim o heterodímero formado pelas subunidades $G_{\beta\gamma}$. Agora ativa, $G_{\alpha s}$ é capaz de estimular a enzima adenilil ciclase (AC) que, por sua vez, catalisa a formação do AMPc a partir do ATP intracelular (IYENGAR E HILDEBRANDT, 2002). É bem estabelecido que o AMPc tem como seu efetor clássico a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), 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 (*cAMP response element binding protein*). O aumento farmacológico do AMPc intracelular em músculos EDL isolados de ratos normais promoveu redução da expressão de atrogin-1 e da degradação de proteínas induzida pelos sistemas proteolíticos UbP e lisossomal (LIRA *et al.*, 2011). Além disso, estudos de nosso laboratório demonstraram que os efeitos anti-atróficos *in vitro* promovidos por inibidores das PDEs são dependentes da atividade da PKA na musculatura esquelética (BAVIERA *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2011) e, que a redução na degradação total de proteínas promovida pela PKA, ocorre de uma forma independente de Akt (Baviera *et al.* 2010). Interessante que Lee *et al.* (2011) observaram em células endoteliais vasculares, que a PKA pode fosforilar diretamente Foxo nos mesmos resíduos de aminoácidos fosforilados pela Akt, inibindo-o. Dessa forma, é possível especular que a Ucn2 estimule a PKA e, esta por sua vez, exerça uma regulação inibitória pós-traducional em Foxo, reduzindo a sua atividade transcricional.

Embora sejam escassas as informações sobre os eventuais alvos moleculares da PKA responsáveis pelos seus efeitos anti-atróficos na musculatura esquelética, postula-se também a

participação de CREB, um alvo clássico *downstream* desta quinase. CREB parece modular indiretamente a atividade das enzimas calpaínas, já que é capaz de promover a transcrição do inibidor endógeno calpastatina (CONG, GOLL E ANTIN, 1998; ZHANG *et al.*, 2005; SENSKY *et al.*, 2006) e, assim é possível que este fator de transcrição esteja envolvido no controle do sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} . Esta hipótese é reforçada por Navegantes *et al.* (2000) que demonstraram que a incubação de músculos isolados de ratos normais com isobutil-metilxantina (IBMX), um inibidor inespecífico das fosfodiesterases do AMPc, reduziu a atividade das vias proteolíticas dependente de cálcio e UbP.

Ademais, não podemos descartar a possível participação de cascatas de sinalização independentes de PKA nos efeitos promovidos pela Ucn2. De Rooij *et al.* (1988) identificaram a proteína Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*), comprovadamente um alvo *downstream* do AMPc, capaz de ativar Rap1 (pequena GTPase monomérica da superfamília da Ras). Nosso laboratório já demonstrou que assim como a epinefrina e o dibutilil-AMPc, um análogo não-hidrolisável do AMPc, músculos EDL de ratos normais incubados com 8CPT-2Me-cAMP, um agonista seletivo de Epac, apresentaram redução na taxa de degradação de proteínas e aumento na fosforilação de Akt em Ser⁴⁷³ e Thr³⁰⁸ e Foxo3 em Thr³², sugerindo que a ativação de Akt, via Rap1, com consequente inibição de Foxo e da expressão dos atrogenes, são eventos sinalizadores que podem mediar a ação anti-proteolítica de Epac (BAVIERA *et al.*, 2010). Corroborando estes achados *in vitro*, foi demonstrada a participação da via Epac/PI3K na ativação de Akt induzida pelo aumento farmacológico das concentrações intracelulares de AMPc em células HEK293 (MEI *et al.*, 2002).

Dessa forma, a **terceira hipótese** a ser investigada neste trabalho é a de que as vias de sinalização AMPc/PKA e AMPc/Epac/Akt podem mediar os efeitos induzidos pela Ucn2 na modulação da massa muscular esquelética.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho apresenta como principal objetivo a investigação dos possíveis mecanismos de ação da Ucn2 responsáveis por suas ações hipertrófica e anti-atrófica em músculos esqueléticos de roedores. Para isto será investigada a participação das vias de sinalização Akt/mTOR, Akt/Foxo, MEK/ERK1/2, AMPc/PKA/CREB e AMPc/Epac nestas respostas.

2.2. Objetivos Específicos

Investigar em músculos *tibialis anterior* transfectados *in vivo* com Ucn2, comparando-os com os músculos contralaterais transfectados com o vetor vazio, de camundongos normais:

2.2.1. A alteração da massa muscular;

2.2.2. A alteração da massa muscular em modelos atroficos de desnervação motora isquiática e jejum;

2.2.3. O conteúdo de AMPc intracelular, a atividade da PKA e de CREB, bem como o conteúdo proteico de Epac;

2.2.4. A correlação entre a via de sinalização canônica da Ucn2, AMPc/PKA/CREB, com o estado de fosforilação de componentes das vias Akt/Foxo, Akt/mTOR e ERK1/2;

2.2.5. A correlação entre a expressão dos atrogenes (componentes dos sistemas proteolíticos ubiquitina-proteassoma e lisossomal/autofágico) com a atividade transcricional de Foxo e os níveis de fosforilação de constituintes das vias de sinalização AMPc/PKA/CREB, Akt/Foxo e ERK1/2;

2.2.6. A correlação entre a possível modulação do fluxo autofágico e o conteúdo proteico de marcadores da via autofágica-lisossomal (LC3-II e p62);

2.2.7. A alteração na taxa de síntese proteica *in vivo*;

2.2.8. A correlação entre a modulação da massa muscular induzida pela Ucn2 e as alterações na função muscular;

2.2.9. O efeito da inibição *in vivo* das quinases Akt e ERK1/2 na possível supressão das modificações fenotípicas na massa e na função musculares induzidas pela Ucn2;

2.2.10. A correlação entre as modificações na função muscular com a plasticidade do tipo de fibras musculares;

Investigar em músculos *soleus* e EDL (ratos e camundongos) incubados *in vitro* com Ucn2 e comparados com músculos contralaterais incubados na ausência deste peptídeo:

2.2.11. A taxa de degradação total de proteínas e a atividade dos sistemas proteolíticos ubiquitina-proteassoma, lisossomal/autofágico e dependente de Ca^{+2} .

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* (n=7/experimento), entre 3 a 4 semanas de idade, pesando ~ 70-80g e camundongos machos da linhagem C57Bl6/J, entre 2 a 3 meses de idade, pesando ~30g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Bioquímica/Imunologia da FMRP/USP, em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 6h e apagadas às 18h), temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e acesso à ração comercial balanceada própria para roedores (NUVLAB CR1 – NUVITAL[®]) e água *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos sob essas condições no mínimo 2 dias antes de qualquer procedimento experimental. Os experimentos foram realizados no período da manhã, entre 8h e 9h e o sacrifício dos animais foi realizado por deslocamento cervical. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CETEA; Protocolo nº 063/2014).

3.2. Modelos atroficos

3.2.1 Desnervação motora isquiática (DEN)

A DEN é um modelo de indução de atrofia muscular bem estabelecido na literatura caracterizado pela perda de proteínas contráteis principalmente devido ao aumento da degradação, sendo observadas no período de 3 dias de DEN as maiores taxas de proteólise

muscular e expressão da Ub-ligase atrogin-1 (FURUNO, GOODMAN e GOLDBERG, 1990; SACHECK *et al.*, 2006). No presente trabalho, os animais foram anestesiados com a mistura de cloridrato de ketamina (Agener[®]) e xilazina (Dopaser[®]) (85 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente; intraperitoneal: *i.p.*). Em seguida, foram dispostos em decúbito ventral, procedendo-se um pequeno corte na pele a uma distância de 1 cm da fossa poplítea. Uma vez visualizado o nervo isquiático, o mesmo foi isolado, removendo-se 1-2 mm de segmento do nervo apenas em uma das patas.

3.2.2. Jejum

O jejum, é um modelo catabólico sistêmico que consiste na privação alimentar, sendo mantida água *ad libitum*. A remoção do alimento ocorreu sempre às 7h da manhã e os experimentos foram realizados após 48h, já que é este o período de aumento da proteólise muscular com o estabelecimento do quadro atrófico e a obtenção da expressão máxima de atrogin-1 (WING *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2001). Além disso, a atrofia induzida pelo jejum é mais pronunciada em músculos glicolíticos do que em músculos oxidativos (OGATA *et al.*, 2010), contrastando com o modelo de atrofia local da DEN.

3.3. Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados no presente trabalho foram gentilmente enviados por diversos pesquisadores internacionais: pcDNA3.1+ (Prof. Dr. Rudiger Rudolf, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Alemanha), mUcn2-pcDNA3.1+ e hUcn2-pcDNA3.1+ (Prof. Dr. Paul Sawchenko, Laboratório de Estrutura e Função Neuronal, Instituto Salk, San Diego, CA), pway21-GFP e pway21-mkp-1 (Prof. Dr. Anton Bennett, Departamento de Farmacologia,

Escola de Medicina da Universidade de Yale, New Haven, USA), dn Akt mutant T³⁰⁸/S⁴⁷³ pcDNA3.1+ (Prof. Dr. S. Dimmeler, Instituto de Regeneração Cardiovascular, Universidade de Frankfurt, Alemanha). Os plasmídeos foram purificados utilizando o PureLink[®] HiPure Plasmid Maxiprep Kit (ThermoFisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a formação do peptídeo maduro da Ucn2 são necessárias clivagens em ambas as extremidades carboxi e aminoterminais, o que inviabiliza a fusão de um marcador (*tag*) ao gene da Ucn2 no vetor plasmidial. Assim, os plasmídeos expressando o gene do GFP (*green fluorescent protein*) ou RFP (*red fluorescent protein*) foram co-transfectados *in vivo* com o plasmídeo mUcn2 a fim de identificar por fluorescência as fibras com maior eficiência de transfecção e também desconsiderar as porções distais próximas aos tendões, as quais apresentam, geralmente, baixa eficiência de transfecção. Todos os músculos *tibialis anterior* dos grupos controles foram transfectados com o vetor plasmidial vazio pcDNA3.1+.

3.4. Cultura de linhagem de células musculares

Os estoques da linhagem C2C12 (células musculares de camundongo) utilizados neste trabalho permaneceram congelados em nitrogênio líquido. Mioblastos (células não diferenciadas) foram plaqueados na concentração de 200.000 células/poço em placa de 6 poços e incubados em meio DMEM enriquecido com 25 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), sendo então mantidos em incubadoras a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Quando as células atingiram 90-100% de confluência, visualizada através de microscopia, foram realizados os experimentos.

3.4.1. Transfecção *in vitro* em cultura de células C2C12

Previamente aos ensaios de transfecção de músculos esqueléticos *in vivo*, mioblastos (células não-diferenciadas) da linhagem C2C12 foram transfectadas para a validação dos plasmídeos. Assim, após atingirem a confluência de 90-100%, as células foram transfectadas com diferentes plasmídeos utilizando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Foram transfectados 4µg de DNA plasmidial/poço (pcDNA3.1+, mUcn2, hUcn2) e, após o período de transfecção (5h), as células foram homogeneizadas em tampão de lise celular e submetidas à análise de diversas proteínas pela técnica de western blot.

3.4.2. Transfecção *in vivo* por eletroporação

Camundongos C57Bl6/J foram anestesiados por via intraperitoneal (*i.p.*) com a mistura de cloridrato de cetamina (Agener[®]) e xilazina (Dopaser[®]) (85 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). Após anestesia o músculo *tibialis anterior* foi exposto e cuidadosamente isolado através de uma pequena incisão na pele e, um eletrodo (aço inoxidável) modelo pinça foi inserido sob a região do ventre do músculo isolado (acima da tibia) (Figura 3). Em seguida, foi injetado ao longo do comprimento do músculo o volume total de 30 µl (dividido em duas injeções consecutivas) contendo o DNA plasmidial purificado diluído em 0,9% NaCl estéril. O segundo eletrodo foi então posicionado em cima do músculo *tibialis anterior* e foram aplicados os seguintes parâmetros de pulsos elétricos, previamente programados: 21V/cm, 8 pulsos (4+/4-), 20ms de duração, 200ms de intervalo. Os eletrodos foram conectados a um eletroporador (Super Electroporator NEPA21 TypeII; NEPA GENE).

Figura 3. Camundongo anestesiado em decúbito dorsal sobre cama térmica (37°C) para exposição e isolamento do músculo *tibialis anterior* durante a eletroporação. A figura mostra também a inserção de um dos eletrodos sob o referido músculo, acima da tíbia.

Decorridos 7 ou 14 dias de transfecção os animais foram sacrificados e os músculos *tibialis anterior* foram excisados e devidamente congelados a -80°C para análises da expressão gênica ou proteica por meio de PCR em tempo real ou western blot, respectivamente, bem como análises histológicas (Figura 4A). Para indução da atrofia pelo modelo de jejum (48h), a comida foi removida no quinto dia após a eletroporação e o sacrifício dos animais ocorreu após 7 dias da superexpressão do plasmídeo de interesse (Figura 4B). Os animais submetidos à DEN foram sacrificados 14 dias após a eletroporação, conforme esquema representado na figura 4C.

Estudos demonstram que a injeção intramuscular da enzima hialuronidase bovina responsável por digerir componentes da matriz extracelular, facilita o acesso do DNA plasmidial às células musculares aumentando, dessa forma, a eficiência de transfecção sem elevar o dano muscular associado ao processo de eletroporação (MCMAHON *et al.*, 2001; AKERSTROM *et al.*, 2015). Dessa forma, os músculos *tibialis anterior* foram pré-tratados com hialuronidase (0,4U/ μ l), da seguinte forma: os animais foram anestesiados com

isoflurano e procedeu-se a injeção intramuscular da enzima, sem qualquer incisão na pele, cerca de 45 min antes da realização da cirurgia para transfecção *in vivo* dos plasmídeos.

Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental realizado para o estudo do efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 no metabolismo de proteínas em músculo *tibialis anterior* de camundongos normais por 7 ou 14 dias (A) ou submetidos ao jejum por 48h (B) ou à DEN por 14 dias (C) (m=mouse; Ucn2 = urocortina 2; DEN = desnervação motora isquiática).

A superexpressão do plasmídeo mUcn2 (30 µg) sempre foi realizada no músculo *tibialis anterior* da pata esquerda do animal, ao passo que o músculo da pata contralateral direita sempre recebeu os plasmídeos considerados como controle (pcDNA3.1+; 10µg) (Figura 5A). Para a supressão endógena de Akt e ERK1/2 foram introduzidos através da eletroporação plasmídeos expressando o gene de uma forma dominante negativa de Akt (dnAkt; 10 µg) (Figura 5B) e outro expressando o gene *mitogen-activated protein kinase phosphatase 1* (mkp1; 10µg), uma fosfatase das MAPKs (Figura 5C). Os músculos *tibialis anterior* de todos os grupos (experimentais e controles) receberam o plasmídeo expressando o gene do pway21-GFP ou somente GFP (10 µg) (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática de cada DNA plasmidial injetado *in vivo* pela técnica de eletroporação em músculo *tibialis anterior* de camundongos normais por 7 ou 14 dias. Os músculos *tibialis anterior* de camundongos submetidos aos modelos de atrofia (jejum ou DEN) receberam apenas os plasmídeos representados em A. (m = mouse; Ucn2 = urocortina 2; dnAkt = dominante negativo de Akt; mkp1 = *mitogen-activated protein kinase phosphatase 1*; GFP = *green fluorescent protein*).

3.5. Determinação das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc)

Após a superexpressão por 14 dias do plasmídeo contendo o gene mUcn2, os músculos *tibialis anterior* de camundongos foram removidos, embalados em papel alumínio e congelados a -80°C. Posteriormente, os músculos foram homogeneizados em TCA 6%, na proporção 5% massa/volume. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, lavado 3 vezes com 4mL de éter dietílico gelado para remoção de resíduos lipídicos. Após liofilização da fração aquosa (que contém o AMPc), o extrato seco foi ressuscitado em 1mL do tampão de ensaio do teste. Para a determinação do conteúdo de AMPc nas amostras foi utilizado um método imunoenzimático comercial da Amersham Biosciences (*cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay EIA system* – RPN225). Este método baseia-se em um princípio imunoenzimático competitivo, onde os poços da placa para o teste são tratados com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho; este anticorpo IgG de coelho reconhece especificamente o AMPc. O ensaio é baseado na competição entre o AMPc da amostra tecidual e uma quantidade fixa de AMPc marcado com peroxidase (oferecido pelo próprio kit). Dessa maneira, a quantidade de AMPc marcada e ligada ao anticorpo anti-AMPc foi oposta à concentração de AMPc da amostra desconhecida. O complexo anti-IgG/anti-AMPc/AMPc-peroxidase pode ser quantificado após a adição do substrato para a peroxidase [3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio], ocorrendo a formação de produto colorido que pode ser quantificado em comprimento de onda de 450nm (após a adição de ácido sulfúrico 1M, obtendo coloração amarela), em espectrofotômetro para microplaca (leitor de ELISA). A sensibilidade do método é na faixa de detecção de 12,5 a 3.200 fmol de AMPc por poço. Os resultados foram expressos em fmol de AMPc/mg de músculo.

3.6. Quantificação da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real

O RNA das amostras (músculos *tibialis anterior*) foi extraído pelo método do TrizolTM (Invitrogen®, EUA) e quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (260nm). Após tratamento de 1µg de RNA total com DNase, foi adicionado o *primer* de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (20 pmoles; Invitrogen, EUA) em volume total de 11µL, sendo as misturas preparadas em água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01% e, posteriormente, autoclavada). Tão logo ao aquecimento a 70°C por 5 minutos e posterior resfriamento a 4°C, foram adicionadas a transcriptase reversa e demais reagentes (tampão de reação, dNTP, água, MgCl₂ e ImProm-IITM Reverse T recombinante) e, assim, submetidas ao ciclo 25°C - 42°C, o qual foi interrompido por aquecimento a 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram posteriormente submetidos ao PCR em tempo real utilizando-se PowerUpTM SYBR® Green Master Mix (Life Technologies®) com seqüências de *primers* específicos (Tabela 1). Os resultados foram adquiridos em sistema de detecção Perkin-Elmer ABI Prism 7500 com os seguintes parâmetros: 50°C (2 minutos), 95°C (2 minutos), 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 57°C (30 segundos), 60°C (30 segundos), seguido pelo ciclo de dissociação para verificação de um produto através de análise pela curva *melting*. Os valores obtidos foram analisados e normalizados através do método do ciclo *threshold* (Ct), utilizando-se os valores de Ct obtidos após a amplificação do gene de referência (controle endógeno ou *housekeeper gene*), no caso RPL39, e a eficiência deste e do *primer* do gene investigado, sendo que o resultado representa a expressão relativa de RNAm expressa em unidades arbitrárias.

Tabela 1 - Sequências dos *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real.

<i>Gene</i>	<i>Sequência dos Primers</i>
Ucn2	Forward: CAGCTTCCTGGAGCAACTCT Reverse: GATTCCTGGCAGCCTTGTA
CRF2R	Forward: ATCAACTACCTGGGCCACTG Reverse: AGGTGGTGATGAGGTTCCAG
Atrogin-1	Forward: CAGGTCGGTGATCGTGAG Reverse: GCAGAGAGTCGGCAAGTC
MuRF-1	Forward: TGTGCAAGGAACACGAAG Reverse: TGAGAGATGATCGTCTGC
MUSA	Forward: TCGTGGAATGGTAATCTTGC Reverse: CCTCCCGTTTCTCTATCACG
SMART	Forward: TCAATAACCTCAAGGCGTTC Reverse: GTTTTGCACACAAGCTCC
LC3b	Forward: CGTCCTGGACAAGACCAAGT Reverse: ATTGCTGTCCCGAATGTCTC
Gabarapl1	Forward: CATCGTGGAGAAGGCTCCTA Reverse: ATACAGCTGGCCCATGGTAG
Catepsina L	Forward: TGGACTGTTCTCACGCTCAAG Reverse: TCCGTCCTTCGCTTCATAGG
p62	Forward: AGAATGTGGGGGAGAGCGTGGC Reverse: GGGTGTGAGGCGGCTTCTCTT

<i>Gene</i>	<i>Sequência dos Primers</i>
FOXO1	Forward: CCTGGAAGAATCCTGTCACTTC Reverse: ACTGTCTGTACTTAGGCGCACA
FOXO3	Forward: CGCTGTGTGCCCTACTTCA Reverse: CCCGTGCCTTCATTCTGA
PGC-1α	Forward: AATCCAGCGGTCTTAGCACT Reverse: TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA
NR4a1	Forward: GGCTTGGATACAGGGCATC Reverse: CCACTGCCTCCTTCAACC
SIK1	Forward: TCCACCACCAAATCTCACCG Reverse: GTTTCGGCGCTGCCTCTTC
MYH I (Myh7)	Forward: AGCAGGAGCTGATTGAGACC Reverse: TGTGATAGCCTTCTTGGCCT
MYH IIa (Myh2)	Forward: TTGGTGGATAAACTCCAGGC Reverse: CAGCTTGTTGACCTGGGACT
MYH IIb (Myh4)	Forward: ACAGACTAAAGTGAAAGCCTACAA Reverse: CACATTTTGTGATTTCTCCTGTCAC
MYH IIx (Myh1)	Forward: ACCTTGTGGACAAACTGCAA Reverse: AGCTTGTTGACCTGGGACTC
RPL39	Forward: CAAAATCGCCCTATTCCTCA Reverse: AGACCCAGCTTCGTTCTCCT

3.7. Western blot

Os músculos *tibialis anterior* de camundongos e *extensor digitorum longus* (EDL) de ratos dos diferentes grupos experimentais foram homogeneizados no aparelho TissueLyzerII, (30Hz por 3 minutos, e em seguida, mais 30Hz por 3 minutos) em 6 volumes de tampão Tris-HCl (50 mM; pH 7,4; 4°C) contendo 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (1 mM PMSF, 5 µg/ml de aprotinina e 1 µg/ml de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10 mM ortovanadato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 100 mM fluoreto de sódio). O homogenado foi centrifugado a 14000 rpm, 4°C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry *et al.* (1951) e posteriormente para determinação do conteúdo proteico por western blot. 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 de 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 o padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained 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 preparado para a transferência (BioRad® Trans-Blot 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 de transferência, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para a membrana 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 *immunoblot*, sendo incubada por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente em solução de leite desnatado em pó 10%, diluído em solução 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 seguintes proteínas analisadas: Akt, PGC-1 α , Foxo1, Foxo1-p Ser²⁵⁶, Foxo3-p Thr³²/Foxo1-p Thr²⁴, CREB-P Ser¹³³, CREB, EPAC, mTOR-p Ser²⁴⁴⁸, mTOR, IGF-I R β -p Tyr^{1135/1136}/IR β -p Tyr^{1150/1151} (1:500, Cell Signaling[®], EUA); GSK3- β (1:750, Cell Signaling[®], EUA); Akt-p Ser⁴⁷³, LC3, ERK1-p Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, ERK2-p Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷, ERK1/2, p38MAPK-p Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸², p38MAPK, substratos-p pela PKA, 4E-BP1 p^{Thr70}, 4E-BP1, eIF4E, eIF4E-p 1500Ser²⁰⁹, S6-p Ser^{235/236}, S6, GSK3 α -pSer²¹/GSK3- β Ser⁹ (1:1000, Cell Signaling[®], EUA); IR β -p Tyr^{1162/1163}, IR β (1:500, Santa Cruz Biotechnology[®], EUA); GFP/RFP (1:1000, Santa Cruz Biotechnology[®], EUA); MyHC slow (1:1000) e MyHC fast (1:2000; Sigma[®]); Puromicina (1:500, Kerafast[®]) e β -actina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology[®], EUA). 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, com o anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase: anti-IgG de coelho (Cell Signaling[®]) (diluição de 1:1000 – 1:8000 em TBS-T), anti-IgG de camundongo (KPL[®]) (diluição de 1:5000 em TBS-T) ou anti-IgG de cabra (Sigma[®]) (diluição de 1:1000 em leite 5% 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 (Bio-

Rad Laboratories Inc., EUA), variando entre 2 a 10 minutos após a adição do reagente de quimioluminescência, composto por Tris/HCl (1M, pH 8,5), luminol (250mM), ácido cumárico (90mM) 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%).

3.8. Avaliação da síntese proteica *in vivo* pelo método SUnSET (*surface sensing of translation*) em músculos *tibialis anterior*

O método SUnSET foi originalmente desenvolvido para avaliar a taxa de síntese proteica *in vitro*, em lisados de células, especificamente através da utilização de um anticorpo contra a puromicina para a imuno-deteção de peptídeos ligados à esta molécula, sendo considerada uma alternativa à utilização de radioisótipos para mensurar alterações na taxa de síntese proteica (SCHIMIDT *et al.*, 2009; GOODMAN, PIERRE e HORNBERGER, 2012). Nakano e Hara (1979) foram os pioneiros a demonstrar a utilização da puromicina como um método fidedigno e vantajoso para medir a síntese proteica *in vivo* na musculatura esquelética, todavia, somente 3 décadas após, Goodman e Hornberger em 2015 padronizaram o uso da puromicina, através do método SUnSET, para mensurar modificações na síntese de proteínas *in vivo* tanto em lisados totais de músculo esquelético, quanto em uma única fibra muscular.

A puromicina consiste em um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces alboniger*, sendo considerada um análogo estrutural do RNA transportador (RNAt) e, assim, pode ser incorporada nas cadeias peptídicas nascentes. Entretanto, ao contrário do RNAt, a

puromicina é incapaz de dar seguimento à formação de um novo peptídeo e, dessa forma, em altas concentrações este antibiótico promove inibição da síntese proteica (YARMOLINSKY e HABA, 1959), porém, em baixas concentrações a puromicina não inibe a síntese e, assim, a ligação de peptídeos a esta molécula reflete proporcionalmente a taxa de síntese proteica total (SCHIMIDT *et al.*, 2009), ou seja, quanto maior for a quantidade de puromicina incorporada nas cadeias polipeptídicas que estão sendo formadas maior é a taxa de síntese de proteínas. Dessa forma, utilizou-se neste trabalho o tratamento com puromicina, em baixas doses, para avaliar se a superexpressão *in vivo* da Ucn2 era capaz de modular a síntese proteica em músculos *tibialis anterior*. Para isso, camundongos normais, cujos músculos foram previamente transfectados com Ucn2, receberam uma única injeção de puromicina (Santa Cruz[®]) diluída em PBS1x (0,04 $\mu\text{mol/g}$ de massa corporal; *i.p.*) 30 minutos antes da eutanásia (NAKANO e HARA, 1979). Em seguida, os músculos foram rapidamente removidos, embalados em papel alumínio e congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, foram homogeneizados em tampão RIPA para extração de proteínas e, posteriormente, medida do conteúdo de proteínas ligadas à puromicina, usando para isto um anticorpo anti-puromicina (vide item 3.7 western blot). Os valores de densitometria obtidos para a detecção de puromicina foram corrigidos pelo Ponceau.

3.9. Avaliação *in vivo* da atividade transcricional de Foxo pelo ensaio do repórter duplo da luciferase

O termo do “repórter duplo” refere-se às medidas simultânea e sequencial da atividade de duas enzimas repórter individuais em um único sistema através da emissão de luminescência. A primeira consiste na medida de atividade do repórter “experimental” *firefly luciferase* (*Photinus pyralis*), no caso DBE-FoxO *firefly luciferase* repórter, o qual contém 6

regiões promotoras específicas para ligação de Foxo, e a segunda representa a medida de atividade de um repórter “controle”, a *Renilla luciferase* (*Renilla reniformis*), pRL-null-*Renilla*. Assim, a atividade fornecida pelo repórter investigado é corrigida pela resposta da atividade basal, fornecida pelo segundo repórter, minimizando variabilidades experimentais decorrentes da técnica de eletroporação, como por exemplo, a eficiência de transfecção do plasmídeo expressando a mUcn2 para cada músculo analisado. Músculos *tibialis anterior* de camundongos normais foram co-transfectados por 14 dias com os plasmídeos expressando o vetor vazio pcDNA3.1.+ ou mUcn2 e/ou DBE-Foxo *firefly luciferase* (10µg) + *Renilla luciferase* (10µg). Os músculos *tibialis anterior* foram homogeneizados em tampão de lise no aparelho TissueLyzerII e processados para quantificar a atividade repórter segundo instruções do *kit* (Promega # E1910). As amostras foram lidas em luminômetro (Glomax 20/20 Luminometer, Promega, Modelo: 2031-002).

3.10. Delineamento experimental para avaliação da atividade proteolítica *in vitro* em músculos esqueléticos isolados de ratos e camundongos

No dia do experimento, no período da manhã (8 horas), os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, os músculos *soleus* e EDL foram isolados e incubados com diferentes concentrações de Ucn2 de camundongo (Sigma-Aldrich, U9507, St Louis, MO) por 2h para a avaliação da degradação total de proteínas. A técnica de quantificação da atividade proteolítica requer a utilização de músculos esqueléticos íntegros de animais jovens, fixados por meio dos seus tendões a suportes de alumínio para o *soleus* e de acrílico para o EDL, mantendo-se assim os seus comprimentos de repouso (KETTELHUT, 1994). Dessa forma, é possível garantir *in vitro* as condições fisiológicas e morfológicas que asseguram a integridade e a homeostase da fibra muscular *in vivo*, tais como adequada difusão

de oxigênio e nutrientes, evitando-se a anóxia das fibras musculares centrais, bem como manutenção dos conteúdos de ATP, de fosfocreatina e glicogênio (KETTELHUT *et al.*, 1988; KETTELHUT, 1994).

3.10.1. Procedimentos para incubação

Os músculos *soleus* e EDL foram removidos de forma rápida e cautelosa para evitar lesões nas fibras musculares, pesados em balança eletrônica digital (Shimadzu AY 220) e seus tendões foram fixados em suportes apropriados. Em seguida, foram colocados em pequenos *erlenmeyers*, em tampão *Krebs-Ringer* Bicarbonato (0,120M de NaCl; 0,015M de CaCl_2 ; 0,025M de KCl ; 1,2 mM de MgSO_4 ; 1,212 mM de KH_2PO_4 ; 2,4 mM de CaCl_2 - pH 7,4), acrescido de glicose (5mM) e cicloheximida (0,5 nM), no volume de 3 ml. Os músculos foram aerados (95% O_2 e 5% CO_2) e, em seguida, pré-incubados sob agitação constante por 1 hora (37°C), para estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação de tirosina para o meio. Após esse período, os meios foram renovados e os músculos foram incubados (37°C) em banho-maria tipo *Dubnoff* por 2 horas com o novo meio de mesma composição, sendo que os meios dos músculos *soleus* e EDL da pata contralateral foram acrescidos com diferentes concentrações de Ucn2 (10^{-8}M , $7 \cdot 10^{-8}\text{M}$, 10^{-7}M , $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$, 10^{-6}M). No experimento em que se utilizou a 3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX) (10^{-4}M) (Sigma-Aldrich, I5879, St Louis, MO), um inibidor farmacológico das fosfodiesterases do AMPc, os músculos foram pré-incubados adicionalmente por mais 30 minutos para garantir a inibição enzimática antes do início da incubação com Ucn2.

3.10.2. Medida da velocidade de degradação proteica

A atividade proteolítica foi estimada pela taxa de liberação do aminoácido tirosina de proteínas que compõem os músculos esqueléticos incubados na presença de cicloheximida (0,5mM), a qual impede a reutilização dos aminoácidos para a síntese de proteínas e a reincorporação de tirosina nas cadeias peptídicas. A liberação de tirosina no meio reflete a velocidade de degradação de todas as classes de proteínas, uma vez que esse aminoácido está presente na constituição de todas as proteínas celulares (JEFFERSON *et al.*, 1977). A tirosina é um aminoácido ideal e fidedigno para avaliar a proteólise, já que não é degradado e nem sintetizado “*de novo*” pelas células musculares (FULKS *et al.*, 1975). Decorridas 2 horas de incubação, 1 ml do meio foi coletado e acrescido de 250 µl de ácido perclórico (1,5N). Em seguida, foram adicionados 1,5 ml de um reagente composto por nitroso naftol e ácido nítrico na proporção 1:1. Após, as amostras foram levadas rapidamente ao *vórtex* e incubadas em banho-maria tipo *Dubnoff* a 55°C por 30 minutos. Em seguida, 6 ml de clorofórmio foram acrescentados e as amostras foram vigorosamente agitadas e, após, centrifugadas (12 minutos; 3000 RPM; 24°C) e o sobrenadante, contendo a tirosina liberada, foi coletado para leitura no fluorímetro (modelo RF-540; marca *Shimadzu*) em comprimento de onda de excitação de 450nm e de emissão de 570nm. Este método fluorimétrico para dosagem da tirosina, previamente descrito na literatura, é de alta sensibilidade e reprodutibilidade (WAALKES e UDENFRIEND, 1957).

Para medida da degradação de proteínas, a liberação da tirosina do músculo da pata incubada na ausência de qualquer inibidor farmacológico corresponde à proteólise total, enquanto que a diferença entre a proteólise observada no músculo da pata sem inibidor e a pata com inibidor específico reflete a participação do sistema proteolítico que se deseja avaliar.

3.10.3. Delineamento experimental para avaliação da atividade da via proteolítica ubiquitina-proteassoma

Foram utilizados músculos EDL, com seus tendões fixos a suportes apropriados mantendo-se o comprimento de repouso, incubados em meio *Krebs Ringer* bicarbonato acrescido dos inibidores das vias proteolíticas lisossomal (metilamina e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA)) e dependente de Ca^{+2} (leupeptina e E64). No meio de incubação também foi acrescentado o inibidor da atividade proteolítica do proteassoma, o MG132 (N-carboxibenzoxi-Leu-Leu-Leucinal) (Tabela 2). O MG132 é um peptídeo aldeído que inibe a atividade proteolítica do proteassoma sem afetar as atividades ATPásicas ou isopeptidásicas deste complexo multicatalítico.

O músculo da pata direita fornece a taxa de proteólise não lisossomal e independente de Ca^{+2} . A quantificação da atividade da via proteolítica dependente de UbP é feita pela diferença entre as taxas de proteólise dos músculos da pata direita (sem inibidor MG132) e os músculos da pata esquerda (com inibidor MG132). Cabe salientar a existência do **sistema proteolítico residual**, sobre o qual muito pouco se conhece acerca de seu controle e as possíveis enzimas responsáveis, bem como ainda são desconhecidos quais os substratos que fazem parte desta via. A proteólise residual é aquela que permanece quando os três outros sistemas proteolíticos encontram-se bloqueados por seus inibidores específicos e são, portanto, os valores de liberação de tirosina obtidos no músculo da pata esquerda.

Músculos EDL retirados e fixos por seus tendões (retirados das 2 patas)

<i>Componentes do meio</i>	<i>Músculos EDL</i>	
	<i>Direito</i>	<i>Esquerdo</i>
Tampão Krebs Ringer bicarbonato (pH 7,4, - Ca^{+2})	+	+
Glicose (5 mM)	+	+
Cicloheximida (0,5 mM)	+	+
Metilamina (10 mM) e BCAA*	+	+
E64 (25 μM) e leupeptina (50 μM)	+	+
MG132 (20 μM)	-	+

* leucina: 0,5 mM; isoleucina: 0,85 mM; valina: 1,0 mM

Tabela 2. Protocolo utilizado para a quantificação da atividade proteolítica do sistema ubiquitina proteassoma em músculos EDL de ratos incubados com Ucn2.

3.10.4. Delineamento experimental para avaliação da atividade da via proteolítica lisossomal/autofágica

A quantificação da atividade proteolítica lisossomal foi realizada através da adição dos inibidores metilamina e aminoácidos de cadeia ramificada – BCAA (leucina, isoleucina e valina) ao meio *Krebs Ringer* bicarbonato. A metilamina é uma base fraca que se acumula nos lisossomos, aumentando o pH intralissossomal para valores próximos a neutralidade (pH 5,9-6,2), inibindo assim a atividade das catepsinas e hidrolases ácidas lisossomais (KETTELHUT

et al., 1988). O BCAA atua por meio de bloqueio da formação de vacúolos autofágicos e também pela diminuição da fragilidade lisossomal nos músculos esquelético e cardíaco. Portanto, esses agentes inibem a degradação proteica, sem alterar o conteúdo total de enzimas lisossomais (JEFFERSON et al., 1977; KETTELHUT et al., 1988). A tabela 3 ilustra as condições de incubação dos músculos EDL utilizados.

Músculos EDL retirados e fixos por seus tendões (retirados das 2 patas)

<i>Componentes do meio</i>	<i>Músculos EDL</i>	
	<i>Direito</i>	<i>Esquerdo</i>
Tampão Krebs Ringer bicarbonato (pH 7,4, - Ca^{+2})	+	+
Glicose (5 mM)	+	+
Cicloheximida (0,5 mM)	+	+
Metilamina (10 mM) e BCAA*	-	+

* leucina: 0,5 mM; isoleucina: 0,85 mM; valina: 1,0 mM

Tabela 3. Protocolo utilizado para a quantificação da atividade proteolítica do sistema lisossomal/autofágico em músculos EDL de ratos incubados com Ucn2.

3.10.5. Delineamento experimental para avaliação da atividade da via proteolítica dependente de Ca^{+2} modelo “free-stretch”

A mensuração da taxa de degradação de proteínas do sistema dependente de Ca^{+2} foi realizada através da adição dos inibidores da via lisossomal metilamina e aminoácidos de

cadeia ramificada – BCAA (leucina, isoleucina e valina) ao meio *Krebs Ringer* bicarbonato. O músculo da pata direita foi incubado sob a forma livre, resultando dessa forma na ativação das calpaínas, sabidamente proteases pertencentes ao sistema dependente de Ca^{+2} , ao passo que o músculo da pata esquerda foi incubado com seus tendões fixos aos suportes adequados, ocorrendo assim inibição da via proteolítica estudada. A contribuição deste sistema para a degradação proteolítica é calculada pela diferença entre a taxa de proteólise dos músculos da pata direita (“*free*”) e os músculos da pata esquerda (“*stretch*”) (Tabela 4).

Músculos EDL (retirados das 2 patas)

<i>Componentes do meio</i>	<i>Músculos EDL</i>	
	<i>Direito</i>	<i>Esquerdo</i>
Tampão Krebs Ringer bicarbonato (pH 7,4, - Ca^{+2})	+	+
Glicose (5 mM)	+	+
Cicloheximida (0,5 mM)	+	+
Metilamina (10 mM) e BCAA*	-	+
	<i>“free”</i>	<i>“stretch”</i>

* leucina: 0,5 mM; isoleucina: 0,85 mM; valina: 1,0 mM

Tabela 4. Protocolo utilizado para a quantificação da atividade proteolítica do sistema dependente de Ca^{+2} em músculos EDL de ratos incubados com Ucn2.

3.11. Avaliação da função muscular *in vivo* em músculos *tibialis anterior*

A avaliação da função muscular *in vivo* foi desenvolvida em colaboração com a Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara, do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

Camundongos, previamente eletroporados com os plasmídeos de interesse, foram anestesiados com tribromoetanol (20 mg.100g⁻¹ massa corporal, *i.p.*) e o nervo isquiático foi então exposto através de uma incisão feita 1 cm acima da fossa poplíteica e, uma vez isolado, foi conectado a um eletrodo. Os camundongos foram então acomodados em uma plataforma de acrílico com uma barra metálica sob o joelho para imobilização da pata. O tendão do músculo *tibialis anterior* foi conectado a um transdutor de força acoplado a um computador, o qual foi utilizado para coletar e analisar os dados relacionados à força gerada pela contração muscular. Os valores de força de contração e força tetânica obtidos foram gravados por um sistema específico de aquisição de dados (Biopac Systems, USA) e os dados analisados pelo programa AcqKnowledge, versão 3.9.1.6 (Biopac Systems, USA). Durante todo o procedimento os animais foram submetidos ao aquecimento em manta térmica (37°C) para manutenção da temperatura corporal. No início do experimento, os músculos foram ajustados para o seu comprimento ótimo (L_0), que por sua vez, é definido como o comprimento que resulta na força máxima de contração. No intervalo de cada estímulo foi dado um período de descanso de 2 minutos (RYALL *et al.*, 2004). Foram escolhidas a frequência estimulatória de 350Hz para mensurar a força tetânica máxima isométrica e a frequência de 200Hz para medir a fadiga muscular. Estes valores foram escolhidos pois representam a mínima frequência necessária para que se atinja o platô de força máxima (CHAN e HEAD, 2010). Baseado em Chan e Head, 2010, foi realizado o seguinte protocolo experimental: aplicaram-se pulsos de 0,2Hz durante 2 minutos, seguidos de uma contração tetânica máxima pré-fadiga, induzida

por um pulso de 350Hz por 2 segundos em cada músculo *tibialis anterior*. Em seguida aplicou-se o protocolo experimental para indução da fadiga muscular, o qual consiste em 10 estimulações de 2 segundos cada, na frequência de 200Hz, com intervalo de descanso de 4 segundos entre cada pulso elétrico aplicado. Ao final deste protocolo, os músculos receberam uma estimulação elétrica de baixa frequência (0,2Hz) por 2 minutos, mimetizando um intervalo de descanso. Em seguida, os músculos foram estimulados a realizar a contração tetânica máxima, induzida por 350Hz por 2 segundos. A força tetânica específica é expressa em millinewtons (mN)/miligrama (mg) de músculo. O desenvolvimento da fadiga muscular foi medido em 4 tempos de contração (1º, 4º, 7º e 10º contrações).

3.12. Análises histológicas de músculos *tibialis anterior*

Para análises histológicas os músculos *tibialis anterior* foram cuidadosamente excisados, a fim de evitar a mínima lesão nas fibras musculares, e colocados na posição de repouso em suporte de acrílico. Em seguida, foram congelados em isopentano e armazenados em freezer -80°C. Os músculos foram cortados a -20°C em uma espessura de 10 µm em criostato (Leica CM1850 UV criostato; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.12.1 Coloração com hematoxilina e eosina

Os cortes de músculos *tibialis anterior* foram preparados conforme descrito anteriormente e posicionados em lâmina de 26x76mm. Em seguida, foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para demonstração da integridade das fibras musculares após a cirurgia de eletroporação *in vivo*. A hematoxilina apresenta coloração azul-púrpura, sendo responsável pela coloração de ácidos nucleicos por uma reação ainda não totalmente

desvendada. A eosina apresenta coloração rosa e cora proteínas não específicas no citoplasma e na matriz extracelular (FISCHER *et al.*, 2008).

3.12.2. Ensaio de Imunofluorescência para marcação do peptídeo Ucn2

Os cortes de músculos *tibialis anterior* foram preparados (vide seção 3.14 Histologia) e fixados em paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes histológicos foram lavados em PBS (*phosphate buffer saline*) filtrado e permeabilizados com Triton X-100 (0.1%) diluído em PBS, por 2 min à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS filtrado, procedeu-se a saturação dos cortes em solução contendo *mouse serum* (Sigma®) (10%) e BSA (0,5%) diluídos em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS e incubados *overnight* (aproximadamente 12 horas) a 4° C com o anticorpos primário Ucn2 goat polyclonal (sc-54449) (1:50) diluído em *mouse serum* (10%) e BSA (0,5%) em PBS filtrado. No dia seguinte, os cortes foram novamente lavados com PBS filtrado e foram incubados por 1h à temperatura ambiente com o anticorpos secundário AlexaFluor®647 AffinePure Donkey Anti-Goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc #705-605-147) (1:100) diluído em *mouse serum* (10%) e BSA (0,5%) em PBS filtrado. Após lavagem com PBS procedeu-se a incubação com DAPI (1:1000; 2 minutos) e, em seguida, as lâminas foram lavadas rapidamente em PBS e montadas utilizando-se a solução DAKO Fluorescent Mounting Medium. As imagens foram coletadas com o microscópio de fluorescência Olympus BX61VS e analisadas pelo *software* ImageJ (Fiji is Just) versão 1.52d (*National Institutes of Health*, EUA). As fibras transfectadas e seus núcleos foram identificados pela fluorescência através do GFP e DAPI (4',6-Diimidine-2'-phenylindole dihydrochloride), respectivamente.

3.12.3. Ensaio de Imunofluorescência para marcação do tipo de fibra muscular e medida da área de secção transversa

Os cortes de músculos *tibialis anterior* foram preparados (vide seção 3.14 Histologia), lavados em PBS (*phosphate buffer saline*) filtrado e incubados com o reagente de bloqueio *Mouse on Mouse* (M.O.MTM) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS filtrado, os cortes foram incubados *overnight* (aproximadamente 12 horas) a 4° C com os anticorpos primários MyHCIIa (DSHB, SC-71; 1:050) e Distrofina (Abcam[®]) (1:100) diluídos em BSA 0,5% em PBS filtrado. No dia seguinte, os cortes foram novamente lavados com PBS filtrado e foram incubados por 1h a 37°C com os anticorpos secundários diluídos em *goat serum* (2%) e BSA (0,5%) em PBS filtrado: Alexa Fluor 488[®] anti-mouse (1:150) e Alexa Fluor 647[®] anti-rabbit (Life Technologies[®]) (1:200). Após lavagem com PBS procedeu-se a incubação com DAPI (1:1000; 2 minutos) e, em seguida, as lâminas foram lavadas rapidamente em PBS e montadas utilizando-se a solução DAKO Fluorescent Mounting Medium. As imagens foram coletadas com o microscópio de fluorescência Olympus BX61VS e serão analisadas em breve pelo *software* SMASH (*semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology*) (SMITH; BARTON, 2014). As fibras transfectadas e seus núcleos foram identificados pela fluorescência através do GFP e DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride), respectivamente.

3.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As médias dos diferentes grupos foram analisadas através do teste *t* de *Student* pareado ou não-pareado,

considerado $p \leq 0,05$ como nível de significância. Quando necessário o teste de variância *two way* ANOVA também foi empregado.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do modelo experimental

4.1.1. Superexpressão *in vitro* da Ucn2 em células musculares C2C12 não-diferenciadas (mioblastos)

Conforme descrito anteriormente, estudos mostram que o tratamento farmacológico *sistêmico* com Ucn2 promove efeitos anabólicos e anti-atróficos na musculatura esquelética. Entretanto, não se pode excluir que as ações biológicas da Ucn2 em demais órgãos e tecidos possam ter contribuído, indiretamente, para o fenótipo observado na musculatura esquelética nos modelos experimentais atroficos previamente descritos na literatura. Além disso, fármacos administrados pela via intraperitoneal são absorvidos primeiramente pelos vasos sanguíneos mesentéricos e, em seguida são drenados até a veia porta para então serem metabolizadas pelo fígado e, posteriormente, alcançarem a circulação sistêmica (LUKAS *et al.*, 1971). Considerando o fato da Ucn2 ter uma meia-vida relativamente curta, de cerca de 4-5 minutos (PATEL *et al.*, 2012) é plausível especular que a administração intraperitoneal possa ser um fator limitante para que a Ucn2 alcance as células musculares em sua totalidade, já que nada se conhece acerca de sua metabolização pelos hepatócitos.

Dessa forma, com o objetivo de excluir as ações sistêmicas da Ucn2 e investigar o seu efeito local na massa muscular, foi proposto neste trabalho a superexpressão *in vivo* deste peptídeo em músculos *tibialis anterior*. No entanto, previamente aos experimentos *in vivo*, com o intuito de validar os plasmídeos, mioblastos (linhagem de células musculares C2C12 não-diferenciadas) foram transfectados por 24h e 48h com os plasmídeos expressando o gene

hUcn2 (urocortina 2 de humano) ou mUcn2 (urocortina 2 de camundongo; do inglês *mouse*) ou ainda o plasmídeo expressando o vetor vazio pcDNA3.1+.

Na Figura 6 podemos observar que a superexpressão *in vitro* da hUcn2 e da mUcn2 por 24h aumentaram a fosforilação de substratos da PKA (na altura de 45 kDa) e de seu alvo *downstream* CREB em resíduos de Ser¹³³. Após 48h de transfecção, estes efeitos foram observados apenas em células transfectadas com mUcn2. O aumento no estado de fosforilação de componentes da via de sinalização canônica AMPc/PKA comprovam a viabilidade biológica dos plasmídeos. Dessa forma, apesar da homologia (76%) entre a Ucn2 de ambas as espécies, utilizou-se o plasmídeo expressando o gene da Ucn2 de camundongo (mUcn2) para os experimentos realizados *in vivo*.

Figura 6. Efeito da superexpressão temporal (24h e 48h) da hUcn2 e mUcn2 no conteúdo proteico de substratos-p pela PKA e CREB-p Ser¹³³ em cultura de células C2C12 não-diferenciadas (pcDNA3.1+: vetor vazio; hUcn2: urocortina 2 de humano; mUcn2: urocortina 2 de camundongo)

4.1.2. Superexpressão *in vivo* da Ucn2 em músculos *tibialis anterior* de camundongos

Após a validação e escolha do vetor plasmidial a ser utilizado, no caso o plasmídeo expressando o gene mUcn2, procedeu-se aos experimentos de transfecção *in vivo* diretamente no músculo esquelético. A superexpressão *in vivo* do plasmídeo contendo o gene mUcn2 foi comprovada através do aumento da expressão do RNAm da Ucn2 por 7 dias (~500x) e 14 dias (~40x) (Figura 7A) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais quando comparados aos músculos do grupo controle, que receberam o plasmídeo expressando o vetor vazio (pcDNA3.1+). Vale destacar que apenas neste protocolo experimental não foi utilizada a enzima hialuronidase previamente à eletroporação *in vivo* para o grupo transfectado por 14 dias, explicando a redução significativa dos níveis de RNAm da Ucn2 quando comparado ao período de 7 dias, mas mesmo assim, a expressão gênica de Ucn2 ainda manteve-se bastante elevada (~40x) em relação à pata contralateral controle (Figura 7A). Curiosamente, ao analisar individualmente cada músculo, foi observado uma relação inversa entre os valores relativos de expressão do RNAm da Ucn2 e a magnitude da hipertrofia promovida pela Ucn2 (dados não mostrados), o que poderia ser explicado por uma regulação fisiológica negativa da expressão do receptor específico para este peptídeo (CRF2R). No entanto, a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias não provocou qualquer alteração na expressão gênica do CRF2R em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais (Figura 7B), sugerindo indiretamente que o receptor possa sofrer regulações pós-traducionais. No entanto, o conteúdo proteico deste receptor será avaliado para confirmar tal hipótese.

O aumento dos níveis de RNAm da Ucn2 foi acompanhado pelo incremento do conteúdo proteico deste peptídeo, representado na Figura 8, a qual também demonstra uma marcação mais acentuada para Ucn2 ao redor das células musculares quando comparada com o meio intracelular, sugerindo que este peptídeo foi sintetizado e pode ter sido secretado pelos

miócitos. A eficiência de transfecção das fibras musculares foi comprovada pela co-transfecção do vetor vazio e um plasmídeo expressando o gene de GFP (*green fluorescent protein*) **ou** os plasmídeos mUcn2 e GFP, conforme observado nos cortes histológicos transversais de *tibialis anterior* (Figura 8).

Com o objetivo de demonstrar a homogeneidade do processo de eletroporação *in vivo*, músculos *tibialis anterior* foram co-tranfectados com o plasmídeo expressando o vetor vazio pcDNA3.1+ e o plasmídeo H2B-RFP (histona 2B fusionada ao RFP: *red fluorescent protein*) ou os plasmídeos mUcn2 e H2B-RFP por 7 e 14 dias. Como representado nas Figuras 9A e 9B não houve diferença no conteúdo proteico de RFP, demonstrando que os músculos de ambos os grupos, controle e experimental, apresentaram o mesmo padrão de eficiência de transfecção em ambos os períodos analisados.

Figura 7. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de RNAm da Ucn2 por 7 e 14 dias (A) e nos níveis de RNAm do CRF2R (B) por 14 dias em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (CRF2R: *corticotrophin-releasing factor 2 receptor*) (* $p \leq 0,05$ vs controle; $\delta p \leq 0,05$ vs mUcn2 7 dias) (n=5-6).

Figura 8. Imagens microscópicas representativas do efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 no conteúdo proteico de Ucn2 em cortes histológicos de músculos *tibialis anterior* de camundongos normais co-transfectados *in vivo* com os plasmídeos expressando o vetor vazio pcDNA 3.1+ e GFP (controle) ou mUcn2 e GFP por 14 dias. O controle negativo foi obtido através da omissão do anticorpo primário. Os núcleos foram corados com DAPI. Cortes transversais com aumento de 40x. (AF: Alexa Fluor; GFP: *Green Fluorescent Protein*; mUcn2: urocortina 2 de camundongo).

Figura 9. Demonstração da homogeneidade do processo de transfecção através da análise do conteúdo proteico de H2B-RFP em músculos *tibialis anterior* de camundongos co-transfectados com o vetor vazio pcDNA3.1+ e o plasmídeo H2B-GFP ou os plasmídeos mUcn2 e H2B-GFP por 7 dias (A) e 14 (B) dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) da proteína avaliada encontram-se expressos em gráfico (C). (H2B: histona 2B, RFP: *Red Fluorescent Protein*; mUcn2: urocortina 2 de camundongo) (n=5-7).

A Figura 10 representa cortes histológicos transversais de músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 14 dias com Ucn2 submetidos a coloração por hematoxilina e eosina. Os núcleos foram marcados com hematoxilina (cor: azul-púrpura) e o citoplasma foi corado com eosina (cor: rosa). Nas imagens é possível observar a ausência de sinais de lesão ou regeneração celular, demonstrando a integridade das fibras musculares após a superexpressão da Ucn2 por 14 dias pela técnica de eletroporação *in vivo*. Além disso, nestas imagens é possível também verificar o maior diâmetro das fibras musculares que receberam Ucn2 em comparação ao controle.

Figura 10. Imagem microscópica de cortes histológicos transversais de fibras musculares coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) de músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados com o plasmídeo expressando o vetor vazio pcDNA3.1+ ou o gene mUcn2 por 14 dias. Cortes transversais com aumento de 40x.

4.2. Efeitos *in vivo* e *in vitro* da Ucn2 na modulação da massa e no metabolismo de proteínas em músculos esqueléticos de roedores

4.2.1. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na massa muscular de camundongos normais

Para avaliar o efeito temporal da possível modulação da massa muscular pela Ucn2, músculos *tibialis anterior* de camundongos normais foram transfectados por 7, 14 e 30 dias com o plasmídeo expressando o gene mUcn2. A superexpressão pelo período agudo de 7 dias não provocou alteração significativa na massa, no entanto, a transfecção por 14 dias foi capaz de induzir hipertrofia (33%) nestes músculos quando comparados aos músculos do grupo controle (Figuras 11A e 11B). Este fenótipo já havia sido evidenciado pelo maior diâmetro das fibras musculares induzido pela superexpressão da Ucn2 pelo mesmo período (Figura 10). A superexpressão crônica da Ucn2 por 30 dias não resultou em efeito hipertrófico adicional (23%) (Figura 11A). Curiosamente, a superexpressão da Ucn2 por 14 dias em músculo *tibialis anterior* também promoveu hipertrofia no músculo glicolítico EDL (Figura 11A). A Figura 11C representa os valores percentuais da massa muscular em relação ao grupo controle para cada tipo de músculo e tempos avaliados.

Figura 11. Efeito temporal (7, 14 e 30 dias) da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na massa muscular de *tibialis anterior* e EDL de camundongos normais. Os resultados da massa muscular estão representados como valores relativos (A), bem como na imagem para o grupo 14 dias (B) e em percentuais relativos ao grupo controle específico de cada tempo analisado (C). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=3 para o grupo 30 dias e n=7 para os demais grupos).

4.2.2. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na massa muscular de camundongos submetidos a condições atroficas

Tendo em vista que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 foi capaz de modular a massa muscular em condições fisiológicas, procedeu-se a investigação se este peptídeo também seria capaz de regular a massa em condições atroficas, como o jejum por 48h e a desnervação motora isquiática (DEN) por 14 dias. O modelo catabólico do jejum por 48h não promoveu atrofia nos músculos *tibialis anterior* que receberam o plasmídeo expressando o vetor vazio quando comparados aos músculos do grupo alimentado (Figura 12A). Portanto, o modelo catabólico do jejum por 48h não foi eficaz para investigar o efeito *in vivo* da Ucn2 na massa muscular esquelética. Por outro lado, a atrofia promovida pela desnervação motora isquiática (38%) foi parcialmente prevenida (7%) pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias em músculos *tibialis anterior* quando comparados ao grupo controle (Figura 12B). Esse resultado demonstra um efeito antiatrófico da Ucn2 *in vivo*, sugerindo uma inibição da degradação de proteínas por esse peptídeo.

Figura 12. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na massa muscular de *tibialis anterior* de camundongos jejuados por 48h (A) e desnervados por 14 dias (B). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle; # $p \leq 0,05$ vs DEN pcDNA3.1+) (n=5).

O presente trabalho demonstra que, além do efeito hipertrófico, a superexpressão da Ucn2 *in vivo* também previne a perda de massa muscular em situação atrofica. Contudo, *o estudo dos efeitos da Ucn2 no metabolismo de proteínas foi investigado em músculos esqueléticos de animais normais*, já que nada se conhece acerca dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos biológicos promovidos pela Ucn2 neste tecido em condições fisiológicas.

4.3. Vias de sinalização intracelulares ativadas pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 no músculo esquelético

A investigação das vias de sinalização que possivelmente participam dos efeitos induzidos pela Ucn2 na musculatura esquelética foi realizada em ambos os tempos de transfecção do peptídeo (7 e 14 dias). Embora a hipertrofia muscular decorrente da superexpressão da Ucn2 tenha sido observada apenas após 14 dias, é possível que a modulação da maioria dos eventos moleculares, responsáveis por este fenótipo, seja mais pronunciada e evidente em períodos mais precoces de transfecção (7 dias). Assim, inicialmente serão apresentados os resultados dos componentes das distintas vias de sinalização estudadas, possivelmente envolvidos no efeito hipertrófico promovido pela Ucn2 *in vivo* e, após, serão descritos os resultados acerca dos eventos moleculares que possivelmente medeiam a ação antiproteolítica deste peptídeo.

4.3.1. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na regulação de componentes da via de sinalização canônica AMPc/PKA/CREB

Sabendo que a Ucn2 aumenta os níveis intracelulares de AMPc *in vitro* (HINKLE *et al.*, 2003a.; HINKLE *et al.*, 2003b) procedeu-se, inicialmente, a investigação da participação deste segundo mensageiro intracelular, nos efeitos anti-atrófico e hipertrófico induzidos pela Ucn2. A superexpressão da Ucn2 por 14 dias aumentou os níveis intracelulares de AMPc (36%) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais quando comparados ao controle (Figura 13A). Dando continuidade à investigação da participação do AMPc nos efeitos mediados pela Ucn2, analisou-se a atividade indireta da PKA e o conteúdo proteico de Epac, sabidamente efetores *downstream* do AMPc. A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de Epac (~3x) (Figuras 13B e 13C), bem como o estado de fosforilação de proteínas-alvo da PKA por 7 dias (22%) (Figuras 14A e 14C). A transfecção por 7 e 14 dias com Ucn2 aumentou a fosforilação de CREB em resíduos de Ser¹³³ (70% e 50%, Figuras 15A e 15B, respectivamente), sugerindo uma maior atividade de PKA induzida pela Ucn2 em ambos os tempos analisados. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) de CREB-p Ser¹³³ e CREB total encontram-se, respectivamente, expressos em gráfico (Figuras 15C e 15D).

Figura 13. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias no conteúdo intracelular de AMPc (A) e no conteúdo proteico de Epac (B) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) da proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (C). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=3-5).

Figura 14. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 no estado de fosforilação de substratos da PKA em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 (A) e 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (C). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

Figura 15. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de CREB (Ser¹³³) e em seu conteúdo proteico total em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Os resultados são expressos como média ± EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

Considerando que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias aumentou a fosforilação de CREB, foi investigada a expressão de genes-alvos deste fator de transcrição, como PGC1- α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), NR4a1 (*nuclear receptor subfamily 4 group A member 1*) e SIK1 (*salt inducible kinase 1*). A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias foi capaz de aumentar o RNAm de PGC-1 α (~2,5x) e SIK1 (~2x) (Figura 16A), sabidamente genes-alvos de CREB, indicando dessa forma, maior atividade transcricional de CREB induzida pela Ucn2 em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais. Além disso, o conteúdo proteico de PGC-1 α também foi maior em músculos *tibialis anterior* eletroporados com Ucn2 por 7 e 14 dias (~1,2x; ~3,5x, respectivamente) quando comparados com os músculos do grupo controle (Figuras 16B e 16C). A figura 16D representa os valores da densitometria das bandas (*blots*) da proteína avaliada.

Estes resultados sugerem que a Ucn2 ativa a via de sinalização AMPc/PKA/CREB e AMPc/Epac para exercer seus efeitos na musculatura esquelética, no modelo experimental investigado.

Figura 16. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de RNAm de genes-alvo de CREB (PGC-1α, NR4a1 e SIK1) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 14 dias (A) e no conteúdo proteico de PGC-1α após 7 dias (B) e 14 (C) dias de transfecção. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) da proteína avaliada encontram-se expressos no gráfico (D). Os resultados são expressos como média ± EPM. (*p ≤ 0,05 vs controle) (n=5).

4.3.2. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na regulação de componentes das vias de sinalização clássica Akt/mTOR

Tendo em vista que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias promoveu o crescimento muscular em condições fisiológicas, investigou-se o envolvimento da sinalização clássica Akt/mTOR no fenótipo induzido pela Ucn2, uma vez que esta é a principal via envolvida com a regulação do processo metabólico de síntese de proteínas e, consequentemente de indução do anabolismo muscular.

A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 7 dias aumentou a fosforilação de Akt em resíduos de Ser⁴⁷³ (50%) e Thr³⁰⁸ (100%) (Figura 17A). No entanto esse efeito não foi observado 14 dias após a transfecção com Ucn2 (Figura 17B). Para avaliar indiretamente a atividade desta quinase, os níveis de fosforilação de seus principais alvos *downstream* foram analisados: mTOR, GSK3- β e Foxo. A transfecção da Ucn2 *in vivo* por 7 e 14 dias promoveu aumento nos níveis de fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) (~1,5x; 76% respectivamente) e de seu conteúdo proteico total (94%) no grupo transfectado por 7 dias (Figuras 18A e 18B). Corroborando este resultado, a superexpressão *in vivo* da Ucn2 aumentou a fosforilação de S6 (Ser^{235/236}) (62%) e (Ser^{240/244}) (54%) (Figura 19A), sabidamente um alvo *downstream* de mTOR, sugerindo maior atividade desta quinase. No entanto, a transfecção de Ucn2 por 14 dias não promoveu alterações significativas no estado de fosforilação de S6 (Ser^{235/236}) (Figura 19B) e nem de GSK3 α (Ser²¹) e GSK3 β (Ser⁹) (Figura 20). Interessante destacar que a Ucn2 aumentou o conteúdo proteico total de Akt (84%), mTOR (~1,4x) e S6 (40%) após 7 dias de transfecção (Figuras 17A e D; 18A e D; 19A e D) e, assim, os valores da densitometria das respectivas proteínas fosforiladas foram corrigidos tanto pelas proteínas totais quanto pela β -actina (Figuras 17C, 18C e 19C).

Além de S6, outro substrato conhecido de mTOR é a proteína 4E-BP1, que quando hiperfosforilada torna-se inativa, liberando assim eIF4E de sua ação repressora. A superexpressão da Ucn2 por 7 dias aumentou o estado de fosforilação de 4E-BP1 (Thr^{37/46}) (~1,2x) e de eIF4E (Ser²⁰⁹) (~4x) (Figuras 21A e 21C), contudo estes efeitos não foram observados no grupo transfectado por 14 dias com o peptídeo (Figura 21B). Sabe-se que ERK1/2 e p38 MAPK podem fosforilar e ativar Mnk1 (*MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1*), que por sua vez, fosforila e ativa eIF4E em resíduos de Ser²⁰⁹ (PYRONNET, 2000). Portanto, estes resultados sugerem que a Ucn2 recruta as vias de sinalização Akt/mTOR/S6 e Akt/mTOR/4E-BP1, bem como a via das MAPKs, sabidamente envolvidas na regulação da síntese de proteínas, o que pode explicar, ao menos em parte, o efeito hipertrófico observado em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais.

Figura 17. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de Akt (Thr³⁰⁸) e Akt (Ser⁴⁷³) e em seu conteúdo proteico total em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5-7).

Figura 18. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) e em seu conteúdo proteico total em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliada encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

Figura 19. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de S6 (Ser^{235/236}) e (Ser^{240/244}) e em seu conteúdo proteico total em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (A) e 14 dias (A). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliada encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Os resultados são expressos como média ± EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

Figura 20. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de GSK3α (Ser²¹) e GSK3β (Ser⁹) e em seu conteúdo proteico total em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 14 dias. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliada encontram-se expressos no gráfico ao lado. Os resultados são expressos como média ± EPM. (*p ≤ 0,05 vs controle) (n=5).

Figura 21. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de 4E-BP1 (Thr^{37/46}) e eIF4E (Ser²⁰⁹) e em seus conteúdos proteicos totais em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliada encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

4.3.3. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na regulação de componentes das vias de sinalização das MAP quinases

Considerando que os achados do presente trabalho sugerem a participação de componentes da via de sinalização clássica da insulina/IGF-1 nos efeitos promovidos pela Ucn2 em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais, procedeu-se à investigação do possível envolvimento das MAPKs, outras quinases também estimuladas pela ativação da via de sinalização desses hormônios.

A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 7 e 14 dias aumentou os níveis de fosforilação de ERK1 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (27%, apenas no grupo 7 dias) e ERK2 (Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷) (34% e 50%, respectivamente aos 7 e 14 dias), bem como reduziu a razão ERK1-p/ERK2-p (36%, apenas no grupo 7 dias) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais (Figuras 22A e 22B), indicando maior conteúdo de ERK2-p em relação à ERK1-p. No grupo transfectado por 7 dias com Ucn2, os valores da densitometria das respectivas proteínas fosforiladas foram corrigidos tanto pelas proteínas totais quanto pela β -actina, já que a Ucn2 aumentou o conteúdo proteico total de ERK1 (37%) e ERK/2 (65%), assim como reduziu a razão ERK1/ERK2 (65%) neste período.

Em seguida fomos investigar o envolvimento de outra proteína da família das MAPKs, a p38 MAPK, nos eventos moleculares que participam das ações da Ucn2. Após 7 e 14 dias de transfecção, a Ucn2 *in vivo* não alterou o estado de fosforilação de p38MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) (Figuras 23A e 23B), sugerindo que, em relação às MAPKs analisadas, a Ucn2 parecer recrutar apenas ERK1/2 para promover seus efeitos *in vivo* na musculatura esquelética

Figura 22. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de ERK1 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) e ERK2 (Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷) e em seus conteúdos proteicos totais em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliada encontram-se expressos nos gráficos. Os resultados são expressos como média ± EPM. (*p ≤ 0,05 vs controle) (n=5).

Figura 23. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de p38MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) e em seu conteúdo proteico total em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais por 7 dias (A) e 14 (B) dias. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliada encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

4.3.4. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na taxa de síntese proteica em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais

A superexpressão *in vivo* da Ucn2 parece recrutar Akt, mTOR, S6, ERK1/2 e eIF4E, proteínas integrantes da principal via de sinalização responsável pelo controle do metabolismo de proteínas na musculatura esquelética. Além disso, sabe-se que os processos anabólicos ocorrem principalmente quando as taxas de síntese sobrepujam as de degradação proteica. Nesse sentido, considerando que o efeito hipertrófico da Ucn2 foi associado ao aumento no estado de fosforilação de ERK1 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), ERK2 (Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷), eIF4E (Ser²⁰⁹), Akt (Ser⁴⁷³), mTOR (Ser²⁴⁴⁸), S6 (Ser^{235/236}) (Ser^{240/244}), sendo esta última um marcador indireto da síntese proteica, investigou-se o fenótipo muscular promovida pela Ucn2 e a sua relação com a taxa de síntese de proteínas *in vivo*, mensurada semi-quantitativamente através da marcação de proteínas ligadas à puromicina. A puromicina foi injetada (*i.p*) em camundongos normais previamente transfectados com Ucn2 por 14 dias (vide seção 3.8 – Material e Métodos). Nesse caso, a magnitude da síntese proteica é diretamente proporcional à intensidade das bandas (*blots*) marcadas com anticorpo anti-puromicina. A Figura 24A demonstra a especificidade do anticorpo anti-puromicina, cuja marcação só foi identificada nas amostras de músculos *tibialis anterior* de camundongos tratados com puromicina. Na figura 24B podemos observar que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias aumentou o conteúdo de proteínas ligadas à puromicina (39%), indicando, dessa forma, um aumento da síntese proteica em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais quando comparados com os músculos injetados com o vetor vazio. Os valores da intensidade do sinal das bandas marcadas para puromicina foram corrigidos pelo Ponceau e estão representados em gráfico na Figura 24C. Portanto, o efeito hipertrófico promovido pela Ucn2 é decorrente do incremento

da taxa síntese proteica, que ocorre, principalmente, através da estimulação das vias Akt/mTOR/S6, Akt/mTOR/4E-BP1 e, possivelmente ERK1/2/eIF4E.

Figura 24. Demonstração da especificidade do anticorpo anti-puromicina (A). Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 no conteúdo de proteínas incorporadas à puromicina em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) marcadas com anticorpo anti-puromicina encontram-se expressos no gráfico (C). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=7).

4.3.5. Efeito da superexpressão *in vivo* dos plasmídeos contendo o gene *dnAkt* ou *mkp1* na hipertrofia induzida pela *Ucn2* em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais

Com o intuito de investigar, de fato, a participação das quinases Akt e ERK1/2 no crescimento muscular induzido pela superexpressão da *Ucn2 in vivo*, a atividade endógena destas quinases foi bloqueada indiretamente em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais. Para isso, empregou-se o método de manipulação gênica *in vivo*, através da transfecção intramuscular de plasmídeos codificados para o gene *dnAkt* (dominante negativo de Akt) ou para o gene de *mkp1* (*mitogen-activated protein kinase phosphatase 1*). O plasmídeo *dnAkt* expressa uma isoforma mutante de Akt em sítios de Ser⁴⁷³ e Thr³⁰⁸ e, portanto, não pode ser ativada para exercer sua atividade catalítica, e assim, por mecanismo de ligação competitiva aos substratos da Akt endógena, inibe a via de sinalização *downstream* à Akt. A supressão da atividade de ERK1/2 endógena ocorre pela ação da fosfatase *mkp1*, que defosforila esta MAPK, inibindo-a.

Músculos *tibialis anterior* de camundongos normais foram co-transfectados com o vetor vazio pcDNA3.1+ e/ou *dnAkt* ou pcDNA3.1+ e/ou *mkp1* (grupos controles) ou plasmídeos expressando mUcn2 e/ou *dnAkt*, ou mUcn2 e/ou *mkp1* (grupos experimentais), conforme esquema representado na Figura 5. A superexpressão de ambos os plasmídeos codificados para o gene *dnAkt* e *mkp1* reduziu significativamente (9% e 11%, respectivamente) o efeito hipertrófico induzido pela *Ucn2* (22%) *in vivo* (Figuras 25A e 25B), evidenciando o envolvimento das vias de sinalização Akt/mTOR/S6 e ERK1/2 neste fenótipo observado em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais. Os valores da massa estão representados graficamente corrigidos por grama de peso corporal de camundongo (Figura 25A) e também encontram-se expressos em percentual relativo ao respectivo controle de cada grupo, considerado como 100% (Figura 25B).

Figura 25. Efeito da superexpressão *in vivo* dos plasmídeos contendo o gene *dnAkt* ou *mkp1* em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais co-transfectados com mUcn2 por 14 dias. Os valores da massa de *tibialis anterior* estão representados graficamente corrigidos por grama de peso corporal de camundongo (A), bem como foram expressos em percentual relativo ao respectivo controle de cada grupo, considerado como 100% (B). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs pcDNA3.1+ + pway21-GFP; λ $p \leq 0,05$ vs pcDNA3.1+ + *dnAkt* + pway21-GFP; τ $p \leq 0,05$ vs pcDNA3.1+ + *mkp1* + pway21-GFP; # $p \leq 0,05$ vs mUcn2 + pway21-GFP $p \leq 0,05$) (n=7).

4.3.6. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 no estado de fosforilação dos receptores de insulina/IGF-1

Os resultados anteriormente descritos demonstram que os efeitos na modulação da massa muscular exercidos pela Ucn2 envolvem a participação de Akt/mTOR/S6 e ERK1/2, duas cascatas de sinalização bem conhecidas da via de sinalização da insulina/IGF-1. Nesse sentido, não se pode descartar um possível aumento da sensibilidade à insulina ou ao IGF-1 induzida pela Ucn2 em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais. Sabe-se que o receptor da insulina/IGF-1 possui atividade do tipo tirosina-quinase intrínseca e, dessa forma, a ligação de seus agonistas promove a sua auto-fosforilação em diversos resíduos de tirosina, ativando-o (Patti e Kahn, 1998). Com o objetivo de investigar, de forma indireta, se a superexpressão *in vivo* da Ucn2 seria capaz de regular a sensibilidade à insulina/IGF-1 em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais, procedeu-se a avaliação dos níveis de fosforilação, em diferentes resíduos de tirosina, do receptor de insulina/IGF-1 (IR/IGF-1R) nestes músculos.

Para identificação da altura específica da banda dos receptores fosforilados de insulina e IGF-1 avaliados, utilizamos músculos de animais tratados com insulina (Figura 26A) como controle positivo. A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 7 dias reduziu o estado de fosforilação de IR β fosforilado em resíduos de Tyr^{1162/1163} (27%). Por outro lado, observou-se um incremento nos níveis de fosforilação dos receptores IGF-I R β (Tyr^{1135/1136})/ IR β (Tyr^{1150/1151}) (~2x) (Figura 26B). Estes efeitos não foram observados no grupo transfectado por 14 com o peptídeo (Figura 26C). Estes resultados sugerem que as modulações dos eventos intracelulares pela Ucn2 parecem ser independentes da insulina, mas levantam a hipótese de um possível aumento da sensibilidade muscular ao IGF-1. Contudo, são necessários mais

estudos que avaliem de forma direta o possível efeito da Ucn2 na sensibilidade à insulina/IGF-1 em nosso modelo experimental.

Figura 26. Controle positivo utilizado para identificar os receptores avaliados (A). Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de IR β (Tyr^{1162/1163}), IGF-I R β (Tyr^{1135/1136})/ IR β (Tyr^{1150/1151}) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (B) e 14 dias (C). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliada encontram-se expressos nos gráficos (D e E). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=4-5).

*A seguir serão descritos os resultados relacionados à regulação molecular exercida pela Ucn2 na **degradação de proteínas** no músculo esquelético.*

*4.3.7. Efeito da superexpressão **in vivo** da Ucn2 na regulação de componentes da via de sinalização clássica Akt/Foxo*

É consenso que a proteína quinase Akt, além de controlar os componentes envolvidos com a síntese proteica, também é responsável por regular negativamente os fatores de transcrição Foxo e, assim, exercer modulação inibitória sobre a expressão dos atrogenes e, consequentemente sobre a degradação de proteínas no músculo esquelético. Considerando que demonstramos que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 estimula a via de sinalização da insulina/IGF-1 em músculos *tibialis anterior* em condições fisiológicas, bem como exerce efeito anticatabólico no modelo de DEN, tivemos como objetivo investigar se a Ucn2 *in vivo* também seria capaz de regular os processos de degradação de proteínas na musculatura esquelética de camundongos. Para isto foram avaliados os níveis de fosforilação dos fatores de transcrição Foxo, sabidamente envolvidos no controle desta resposta.

A superexpressão *in vivo* da Ucn2 aumentou os níveis de fosforilação de Foxo1 (Ser²⁵⁶) (~2x, 7 dias) e Foxo3 (Thr³²) (~2x, 14 dias) (Figuras 27A e 27B, respectivamente). Além disso, músculos *tibialis anterior* de camundongos normais eletroporados com Ucn2 por 14 dias apresentaram uma tendência ao aumento do estado de fosforilação de Foxo1 (Ser²⁵⁶) sem qualquer alteração nos níveis de fosforilação de Foxo3 (Thr²⁴) (Figura 27B). Essas modificações pós-traducionais de Foxo induzidas pela Akt sugerem uma inibição da atividade destes fatores de transcrição com consequente supressão dos atrogenes, sugerindo que o efeito hipertrófico induzido pela superexpressão da Ucn2 *in vivo* envolve, além do aumento da síntese, a inibição da degradação de proteínas. Esses achados podem explicar, pelo menos em

parte, a ação anti-atrófica promovida pela Ucn2 *in vivo* em *tibialis anterior* de camundongos desnervados.

Além da proteína Akt, outra quinase capaz de regular Foxo através de modificações pós-traducionais é a ERK1/2. Essa MAPK pode fosforilar Foxo3 em resíduos de Ser²⁹⁴ e assim induzir a sua degradação pelo proteassoma através da Ub-ligase MDM2 (YANG *et al.*, 2008). A superexpressão de Ucn2 por 7 dias reduziu os níveis de fosforilação de Foxo3 (Ser²⁹⁴) (~50%) (Figura 27A), excluindo, ao menos em parte, a participação de ERK1/2 na regulação da degradação proteica induzida pela Ucn2. Este resultado corrobora a ausência de alterações no conteúdo proteico e na expressão gênica de Foxo3 (Figuras 27D e 27E, respectivamente), porém, a superexpressão da Ucn2 *in vivo* por 7 dias reduziu o conteúdo proteico total de Foxo1 (~50%) (Figura 27A) concomitante ao aumento dos níveis de RNAm de Foxo1 (~80%) (Figura 27E), sugerindo possível indução da degradação desta proteína.

Figura 27. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos níveis de fosforilação de Foxo1 (Ser²⁵⁶) e (Thr²⁴) e Foxo3 (Ser²⁹⁴) e (Thr³²) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Níveis de RNAm de Foxo1 e Foxo3 em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 7 e 14 dias com Ucn2 (E). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=4-5).

Interessante destacar que apesar do fato da superexpressão *in vivo* da Ucn 2 por 7 dias não promover alteração na massa de músculos *tibialis anterior*, os resultados até aqui sugerem que as vias de sinalização AMPc/PKA/CREB, Akt/mTOR/S6, Akt/mTOR/4E-BP1, Akt/Foxo1,3 e MEK/ERK1/2/eIF4E encontravam-se ativadas neste período, no entanto, provavelmente não houve tempo suficiente para o remodelamento muscular e o consequente aumento da massa dos músculos *tibialis anterior*.

4.4. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na expressão das Ub-ligases, dos genes autofágicos e na atividade transcricional de Foxo em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais

Sabe-se que Foxo quando defosforilado, encontra-se no núcleo e está na forma ativa, ou seja, promove a transcrição de genes relacionados à atrofia muscular (atrogenes), como por exemplo, as Ub-ligases: atrogin-1, MuRF-1, MUSA e SMART e os componentes do sistema proteolítico lisossomal/autofágico: LC3, Gabarapl1 e Catepsina L. Os resultados previamente descritos neste trabalho permitem sugerir uma possível inibição da atividade transcricional de Foxo, induzida pela Akt através da fosforilação de Foxo1 (Ser²⁵⁶) (Figura 27A) e Foxo3 (Thr³²) (Figura 27B). Neste sentido, investigou-se de forma indireta, a atividade transcricional de Foxo através da expressão de seus genes-alvo em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados *in vivo* com Ucn2 por 7 e 14 dias.

A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 7 dias reduziu a expressão gênica da E3-ligase atrogin-1 (25%), bem como do marcador autofágico LC3 (27%), sem alterar os níveis de RNAm dos demais genes-alvo de Foxo avaliados (Figura 28A). Para comprovar, de fato, se a atividade transcricional de Foxo poderia ser modulada pela Ucn2, realizou-se o ensaio do repórter-duplo da luciferase para Foxo (vide seção 3.9 – Material e Métodos). Conforme

observado na figura 28B, a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias reduziu a atividade transcricional de Foxo (~70%), corroborando o resultado obtido na redução da expressão dos atrogenes em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais. Esses achados sugerem que a Ucn2 exerce uma ação modulatória negativa na atividade transcricional de Foxo, com consequente supressão dos genes atroficos, sugerindo inibição dos sistemas proteolíticos UbP e lisossomal/autofágico, com consequente redução da taxa de degradação proteica. Este resultado também pode ajudar a explicar a prevenção da perda de massa muscular observada, por exemplo, em músculos *tibialis anterior* de camundongos desnervados transfectados por 14 dias com Ucn2.

Figura 28. Efeito da superexpressão *in vivo* por 7 dias da Ucn2 na expressão de genes-alvo de Foxo (atrogin-1, MuRF-1, MUSA, SMART, LC3, Gabarap11 e Catepsina L) (A) e na atividade transcricional de Foxo em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 14 dias (B). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

4.5. Efeito *in vitro* da Ucn2 na proteólise total e na atividade dos sistemas proteolíticos ubiquitina-proteassoma, lisossomal/autofágico e dependente de Ca^{+2} em músculos EDL de camundongos e ratos normais e atróficos

Fundamentado no efeito inibitório da atividade transcricional de Foxo *in vivo*, fomos investigar se a Ucn2 seria capaz de regular a degradação de proteínas *in vitro* em condições fisiológicas e em situação atrofica de jejum por 48h. Considerando as diferenças morfológicas e metabólicas existentes entre os músculos glicolíticos e oxidativos, avaliou-se a proteólise total em músculos EDL (glicolítico) e *soleus* (oxidativo) incubados com diferentes concentrações de Ucn2.

A Ucn2 *in vitro* reduziu a taxa de proteólise total ($\text{nmol tirosina} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$) em músculos EDL de ratos normais incubados por 2h em diferentes concentrações do peptídeo: $7 \cdot 10^{-8}\text{M}$ (13%; $0,230 \pm 0,006$ vs $0,265 \pm 0,022$, grupo controle), 10^{-7}M (18%; $0,217 \pm 0,008$ vs $0,266 \pm 0,015$, grupo controle) $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$ (19%; $0,210 \pm 0,014$ vs $0,259 \pm 0,007$, grupo controle) e 10^{-6}M (17%, $0,209 \pm 0,018$ vs $0,250 \pm 0,003$, grupo controle) (Figura 29A). De forma semelhante, músculos *soleus* de ratos normais incubados com Ucn2 (10^{-6}M) também apresentaram redução da proteólise total (23%, $0,480 \pm 0,022$ vs $0,626 \pm 0,029$, grupo controle) (Figura 29A). Os valores de tirosina liberados para o meio de incubação dos animais controles foram considerados como 100%. Músculos *soleus* de camundongos normais apresentaram redução na taxa de proteólise total apenas quando incubados com Ucn2 na concentração de $5 \cdot 10^{-7}\text{M}$ (15%, $0,332 \pm 0,017$ vs $0,401 \pm 0,019$, grupo controle) (Figura 29B). Por outro lado, músculos EDL de camundongos normais foram resistentes à redução da proteólise total induzida pela Ucn2 *in vitro* (Figura 29B). Estes resultados mostram que a Ucn2 inibe a degradação de proteínas *in vitro* em músculos EDL e *soleus* de ratos e *soleus* de

camundongos normais. No entanto, a Ucn2 *in vitro* não promoveu efeito antiproteolítico em músculos EDL de ratos jejuados por 48h (Figura 29C).

Figura 29. Efeito *in vitro* de diferentes concentrações da Ucn2 na proteólise total de músculos EDL de ratos normais (A), camundongos normais (B) e ratos jejuados por 48h (C). Efeito *in vitro* da co-incubação com Ucn2 e/ou IBMX em EDL de ratos (D). Os valores de tirosina liberados para o meio de incubação dos animais controles foram considerados como 100%. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs grupo alimentado) ($n=7$) (IBMX: isobutil-metilxantina).

Sabendo que a Ucn2 é um potente ativador do CRF2R, resultando no aumento dos níveis de AMPc intracelular, conforme previamente demonstrado *in vivo* neste trabalho, fomos investigar a participação deste segundo mensageiro intracelular nos efeitos antiatróficos promovidos pela Ucn2 *in vitro*. Para isso, músculos EDL de ratos normais foram co-incubados com Ucn2 ($5 \cdot 10^{-7}$ M) e IBMX (10^{-4} M) (Figura 29D), um inibidor não-seletivo das fosfodiesterase do AMPc, que por sua vez, resulta no incremento do conteúdo intracelular desse nucleotídeo. Como esperado, a incubação com isobutil-metilxantina (IBMX) reduziu a proteólise total em músculos EDL (19%, $0,186 \pm 0,006$ vs $0,231 \pm 0,006$ grupo controle), porém, a co-incubação com Ucn2 e IBMX não causou qualquer efeito adicional na redução da proteólise ($0,197 \pm 0,008$ vs $0,209 \pm 0,006$ Ucn2), sugerindo que o AMPc tem efeito inibitório na proteólise e pode estar participando dos efeitos promovidos pela Ucn2 *in vitro*, corroborando nossos achados *in vivo*.

A fim de investigar quais sistemas proteolíticos intracelulares seriam regulados pela Ucn2, a atividade dos sistemas lisossomal/autofágico, UbP e dependente de Ca^{+2} foi avaliada. A Ucn2 ($5 \cdot 10^{-7}$ M) *in vitro* reduziu a atividade do sistema lisossomal (41%) (Figura 30A), sem alterar a atividade dos sistemas UbP e dependente de Ca^{+2} (Figuras 30B e 30C, respectivamente). Vale ressaltar que embora não significativo, houve uma tendência da Ucn2 inibir a atividade da via UbP (Figura 30B). Ucn2 não alterou a atividade do sistema proteolítico residual (dados não mostrados). Portanto, estes resultados sugerem que a Ucn2 *in vitro* exerce efeito anti-proteolítico através de um controle inibitório no sistema lisossomal/autofágico em músculos EDL de ratos normais. Ademais, corroborando nossos achados *in vivo*, a Ucn2 *in vitro* aumentou a fosforilação de Foxo1 em resíduos de Ser²⁵⁶ (dados não mostrados) sugerindo ocorrer inibição deste fator transcricional, com consequente

supressão dos genes autofágicos, o que pode explicar em parte a redução da atividade lisossomal induzida por esse peptídeo.

A taxa de liberação de tirosina ocorre de forma linear sobre variadas condições, enquanto que o “*pool*” intracelular deste aminoácido permanece constante durante a incubação. Portanto, a medida da quantidade de tirosina liberada reflete as variações no *turn over* proteico das células musculares (FULKS *et al.*, 1975). No entanto, em determinadas situações podem ocorrer alterações no “*pool*” intracelular de tirosina e, para pesquisar se a Ucn2 poderia interferir na liberação de tirosina do interior da célula muscular foi necessário avaliar o *pool* de tirosina em músculos esqueléticos de ratos incubados com este peptídeo. Não foram encontradas alterações no “*pool*” intracelular de tirosina em EDL de ratos incubados *in vitro* com Ucn2 (dados não mostrados).

Figura 30. Efeito *in vitro* da Ucn2 ($5.10^{-7}M$) na atividade dos sistemas proteolíticos lisossomal (A), ubiquitina-proteassoma (B) e dependente de Ca^{+2} (C) em músculos EDL de ratos normais. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=7).

4.6. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na modulação dos marcadores autofágicos, LC3-II e p62 em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais

Tendo sido demonstrado que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 foi capaz de reduzir a expressão gênica de LC3, assim como a Ucn2 suprimiu a atividade do sistema proteolítico lisossomal/autofágico *in vitro*, fomos motivados a investigar se este peptídeo poderia também controlar o fluxo autofágico *in vivo*. É conhecido que a forma lipídica LC3-II é responsável pela formação e expansão da membrana dupla do autofagossomo, sendo considerada um marcador do fluxo autofágico. Além da medida da LC3-II, avaliamos ainda outro marcador lisossomal conhecido como p62/SQTM1 (*sequestosome 1*), que por sua vez, se liga à LC3-II sendo, portanto, preferencialmente degradado pelo lisossomo (BJORKOY *et al.* 2005). Dessa forma, em condições caracterizadas pela inibição do processo autofágico/lisossomal, ocorre acúmulo das proteínas LC3-II e p62.

A superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 7 dias promoveu aumento do conteúdo proteico de LC3-I (96%) e LC3-II (70%) (Figuras 31A e 31C), bem como de p62 (~6x) (Figuras 31A e 31D) sem alteração em seus níveis de RNAm (Figura 31E) em relação ao controle. Após a transfecção por 14 dias com o peptídeo não foi observada alteração no conteúdo de LC3-I e de LC3-II (Figuras 31B e 31C), no entanto pode-se observar aumento do conteúdo proteico de p62 (64%) (Figuras 31B e 31D), sem alteração em seus níveis de RNAm (Figura 31E), o que sugere de fato que o acúmulo de p62 é decorrente da inibição de sua degradação pelo lisossomo. Dessa forma, esses resultados em conjunto indicam que estas proteínas não foram degradadas por esta organela, sugerindo que a Ucn2 *in vivo* exerce uma modulação inibitória no sistema lisossomal/autofágico na musculatura esquelética, corroborando os nossos resultados *in vitro*. Além disso, o acúmulo de LC3-I associado a redução dos níveis de RNAm de LC3 (Figura 28) induzidos pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 (7 dias), permite formular

a hipótese de que esse peptídeo também regule negativamente estágios mais iniciais da indução da autofagia, como a lipidação de LC3-I em LC3-II.

Figura 31. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 7 e 14 dias no conteúdo proteico de LC3-I, LC3-II e p62 (A e B, respectivamente) e nos níveis de RNAm de p62 (E) em músculos *tibialis anterior* de camudongos normais. Os valores da densitometria das bandas (*blots*) das proteínas avaliadas encontram-se expressos nos gráficos (C e D). Os resultados são expressos como média ± EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5).

A seguir serão descritos os efeitos promovidos pela superexpressão in vivo da Ucn2 na função muscular de tibialis anterior de camundongos normais.

4.7. Efeito da superexpressão in vivo da Ucn2, dnAkt e mkp1 na força e na resistência à fadiga musculares em tibialis anterior de camundongos normais

Considerando que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias promoveu aumento da massa do músculo *tibialis anterior* de camundongos normais, fomos investigar o impacto funcional deste fenótipo nestes músculos. Ademais, os resultados deste trabalho demonstram que este efeito hipertrófico é dependente de Akt e ERK1/2 e, portanto, a participação destas quinases na possível modulação funcional exercida pela Ucn2 também foi avaliada nestes músculos. Portanto, os músculos do grupo controle foram co-transfectados com o vetor vazio e/ou *dnAkt* (dominante negativo de Akt) ou com o vetor vazio e/ou *mkp1* (fosfatase que inibe ERK1/2), ao passo que, os músculos do grupo experimental receberam os plasmídeos expressando mUcn2 e/ou *dnAkt*, ou ainda mUcn2 e/ou *mkp1* conforme esquema representado na Figura 5.

A superexpressão *in vivo* por 14 dias da Ucn2 (Figura 32A) e a co-transfecção com *dnAkt* (Figura 32B) e *mkp1* (Figura 32C) parecem atenuar a inclinação da curva durante o desenvolvimento da fadiga muscular, avaliada em quatro períodos de tempo de estimulação (1º, 4º, 7º e 10º contrações musculares) quando comparados com os seus respectivos grupos controle. De fato, a Ucn2 foi capaz de aumentar a resistência à fadiga em músculos *tibialis anterior*, uma vez que a superexpressão desse peptídeo por 14 dias reduziu a **perda de força tetânica** entre a 1ª e a 10ª contrações (Figura 33A), bem como a **perda de força tetânica máxima** pós-fadiga (Figura 33B). Esses mesmos efeitos foram obtidos quando Akt foi

bloqueada, todavia, a inibição da atividade de ERK1/2 aboliu o efeito benéfico promovido pela Ucn2 na função muscular (Figuras 33A e 33B, respectivamente).

Esses resultados demonstram que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias aumenta a força muscular e a resistência à fadiga em *tibialis anterior* de camundongos normais e que esses efeitos funcionais parecem ser mediados por ERK1/2, independentes de Akt.

Figura 32. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias (A) e/ou *dnAkt* (B) e/ou *mkp1* (C) na força tetânica durante o desenvolvimento de fadiga muscular avaliada em quatro períodos de tempo (1º, 4º, 7º e 10º contrações musculares) em *tibialis anterior* de camundongos normais. A força muscular específica está expressa em millinewtons (mN) por miligrama (mg) de músculo. Os resultados são expressos como média ± EPM (n=5).

Figura 33. Efeito da superexpressão *in vivo* por 14 dias da Ucn2 e/ou *dnAkt* e/ou *mkp1* na perda de força tetânica entre as 1ª e 10ª contrações (A) e na perda de força tetânica máxima (diferença entre os protocolos pré- e pós-fadiga) durante o desenvolvimento da fadiga muscular (B) em *tibialis anterior* de camundongos normais. A força muscular específica está expressa em millinewtons (mN) por miligrama (mg) de músculo. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle; # $p \leq 0,05$ vs pcDNA3.1+ + *dnAkt* + pway21-GFP; n=5).

4.8. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 no conteúdo proteico das miosinas de cadeia pesada de contração lenta e de contração rápida em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais

As fibras musculares esqueléticas são classificadas, basicamente, em dois tipos: fibras de contração lenta (tipo I - oxidativas) ou “*slow-twitch*” e fibras de contração rápida (tipo II - glicolíticas) ou “*fast-twitch*”. Segundo a expressão gênica das diferentes isoformas de miosinas de cadeia pesada (MYH, do inglês *myosin heavy chain*), as fibras musculares de contração rápida podem ser definidas como: fibras do tipo IIa (expressam o gene MYH2), IIx (expressam o gene MYH1) e IIb (expressam o gene MYH4, sendo este ausente em humanos). Além disso, é descrita a existência de fibras musculares híbridas, que expressam distintas isoformas de MYH (I/IIa, IIa/IIx, IIx/IIb) (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011; PETTE; STARON, 2000).

A modulação funcional positiva exercida pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 nos motivou a investigar uma possível mudança fenotípica do tipo de fibras musculares, fenômeno conhecido como “*shifting*”. A Figura 34A demonstra que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias reduziu a expressão do RNAm da MYHI (62%), sem alterar os níveis de expressão das demais isoformas investigadas, MYHIIa, MYHIIx e MYHIIb. Por outro lado, a Ucn2 aumentou a expressão do conteúdo proteico de MYH *slow* (~1,2x) e não alterou o conteúdo proteico da MYH *fast* (Figura 34B), corroborando os resultados obtidos para a expressão gênica das isoformas de MYH de contração rápida. A redução da expressão gênica da MYHI associada ao aumento do conteúdo proteico de MYH *slow*, sugere inibição da degradação dessa proteína pela Ucn2, o que pode explicar, ao menos em parte, o aumento da força e a resistência à fadiga musculares observados em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados com o peptídeo por 14 dias.

Figura 34. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias nos níveis de RNAm de MYHI, MYHIIa, MYHIIX e MYHIIb (A) e no conteúdo proteico de MYH *slow* e MYH *fast* (B) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados por 14 dias. Os valores da densitometria das proteínas avaliadas encontram-se expressos no gráfico (C). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. (* $p \leq 0,05$ vs controle) (n=5-7).

4.9. Efeito da superexpressão *in vivo* da Ucn2 na área de secção transversa das fibras musculares e no conteúdo proteico da MYH IIa e MYH IIx/IIb

Com o propósito de investigar mais detalhadamente se, de fato, a Ucn2 é capaz de promover o fenômeno de “*shifting*” no fenótipo das fibras musculares, foi proposto mensurar o conteúdo proteico das fibras do tipo IIa e fibras híbridas IIx/IIb em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados com Ucn2 por 14 dias. Para isso, realizou-se o ensaio de imunofluorescência com a utilização de anticorpo anti-distrofina para medida da área de secção transversa e, assim, classificar a distribuição das fibras musculares segundo seu diâmetro. A marcação com anticorpo anti-MYH IIa tem por finalidade quantificar o padrão de distribuição de fibras do tipo IIa e, conseqüentemente, as fibras sem marcação (cor preta) representam fibras do tipo híbridas (IIx/IIb) nos músculos *tibialis anterior* controles e experimentais (Figura 35).

Figura 35. Imagens macroscópicas (40X) de cortes transversais de músculos *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados *in vivo* com o plasmídeo expressando o vetor vazio pcDNA 3.1+ (controle) ou mUcn2 por 14 dias (n=7). Dys = distrofina, MYH IIa = *myosin heavy chain type IIa*.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Estudos demonstram que tanto a Ucn2 quanto o seu receptor específico CRF2R, encontram-se altamente expressos na musculatura esquelética (REYES *et al.*, 2001; SAMUELSSON *et al.*, 2004) sendo, portanto, plausível considerar que este peptídeo tenha alguma importância fisiológica no controle da massa muscular. Embora já tenha sido evidenciado que a administração sistêmica de agonistas do CRF2R seja capaz de modular a massa muscular, sobretudo suprimindo a perda de massa em alguns modelos atroficos, o papel de seu agonista seletivo Ucn2 no controle do metabolismo de proteínas diretamente na musculatura esquelética ainda não foi explorado. Assim, neste trabalho, o efeito direto da Ucn2 no tecido muscular foi investigado com a utilização de métodos, como a transfecção *in vivo* com o plasmídeo codificado para o gene mUcn2 e a incubação *in vitro* de músculos isolados com o peptídeo, que excluíram as ações sistêmicas que poderiam ser desencadeadas pela Ucn2.

Inicialmente, para validar a técnica de eletroporação *in vivo* e caracterizar nosso modelo experimental, a superexpressão da Ucn2 por 7 e 14 dias em músculos *tibialis anterior* de camundongos foi confirmada através do aumento expressivo dos seus níveis de RNAm (Figura 7). Em seguida, observou-se que o peptídeo estava localizado, principalmente, ao redor das células musculares sugerindo que a Ucn2 foi sintetizada e exportada para o meio extracelular, podendo assim exercer suas ações biológicas também em miócitos vizinhos (Figura 8). De fato, além de promover uma marcante hipertrofia em músculos *tibialis anterior* (33%) (Figura 11), a superexpressão *in vivo* da Ucn2 por 14 dias induziu fenótipo semelhante em músculo EDL (23%), localizado adjacente ao *tibialis anterior*, reforçando a ação autócrina/parácrina deste peptídeo. Assim, além de controlar a massa muscular sob condições fisiológicas, nossos dados demonstram que a transfecção da Ucn2 *in vivo* atenuou a perda da

massa muscular em *tibialis anterior* de camundongos submetidos ao modelo catabólico de desnervação motora isquiática por 14 dias. Nossos achados corroboram aqueles obtidos por Hinkle *et al.* (2003b, 2004), os quais demonstraram que o tratamento sistêmico com Ucn2 provocou discreta hipertrofia e redução da atrofia induzida pela desnervação motora tanto em músculos glicolíticos (EDL e *tibialis anterior*) quanto em músculo oxidativo (*soleus*) de ratos e camundongos. Ainda, esse mesmo grupo demonstrou que a Ucn2 *in vitro* é capaz de aumentar os níveis intracelulares de AMPc em músculos isolados *tibialis anterior* e gastrocnêmio medial de camundongos normais (HINKLE *et al.*, 2003). Considerando que nada se avançou acerca da participação deste mediador nos efeitos biológicos da Ucn2, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar os possíveis mecanismos moleculares intracelulares responsáveis pelas ações hipertrófica e antiatrófica promovidas pela Ucn2 em músculos esqueléticos de roedores.

Demonstramos no presente trabalho que a Ucn2 promove hipertrofia, melhora a função e previne a perda de massa muscular esquelética e estas ações foram associadas à estimulação da via de sinalização canônica AMPc/PKA/CREB e à via da insulina/IGF-1, sabidamente a principal via envolvida com o controle do metabolismo de proteínas na musculatura esquelética.

5.1. A Ucn2 e a regulação da síntese de proteínas na musculatura esquelética

Nossos dados demonstram que a hipertrofia do músculo *tibialis anterior* de camundongos normais induzida pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 está associada ao aumento do conteúdo de AMPc muscular, bem como das atividades de PKA e CREB neste tecido. O nosso laboratório, por sua vez, tem se dedicado ao estudo dos efeitos do AMPc no metabolismo proteico muscular através da investigação, por exemplo, das ações de novos

peptídeos que agem por meio deste segundo mensageiro intracelular. Embora estudos mostrem que o AMPc atue como mediador dos efeitos hipertróficos induzidos pelo tratamento sistêmico com agonistas adrenérgicos $\beta 2$ (KOOPMAN *et al.*, 2010, BEITZEL *et al.*, 2007), o envolvimento de seus efetores intracelulares *downstream* nesse evento fenotípico ainda é foco de intensa investigação.

Interessante que além da via de sinalização canônica AMPc/PKA/CREB, a Ucn 2 também estimulou componentes fundamentais da via clássica da insulina/IGF-1. Nosso trabalho é o primeiro a demonstrar que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 modula positivamente Akt e ERK1/2 (Figuras 17 e 22, respectivamente), bem como os alvos *downstream* destas quinases responsáveis pela indução da síntese proteica como mTOR/S6 e eIF4E, respectivamente, (Figuras 18, 19 e 21), sugerindo um aumento da sensibilidade à insulina em músculos *tibialis anterior* transfectados com Ucn2. Vale destacar que, ao contrários dos nossos achados, Chao *et al.* (2005) demonstraram que a Ucn2 promovia diminuição nos níveis de fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) e IRS-1 (Tyr⁶⁰⁸), bem como redução da captação de glicose em células musculares diferenciadas incubadas com insulina, sendo possível que estes efeitos sejam dependentes de AMPc e mTOR. Por outro lado, o estado de fosforilação de Akt e a captação de glicose induzida por PDGF (*platelet-derived growth factor*), não foram alterados em miotubos C2C12 na presença de Ucn2 (CHAO *et al.*, 2015). Também Chen *et al.* (2006) demonstraram que animais *knockout (whole body)* para Ucn2 eram mais sensíveis à insulina quando comparados aos animais selvagens e, em cultura primária de células musculares de camundongos, relataram que a Ucn2 reduziu a captação de glicose estimulada pela insulina concomitante à diminuição da fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) e ERK1/2 (Thr^{202/204}/Tyr^{185/187}). Essa divergência de resultados pode ser explicada pelas diferenças das abordagens experimentais, sendo utilizada em nosso trabalho uma técnica de engenharia genética para superexpressão *in vivo* da Ucn2, ao passo que os demais estudos

utilizaram uma abordagem farmacológica em cultura de células imortalizadas para avaliar o efeito *in vitro* da Ucn2 no estado de fosforilação dos componentes da via da insulina/IGF-1.

Embora tenha sido sugerido que os efeitos musculares anabólicos promovidos pela Ucn2 possam ser mediados por efetores alternativos aos da proteína Akt, esta hipótese foi refutada em nosso trabalho. Além de relatarmos que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 foi capaz de aumentar tanto a fosforilação de Akt em resíduos de Ser⁴⁷³ e Thr³⁰⁸ quanto de ERK1/2 em resíduos de Thr^{202/204}/Tyr^{185/187} (Figuras 17 e 22, respectivamente), demonstramos através da técnica de manipulação genética *in vivo*, que as quinases Akt e ERK1/2 são mediadoras do efeito hipertrófico induzido pela superexpressão da Ucn2, já que a inibição endógena destas, isoladamente, aboliu o efeito hipertrófico do peptídeo em *tibialis anterior* de camundongos normais (Figura 25). Corroborando nossos dados, Walther *et al.* (2014) demonstraram que a inibição farmacológica da PI3K reduziu a fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³ e Thr³⁰⁸) induzida pela Ucn2 em cultura de cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos, evidenciando a participação desta quinase nos efeitos benéficos mediados por este peptídeo no coração. Ademais, Brar *et al.*, 2004 mostraram que cardiomiócitos isolados de camundongos adultos *knockout* para CRF2R eram menos resistentes à injúria induzida pelo modelo de isquemia/reperfusão quando comparados aos cardiomiócitos isolados de animais selvagens. Além disso, também demonstraram que o antagonista seletivo do receptor CRF2R, astressina-2B, bem como a inibição farmacológica de ERK1/2, aboliram o efeito cardioprotetor promovido pelas Ucn2 e Ucn3. Outros estudos também mostram que os efeitos cardioprotetores promovidos pelas Ucn1 e Ucn2 estão associados à estimulação de ERK1/2 (CHANALARIS *et al.*, 2003; ROUX *et al.*, 2004).

É sabido que a fosforilação de Akt em resíduos de Thr³⁰⁸, pela proteína PDK1, é essencial para sua atividade catalítica (ALESSI *et al.*, 1997). No entanto, para sua estabilização e atividade máxima é essencial uma segunda fosforilação de Akt em resíduos de

Ser⁴⁷³, realizada pelo complexo 2 de mTOR (mTORC2). Agora ativa, Akt se desliga da membrana e se transloca para o citoplasma ou núcleo, podendo então fosforilar diversas proteínas-alvo (SARBASSOV *et al.*, 2005). A atividade catalítica de mTORC2 é estimulada por fatores de crescimento, como IGF-1, de uma maneira dependente da PI3K (HUANG *et al.*, 2008; SARBASSOV *et al.*, 2005). Considerando que a superexpressão *in vivo* da Ucn2 promoveu aumento da fosforilação do receptor de IGF-1, pode-se especular que a Ucn2 induza o incremento das concentrações intracelulares de IGF-1, com consequente ativação de mTORC2, o que poderia explicar a fosforilação de Akt em resíduos de Thr³⁰⁸. Por outro lado a redução no estado de fosforilação do receptor de insulina, sugere que a fosforilação de Akt em resíduos de Ser⁴⁷³, induzida pela Ucn2, ocorra provavelmente por ativação da cascata de sinalização via proteína G_{αs} e AMPc. Embora sejam escassas as evidências de como o AMPc pode levar à fosforilação e ativação da Akt, estudos *in vitro* demonstraram que a proteína Epac (efetor *downstream* do AMPc), via ativação da PI3K, promove fosforilação e ativação da Akt em músculos esqueléticos de ratos normais (BAVIERA *et al.*, 2010). Em concordância, nossos dados sugerem o recrutamento de efetores *downstream* do AMPc, como PKA e Epac, nos efeitos metabólicos promovidos pela Ucn2 *in vivo* corroborando dados da literatura que demonstram que a atenuação da necrose em músculo de camundongos *mdx* tratados sistemicamente com Ucn2 parece estar associada ao aumento da atividade das proteínas Epac e PKA (REUTENAUER-PATTE *et al.*, 2012).

Embora os resultados deste trabalho demonstrem que a Ucn2 seja capaz de ativar Akt após 7 dias de transfecção, o estado de fosforilação desta quinase não foi modificado no período mais prolongado de superexpressão do peptídeo (14 dias). Foi demonstrado na literatura que o aumento dos níveis de fosforilação de Akt e Foxo3, induzido pela epinefrina, foi abolido pelo 6-BNZ-AMPc, um ativador específico da PKA, ao passo que, estas modificações pós-traducionais da epinefrina em Akt e Foxo3 foram aumentadas na presença

de H89, um inibidor farmacológico da PKA, em músculos EDL de ratos normais (BAVIERA *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que a PKA pode limitar o efeito estimulatório do AMPc na via Akt/Foxo3, ou seja, a hiperatividade de PKA parece modular negativamente a proteína Akt, o que poderia explicar pelo menos em parte o retorno do estado de fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) aos níveis do grupo controle após 14 dias de transfecção quando comparado ao período mais agudo de transfecção (7 dias) em músculos *tibialis anterior* de camundongos normais (Figura 17).

Além de promover ativação de Akt, foi demonstrado que a proteína Epac pode ativar ERK1/2 através da estimulação de Ras em cultura de células HEK-293 (KEIPER *et al.*, 2004). Dessa forma, nossos achados sugerem que a proteína Epac pode ser a mediadora do *cross-talk* entre a via de sinalização canônica da Ucn2 (AMPc/PKA/CREB) e a via da insulina/IGF-1, promovendo assim a ativação indireta de Akt e ERK1/2. Contrastando com essa hipótese, a inibição farmacológica da enzima adenilil ciclase não foi capaz de suprimir a atividade de ERK1/2 induzida pelas Ucn2 e Ucn3 em cultura primária de cardiomiócitos camundongos neonatos (BRAR *et al.*, 2004), sugerindo que a estimulação destas MAPKs, e até mesmo de Akt, pela Ucn2 em nosso modelo experimental pode não ser mediada apenas por Gas/AMPc/Epac, podendo envolver também a participação, por exemplo da subunidade G $\beta\gamma$. De fato, em cultura de células COS-7 (fibroblastos renais de macaco) transfectadas com uma forma mutante da proteína Ras, demonstrou-se que a subunidade G $\beta\gamma$ está envolvida também com a estimulação de ERK1/2 (KOCH *et al.*, 1994). Outros estudos também demonstraram que a estimulação destas MAPKs envolve a participação do dímero G $\beta\gamma$ (FAURE *et al.*, 1994; CRESPO *et al.*, 1994) sendo, talvez, outro possível mecanismo através do qual a Ucn2 promova ativação de ERK1/2, de uma maneira independente de insulina.

Corroborando as ações biológicas desencadeadas pela Ucn2 através da ativação do CRF2R na musculatura esquelética, a estimulação de receptores β 2 adrenérgicos pelo

formoterol também é capaz de promover efeito hipertrófico associado à ativação de Akt de uma maneira dependente de mTOR (KLINE *et al.*, 2007). Foi também proposto que os agonistas $\beta 2$ adrenérgicos sejam capazes de ativar diretamente Akt, provavelmente através de um mecanismo que envolva a subunidade $G\beta\gamma$ (KLINE *et al.*, 2007) que, por sua vez, pode se ligar diretamente às proteínas PI3K nas subunidades heterodiméricas $p110\beta$ ou $p110\gamma$, promovendo assim sua ativação (SCHWINDINGER; ROBISHAW, 2001). Sendo assim, é aceitável especular que a ligação do agonista seletivo Ucn2 ao CRF2R, sabidamente um receptor da família GPCR, promova a formação do complexo $G\beta\gamma$ /PI3K, com consequente ativação de Akt.

Foi demonstrado marcante crescimento muscular em camundongos transgênicos que expressavam uma isoforma constitutivamente ativa de Akt (MAMMUCARI *et al.*, 2007) sendo, portanto, bem estabelecido que a proteína Akt é um potente ativador da maquinaria de síntese proteica por meio da estimulação da cascata mTOR/p70S6K/S6 (NADER, 2005). Além disso, as ERK1/2 estão sendo consideradas como importantes reguladoras do metabolismo muscular esquelético, tendo em vista o seu envolvimento no processo de diferenciação e sobrevivência de miotubos C2C12 (JONES *et al.*, 2001; YOKOYAMA *et al.*, 2007), bem como na indução da hipertrofia cardíaca em camundongos (BUENO *et al.*, 2000; UEYAMA *et al.*, 2000).

É reconhecido que ambas as cascatas de sinalização ativadas por Akt (MANNING *et al.*, 2002) e MEK/ERK (MA *et al.*, 2007) estão envolvidas com a ativação do complexo 1 de mTOR (mTORC1) através da fosforilação e inibição de seu repressor TSC2. Ademais, estudos demonstram que a inibição de mTOR pela rapamicina é uma maneira eficaz de reduzir o crescimento muscular (PALLAFACCHINA *et al.*, 2002; IZUMIYA *et al.*, 2008). Nesse sentido, nossos achados indicam que o aumento nas taxas de síntese proteica decorrente da superexpressão *in vivo* da Ucn2 (Figura 24) envolve a co-participação de Akt e ERK1/2,

que por sua vez, regulam cascatas de sinalização sinérgicas para a estimulação de mTOR, com consequente ativação de seus alvos *downstream*, S6 e eIF4E, marcadores de síntese proteica, promovendo assim a indução do crescimento muscular observado em *tibialis anterior* de camundongos normais. Em concordância com nossos resultados, Winter *et al.* (2011) demonstraram um incremento na ativação de mTOR por ambas as quinases, Akt e ERK1/2, uma vez que estas promovem a fosforilação de TSC2 em distintos resíduos de serina e treonina, suprimindo acentuadamente a sua atividade repressora em mTOR em cultura de fibroblastos de ratos. Evidências sugerem que a proteína RSK (*p90 ribossomal S6 kinase*), o primeiro substrato descrito de ERK1/2, seja a responsável por este efeito repressor em TSC2 (ROUX *et al.*, 2004; BALLIF *et al.*, 2005), culminando na modulação positiva da atividade de mTOR, com consequente ativação de p70S6K e S6.

5.2. A Ucn2 e a regulação da degradação de proteínas na musculatura esquelética

É bem instituído que o mecanismo fisiológico responsável pelo crescimento muscular ocorre, principalmente, pelo concomitante aumento da síntese associado à redução da degradação de proteínas (SANDRI, 2008). Em concordância, a superexpressão *in vivo* da Ucn2 também estimulou a cascata de sinalização Akt/Foxo1,3 em nosso modelo, uma das principais vias responsáveis pelo controle dos atrogenes e, assim, da degradação de proteínas, resultando na prevenção da perda de massa muscular.

A família dos fatores de transcrição Foxo é composta por quatro membros: FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6, sendo este último expresso principalmente no cérebro e fígado (VAN DER VOS; COFFER, 2011). Zhao *et al.* (2007) demonstraram que quando ativo, Foxo reconhece domínios específicos na região promotora de genes relacionados aos sistemas proteolíticos ubiquitina-proteassoma (atrogin-1 e MuRF1) e lisossomal/autofágico (LC3,

Gabarap e catepsina L), promovendo assim aumento da expressão destes atrogenes com consequente indução da proteólise muscular. Vale salientar que a atividade dos fatores de transcrição Foxo é regulada por uma complexa miríade de modificações pós-traducionais que envolve fosforilação, acetilação e/ou ubiquitinação resultando, dessa forma, em sua ativação ou inibição. Sabe-se que diversas proteínas quinases podem fosforilar Foxo em distintos resíduos de aminoácidos, alterando a sua interação com o DNA, localização nuclear e, consequentemente, sua atividade transcricional (TIKHANOVICH, COX e WEINMAN *et al.*, 2013).

É sabido que a proteína Akt ao fosforilar Foxo 1 (Ser²⁵⁶ e Thr²⁴) e Foxo 3 (Ser²⁵³ e Thr³²) promove a sua dissociação com o DNA, aumentando assim a interação destes fatores de transcrição com a proteína 14-3-3, que por sua vez, transloca Foxo do núcleo para o citoplasma, resultando em sua inativação (XIE, CHEN e YUAN, 2012). Demonstramos neste trabalho que a superexpressão *in vivo* da Ucn2, através da ativação de Akt, induziu modificações pós-traducionais inibitórias em Foxo 1 (Ser²⁵⁶) e Foxo 3 (Thr³²) (Figura 27) associadas à supressão da atividade transcricional destes, avaliada pelo ensaio duplo do repórter da luciferase (Figura 28). Ademais, considerando que a fosforilação de FOXO1 em resíduos de Ser²⁵⁶ pode induzir sua poliubiquitinação (HUANG *et al.*, 2005), nossos resultados sugerem que Foxo1 está sendo degradado pelo proteassoma, pois embora a sua expressão gênica tenha sido reduzida pela Ucn2 esse efeito foi associado ao aumento dos níveis de fosforilação (Ser²⁵⁶) concomitante à redução do conteúdo proteico de Foxo1 (Figura 27). Outra possibilidade de modulação pós-traducional inibitória da atividade de Foxo também foi testada em nosso trabalho. Yang *et al.*, (2008) demonstraram *in vitro* que a fosforilação de Foxo3 em resíduos de Ser^{294;344;425} pelas ERK1/2, promove sua associação à Ub-ligase MDM2 que, por sua vez, direciona este fator de transcrição para degradação pelo proteassoma 26S. Contudo, a ação repressora da atividade transcricional de Foxo3 pela Ucn2

parece não envolver a participação das MAPKs, uma vez que houve redução da fosforilação de Foxo3 (Ser²⁹⁴) e não foram encontradas alterações na expressão gênica e no conteúdo proteico deste fator de transcrição (Figura 27).

Não podemos excluir a participação da via de sinalização canônica, AMPc/PKA/CREB na possível inibição da atividade transcricional de Foxo *in vivo*, culminando na redução na degradação de proteínas em músculos *tibialis anterior* transfectados com Ucn2. Em conformidade com nossa hipótese, evidências sugerem que a ativação de receptores β -adrenérgicos suprimem a atividade de FoxO (YIMLAMAI *et al.*, 2005), bem como reduzem a expressão gênica de MuRF1 e atrogin-1 em músculos de ratos normais e atroficos (KLINE *et al.*, 2007). Já demonstramos que a incubação com um análogo não-hidrolisável deste nucleotídeo (dibutiril-AMPc), bem como com catecolaminas ou um inibidor das fosfodiesterases que degradam o AMPc (isobutilmetilxantina, IBMX), inibiu a proteólise em músculos de ratos normais (NAVEGANTES *et al.*, 2000; 2001). Ademais, Gonçalves *et al.* (2009) demonstraram *in vitro* que a ativação de Akt pelo AMPc estava associada à inibição da atividade do sistema UbP em músculos esqueléticos. Corroborando estes achados, outro estudo de nosso laboratório, comprovou que o aumento do AMPc induzido pelo rolipram, um inibidor seletivo da fosfodiesterase do tipo 4, exerce efeito inibitório na expressão de genes relacionados à atrofia muscular, com consequente redução da proteólise em músculos EDL de ratos (LIRA *et al.*, 2011). Portanto, é razoável especular que a elevação do conteúdo de AMPc muscular estimulado pela Ucn2, poderia ser um dos mecanismos reguladores responsáveis pela prevenção da degradação excessiva de proteínas na musculatura esquelética.

Sabe-se que a PKA é considerada a mediadora clássica de grande parte dos efeitos metabólicos desencadeados pela cascata do AMPc. Mais recentemente, o nosso grupo tem fornecido as primeiras evidências na literatura mostrando que a estimulação farmacológica

específica da PKA também é capaz de inibir a proteólise muscular em condições normais e atróficas (BAVIERA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2014). Músculos EDL de ratos normais incubados com 6-BNZ-AMPC, um ativador específico da PKA, apresentaram redução da atividade do sistema UbP associado a redução da expressão gênica de MuRF1 e ao incremento no estado de fosforilação de CREB (Ser¹³³) e Foxo 1 (Ser²⁵⁶), sem alterar Akt (Ser⁴⁷³) (SILVEIRA *et al.*, 2014). Este trabalho de nosso grupo foi o primeiro a demonstrar que Foxo1 pode ser um substrato direto da PKA na musculatura esquelética, corroborando os resultados de Lee *et al.* (2011) que mostraram que a PKA pode fosforilar e inibir diretamente a atividade transcricional de Foxo1 em células vasculares aórticas endoteliais.

Além dos eventos pós-traducionais de fosforilação de Foxo supracitados, sabe-se que estes fatores de transcrição também podem ser regulados negativamente por mecanismos de acetilação. Muito pouco se conhece acerca das ações biológicas de CREB no metabolismo de proteínas na musculatura esquelética, mas já foi demonstrado que os co-ativadores de CREB, a proteína CBP (CREB binding protein) e seu parálogo p300, podem se ligar diretamente à Foxo, inativando-o. Ademais, a acetilação de Foxo1 pela histona acetiltransferase CBP em resíduos de lisina 242 e 245 *per se* já é capaz de reduzir a sua atividade transcricional (TIKHANOVICH, COX e WEINMAN, 2013). Em contrapartida, a desacetilação de Foxo pelas histonas deacetilases de classe II (HDACS) aumentam sua interação com o DNA e, portanto, intensificam sua atividade transcricional (TIKHANOVICH, COX e WEINMAN 2013; CALNAN e BRUNET, 2008). Em nosso modelo experimental, a superexpressão *in vivo* da Ucn2 induziu aumento da atividade de CREB, inferida pelo incremento da expressão de seus genes-alvo Sik1 e PGC-1 α (Figura 16). Estudos demonstram que Sik1 está envolvido na inibição das HDACS (STEWART *et al.*, 2012), com consequente redução da expressão das Ub-ligases (MCKINSEY *et al.*, 2000), provavelmente por reprimir a deacetilação e,

assim, inibir a atividade de Foxo. PGC-1 α , por sua vez, além de bem estabelecido o seu envolvimento na biogênese mitocondrial, também está associado à atenuação da perda de massa muscular em modelos de atrofia como desnervação motora e jejum (SANDRI *et al.*, 2006). Um dos mecanismos propostos para este efeito antiatrófico exercido por PGC-1 α , consiste no fato de que este co-ativador pode reduzir a interação de Foxo3 com a região promotora de seus genes-alvo, culminando na redução da transcrição dos atrogenes (atrogin-1 e MuRF1) e, conseqüentemente, na inibição da degradação de proteínas (SANDRI *et al.*, 2006; BRAULT, JESPERSEN e GOLDBERG, 2010).

Dessa forma, além da participação direta das quinases Akt e PKA nas modificações pós-traducionais de fosforilação de Foxo em nosso modelo experimental, é possível que estes fatores de transcrição também estejam sendo regulados indiretamente por CREB através de mecanismos de acetilação ou ainda pela ação inibitória exercida por PGC-1 α , tendo em vista o aumento do seu conteúdo proteico em músculos transfectados com Ucn2 (Figura 16). Esses possíveis eventos bioquímicos podem ajudar a explicar a regulação negativa da atividade transcricional de Foxo induzida pela superexpressão *in vivo* da Ucn2, resultando na supressão de genes relacionados à atrofia muscular. De fato, observamos redução na expressão gênica de atrogin-1 e LC3 em *tibialis anterior* de camundongos normais transfectados com Ucn2 (Figura 28). É consenso que a exacerbação da degradação de proteínas característica de quadros de catabolismo muscular envolve a participação dos genes autofágicos (LC3 e Catepsina L) (ZHAO *et al.*, 2007) e, principalmente, das E3 ligases, sendo atrogin-1 essencial para indução da atrofia muscular em modelos de desnervação motora (BODINE *et al.*, 2001; SANDRI *et al.*, 2004). Assim, podemos sugerir que o efeito antiatrófico promovido pela Ucn2 envolve a participação das vias AMPc/PKA/CREB e Akt/Foxo1,3 com conseqüente redução da atividade transcricional de Foxo e, assim da expressão de atrogin-1 e LC3 sendo, portanto, um possível mecanismo proposto para a prevenção da perda de massa muscular

induzida pela superexpressão da Ucn2 em *tibialis anterior* de camundongos submetidos à desnervação motora isquiática.

O fato da Ucn2 suprimir a expressão gênica da E3 ligase atrogin-1 e do marcador autofágico LC3 sugere uma redução na degradação de proteínas, hipótese esta confirmada através de estudos realizados *in vitro* em músculos isolados. Corroborando o efeito antiatrófico promovido pela Ucn2 *in vivo* no modelo de desnervação motora, músculos *soleus* e EDL de ratos e camundongos normais incubados com Ucn2 apresentaram redução da proteólise total, a qual representa a taxa de degradação total de proteínas derivada da ação das proteases intracelulares (Figura 29). A incubação de músculos *soleus* e EDL com IBMX, droga que inibe as fosfodiesterases do AMPc, e por conseguinte também promove aumento do AMPc intracelular, levou a uma redução da proteólise total sugerindo que o AMPc é o mediador central dos efeitos de ambas as drogas e, portanto, especula-se a participação deste segundo mensageiro intracelular na prevenção da degradação de proteínas promovida pela Ucn2 nestes músculos. No entanto são necessários outros experimentos para confirmar essa hipótese. Interessante que, tratando-se de ratos, músculos com predominância de fibras glicolíticas (tipo II), como *tibialis anterior* e EDL, parecem ser mais sensíveis às ações antiproteolíticas da Ucn2 *in vitro* quando comparados àqueles que predominam as fibras oxidativas (tipo I), como o músculo *soleus*. Por outro lado, apesar da Ucn2 utilizada para estes experimentos ser extraída de camundongos, apenas músculos *soleus* de camundongos foram sensíveis à ação antiproteolítica da Ucn2 *in vitro*. Não são conhecidos os motivos de tais variações em nossos achados, mas podemos especular que existam diferenças na densidade de receptores CRF2R, bem como modulações pós-traducionais destes, dependendo da distribuição do tipo de fibra muscular e espécie estudadas. Curiosamente, o efeito antiproteolítico da Ucn2 *in vitro* não foi observado em músculos EDL de ratos submetidos ao jejum de 48h, contrastando ao efeito antiatrófico de agonistas do CRF2R nos modelos

catabólicos de desnervação, tratamento com corticoesteróide e desuso (HINKLE *et al.*, 2003a; HINKLE *et al.*, 2003b; HINKLE *et al.*, 2004). Essa inconsistência pode ser explicada pelo fato de que a maioria destes trabalhos utilizou agonistas não-seletivos para o CRF2R, cuja administração sistêmica pode ter acarretado ações biológicas em outros tecidos, com consequente viés na interpretação dos efeitos da Ucn2 na musculatura esquelética nesses modelos experimentais. Além disso, foi demonstrado que os glicocorticóides podem aumentar a expressão do RNAm da Ucn2 em células neuronais (CHEN, VAUGHAN e VALE, 2003) e, portanto, no modelo de jejum por 48h, sabidamente indutor positivo da síntese e secreção de corticoesterona, podemos especular que houve um possível aumento da expressão muscular da Ucn2 induzido por esse hormônio o que pode ter promovido redução da sensibilidade do CRF2R à ação da Ucn2 acrescida ao meio de incubação, impedindo dessa forma, a sua modulação inibitória na degradação proteica em músculos EDL de ratos (Figura 29). Essa hipótese é corroborada por HAUGER *et al.* (2013) que demonstraram que a ativação do receptor CRF2R em células HEK293 transfectadas com Ucn2, Ucn3 ou CRF resulta na fosforilação, internalização e consequente inativação do receptor de uma maneira proporcional à seletividade do agonista.

Demonstramos que o efeito antiproteolítico promovido pela Ucn2 *in vitro* ocorre através da supressão da atividade do sistema proteolítico lisossomal (Figura 30), corroborando nossos achados *in vivo* que mostram que a Ucn2 parece exercer seu efeito antiatrófico através da inibição da autofagia, hipótese inferida inicialmente por meio da redução da expressão do gene autofágico LC3 em músculos transfectados com Ucn2 (Figura 28). É conhecido que a forma lipídica LC3-II é responsável pela formação e expansão da membrana dupla do autofagossomo, sendo considerada um marcador de indução da formação do autofagossomo e, conseqüentemente do fluxo autofágico. Adicionalmente, avaliamos outro marcador lisossomal, a p62/SQTM1, que por sua vez, se liga à LC3-II sendo preferencialmente

degradado pelo lisossomo (BJORKOY *et al.* 2005). Dessa forma, em condições caracterizadas pela inibição do processo lisossomal/ autofágico, ocorre acúmulo das proteínas p62 e LC3-II. Inversamente, situações que estimulam a atividade da via autofágica são geralmente caracterizadas pela degradação destas proteínas pelo lisossomo como demonstrado no trabalho de Zhao *et al.* (2007) em que o bloqueio do fluxo autofágico com concanamicina promoveu acúmulo de LC3 e Gabarapl1 em miotubos que expressavam uma isoforma de FoxO3 constitutivamente ativa quando comparados ao grupo controle, indicando aumento do fluxo autofágico induzido por Foxo3. Portanto, em nosso modelo experimental, a redução da atividade transcricional de Foxo relacionada à supressão gênica de LC3 e ao aumento do conteúdo proteico da forma lipídica LC3-II (Figura 31), concomitante com a ausência de alterações na expressão gênica de p62 associada ao incremento do seu conteúdo proteico (Figura 31), sugerem que a Ucn2 *in vivo* exerça uma regulação inibitória no processo lisossomal/autofágico na musculatura esquelética.

5.3. A Ucn2 e a regulação da função e da plasticidade das fibra musculares

A hipertrofia promovida pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 melhorou a função muscular, uma vez que, foi capaz de atenuar a perda de força entre a 1ª e 2ª contrações tetânicas em músculos *tibialis anterior* (Figura 33), indicando que estes estão mais resistentes à fadiga induzida pelo estresse mecânico. Corroborando esses achados, dados da literatura demonstram que a ativação farmacológica sistêmica do CRF2R exerceu efeito hipertrófico em músculos gastrocnêmio medial, *plantaris* e soleus concomitante ao aumento da força de contração isométrica em músculos *triceps surae*, além de prevenir a perda de força e a degeneração progressiva do músculo diafragma de animais *mdx* quando comparados com os animais controles (REUTENAUER-PATTE *et al.*, 2012; HINKLE *et al.*, 2007).

Curiosamente a inibição de ERK1/2, mas não de Akt, aboliu o efeito benéfico da Ucn2 na função muscular (Figura 33). É notório que estas MAPKs são capazes de regular a atividade de vários fatores de transcrição nucleares como, por exemplo, os envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação celulares (PARKINGTON *et al.*, 2004), embora o seu papel no controle da massa muscular ainda seja pouco conhecido. É considerável especular que as ERK1/2 são necessárias para a magnitude da força em músculos transfectados com Ucn2, haja vista que a atividade destas quinases pode ser alterada em resposta a estressores locais, como a contração muscular (WIDEGREN, RYDER e ZIERATH, 2001). Além disso as ERK1/2 podem controlar a expressão de genes das subunidades do AChR na junção neuromuscular (TANSEY *et al.*, 1996) e, considerando que o incremento no *turnover* de AChRs no modelo atrofico de desnervação foi associado à maior interação entre MuRF-1 e Bif-1 (fator regulador da autofagia) (RUDOLF *et al.*, 2013) é plausível especular que as ações antiatrófica e antiautofágica da Ucn2 podem ter um impacto positivo na manutenção da placa motora, promovendo dessa forma, melhora na função muscular, bem como sendo capaz de participar do processo de remodelamento das sinapses musculares em músculos desnervados.

Apesar de já ter sido demonstrado que a Ucn2 administrada sistemicamente pode aumentar a força muscular, este é o primeiro trabalho que mostra um aumento da resistência à fadiga associado ao “shifting” do fenótipo de fibras musculares esqueléticas induzidos pela Ucn2 *in vivo*. Muito pouco se conhece sobre a regulação e possíveis mecanismos moleculares que determinam o tipo de fibra muscular esquelética. Há porém, estudos que demonstram que PGC-1 α está envolvido na formação de miofibrilas oxidativas (tipo I) (LIN *et al.*, 2002) e, de fato, a sua expressão é maior em músculos com predominância de fibras do tipo I quando comparados àqueles constituídos principalmente por fibras do tipo II. Handschin *et al.* (2007) demonstram que animais *knockout* para PGC-1 α na musculatura esquelética apresentaram

mudança de tipo de fibras oxidativas (I e IIa) para glicolíticas (IIx e IIb). As fibras do tipo I, por sua vez, apresentam elevada densidade mitocondrial e capilar e alta capacidade oxidativa quando comparadas às fibras glicolíticas (tipo II), cujas características as conferem, dentre outras propriedades, reduzida velocidade de contração e maior resistência à fadiga muscular (TALBOT; MAVES, 2016). Em conformidade, embora fora observada redução da expressão gênica de MYHI (Figura 34), a superexpressão *in vivo* da Ucn2 promoveu aumento do conteúdo proteico de PGC-1 α (Figura 16) concomitante ao de MYH *slow* (Figura 34), sugerindo inibição da degradação desta proteína em *tibialis anterior* de camundongos normais. Recentemente, foi demonstrado que a Ub-ligase atrogin-1 pode interagir com as miosinas de cadeia pesada e, assim direcioná-las para degradação pelo proteassoma 26S (LOKIREDDY *et al.*, 2011). Portanto, a redução da expressão gênica de atrogin-1 induzida pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 pode explicar, ao menos em parte, o maior conteúdo da MYH *slow* em músculos transfectados com a Ucn2, o que pode ter contribuído, pelo menos em parte, para o aumento da resistência à fadiga observado nestes músculos.

Considerando que foi avaliado o conteúdo proteico total de MYH *fast* por western blot, sem diferenciar a distribuição dos tipos de fibras IIa, IIx e IIb, é possível que essa técnica não tenha sido sensível o suficiente para detectar o “shifting” entre estes tipos de fibras. Assim, é essencial a análise das imagens de cortes transversais histológicos de *tibialis anterior* submetidos à técnica de imunofluorescência para marcação da MYH IIa (Figura 35), para a investigação mais fidedigna do impacto da Ucn2 na distribuição de fibras do tipo *fast*.

A constituição miofibrilar da musculatura esquelética pode impactar profundamente na fisiopatologia de inúmeras doenças, como por exemplo, no diabetes *mellitus* tipo II. Estudos demonstraram que indivíduos diabéticos tipo II apresentam maior densidade de fibras glicolíticas do que oxidativas quando comparados a indivíduos saudáveis (HE, WATKINS, KELLEY, 2001; TANNER *et al.*, 2002) e, esta diminuição na proporção de fibras do tipo I

está correlacionada à severidade da resistência à insulina em portadores de síndrome metabólica (STUART *et al.*, 2013). Estes achados são consistentes com os resultados do presente trabalho que demonstram que o aumento do conteúdo de fibras de contração lenta (tipo I, oxidativas) foi associado à estimulação da cascata de sinalização da insulina/IGF-1. No entanto, são necessários mais experimentos que comprovem o efeito da Ucn2 na aparente regulação da sensibilidade muscular a esses hormônios em nosso modelo experimental.

Demonstramos, portanto, que o aumento da massa muscular promovido pela superexpressão *in vivo* da Ucn2 denota relevância funcional, a qual pode ser explicada, pelo menos em parte, por alterações fenotípicas observadas no tipo de fibras musculares esqueléticas, sendo necessários mais estudos que auxiliem a desvendar os eventos moleculares através dos quais a Ucn2 impacta positivamente a função muscular.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A figura 36 ilustra um esquema representativo das possíveis sinalizações intracelulares envolvidas com as ações hipertrófica a antiatrófica da Ucn2 na musculatura esquelética de roedores. A investigação dos mecanismos moleculares regulados por esse peptídeo em nosso modelo experimental nos permite concluir que:

1. A superexpressão *in vivo* da Ucn2 promove hipertrofia pela ativação das vias de sinalização AMPc/PKA/CREB, AMPc/Epac, Akt/mTOR/S6, Akt/mTOR/4E-BP1 e ERK1/2/eIF4E com consequente estimulação da síntese proteica;
2. O bloqueio das cascatas de sinalização ativadas por Akt e ERK1/2 aboliu parcialmente o aumento da massa muscular, indicando que o efeito hipertrófico promovido pela Ucn2 *in vivo* é dependente dessas quinases;
3. O efeito antiproteolítico exercido pela Ucn2 *in vivo* envolve a participação da via de sinalização Akt/Foxo1,3 e AMPc/PKA com consequente supressão da atividade transcricional de Foxo e redução da expressão de atrogin-1 e LC3, sugerindo inibição dos sistemas proteolíticos UbP e lisossomal, respectivamente;
4. A Ucn2 exerce regulação inibitória na atividade do sistema proteolítico lisossomal *in vitro* em músculos EDL e suprime o fluxo autofágico *in vivo*, em parte por aumentar o conteúdo proteico de LC3-II e p62 em *tibialis anterior*;

5. A Ucn2 exerce uma modulação transitória e temporal nos componentes das vias de sinalização envolvidas em suas ações biológicas, cuja estimulação máxima parece ocorrer previamente às alterações fenotípicas observadas na musculatura esquelética;
6. O crescimento muscular promovido pela Ucn2 *in vivo* impactou positivamente na função muscular e parece estar relacionado ao “*shifting*” de fibras oxidativas (tipo I), provavelmente induzido por PGC-1 α ;
7. A sinalização de ERK1/2, mas não de Akt, é necessária para a melhora na resistência à fadiga induzida pela Ucn2 em *tibialis anterior* de camundongos submetidos ao estresse mecânico.

Apesar do principal mediador celular estimulado pela ativação do CRF2R seja o AMPc, nosso trabalho demonstra que vias de sinalização alternativas, independentes de PKA podem também ser ativadas pelo agonista seletivo Ucn2. Os eventos moleculares intracelulares recrutados pela Ucn2 resultaram em alterações fenotípicas de relevância funcional na musculatura esquelética, evidenciando novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atuem na proteção da massa muscular, extremamente importante para a saúde humana.

Figura 36. Esquema representativo dos possíveis mecanismos moleculares intracelulares regulados pela Ucn2 na musculatura esquelética. Setas vermelhas representam as etapas 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.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERSTROM, T.; VEDEL, K.; NEEDHAM, J.; HOJMAN, P.; KONTOU, E.; HELLSTEN, Y.; WOJTASZEWSKI, J. F. P. Optimizing hyaluronidase dose and plasmid DNA delivery greatly improves gene electrotransfer efficiency in rat skeletal muscle. **Biochem Biophys Rep**, v. 4, p. 342-350, 2015.

ALESSI, D.R.; JAMES, S.R.; DOWNES, C.P.; HOLMES, A.B.; GAFFNEY, P.R.; REESE, C.B.; COHEN, P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. **Curr Biol**, v. 7, p. 261–269, 1997.

APPELL, H. J. Muscular Atrophy Following Immobilisation: A Review. **Sports Med**, v. 10, n. 1, p.42-58, 1990.

BALE, T. L.; CONTARINO, A.; SMITH, G. W.; CHAN, R.; GOLD, L. H.; SAWCHENKO, P. E.; KOOB, G. F.; VALE, W. W.; LEE, K. F. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 410-414, 2000.

BALE, T. L.; HOSHIJIMA, M.; GU, Y.; DALTON, N.; ANDERSON, K. R.; LEE, K. F.; RIVIER, J.; CHIEN, K. R.; VALE, W. W.; PETERSON, K. L. The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: acute effects in murine heart failure. **PNAS**, v. 101, n. 10, p. 3697-3702, 2004.

BALLIF, B. A; ROUX, P. P.; GERBER, S. A; MACKEIGAN, J. P.; BLENIS, J.; GYGI, S. P. Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. **PNAS**, v. 102, n. 3, p. 667-672, 2005.

BATES, P. C.; MILLWARD, D. J. Myofibrillar protein turnover. **J Animal Sci**, v. 214, p. 587–592, 1983.

BAUMEISTER W WALZ J, ZUHL F, SEEMULLER E: The proteasome: Paradigm of a self compartmentalizing protease. **Cell**, v. 92, p. 367–380, 1998.

BAVIERA, A. M.; ZANON, N. M.; CARVALHO NAVEGANTES, L. C.; MIGLIORINI, R. H.; DO CARMO KETTELHUT, I. Pentoxifylline inhibits Ca^{2+} -dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 3, p. E702-8, Mar 2007.

BAVIERA, A. M.; ZANON, N. M.; NAVEGANTES, L. C. C.; KETTELHUT, I. C. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Mol Cell Endocrinol**, v. 315, p. 104–12, 2010.

BERDEAUX, R.; STEWART, R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303. n. 1, p. 1-17, 2012.

BECHET D.; TASSA, A.; TAILLANDIER D.; CONABRET L.; ATTAIX, D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 37, p. 2098-2114, 2005.

BEITZEL, F.; SILENCE, M.N.; LYNCH, G.S. Adrenoceptor signaling in regenerating skeletal muscle after agonist administration. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, p. E932–E940, 2007.

BIRKENKAMP, K. U.; COFFER, P. J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. **Biochem Soc Transact**, v. 31, p. 292-297, 2003.

BJORKOY, G.; LAMARK, T.; BRECH, A.; OUTZEN, H.; PERANDER, M.; OVERVATN, A.; STENMARK, H.; JOHANSEN, T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. **J Cell Biology**, v. 171, n. 4, p. 603-614, 2005.

BLOMMAART E. F. C.; LUIKEN J. J. F. P.; MEIJER A. J. Autophagic proteolysis: control and specificity. **Histochem J**. v. 29, p. 365-385, 1997.

BODINE, S. C.; STITT, T. N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W. O.; STOVER, G. L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J. C.; GLASS, D. J.; YANCOPOULOS, G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 11, p. 1014–1019, 2001.

BRAR, B. K.; JONASSEN, A. K.; EGORINA, E. M.; CHEN, A.; NEGRO, A.; PERRIN, M. H.; MJOS, O. D.; LATCHMAN, D. S.; LEE, K. F.; VALE, W. Urocortin-II and Urocortin-III Are Cardioprotective against Ischemia Reperfusion Injury: An Essential Endogenous Cardioprotective Role for Corticotropin Releasing Factor Receptor Type 2 in the Murine Heart. **Endocrinology**, v. 145, n.1, p. 24-35, 2004.

BRAULT, J. J.; JESPERSEN, J. G.; GOLDBERG, A. L. Peroxisome proliferator-activated receptor?? coactivator 1?? or 1?? overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. **J Biol Chem**, v. 285, n. 25, p. 19640-19671, 2010.

BREUILLE, D.; ARNAL, M.; RAMBOURDIN, F.; BAYLE, G.; LEVIEUX, D.; OBLED, C. Sustained modifications of protein metabolism in various tissues in a rat model of long-lasting sepsis. **Clinic Sci**, v. 94, p. 413–423, 1998.

BUENO, O. F.; DE WINDT, L. J.; TYMITZ, K. M.; WITT, S. A.; KIMBALL, T. R.; KLEVITSKY, R.; HEWETT, T. E.; JONES, S. P.; LEFER, D. J.; PENG, C. F.; KITSIS, R. N.; MOKENTIN, J. D. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. **EMBO Rep**, v. 19, n. 23, p.6341-6350, 2000.

CALNAN, D. R.; BRUNET, A. The FoxO code. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2276–2288, 2008.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Europ J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 235-272, 2003.

CHAN, S.; HEAD, S. I. Age- and gender-related changes in contractile properties of non-atrophied EDL muscle. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.

CHANALARIS, A.; LAWRENCE, K. M.; STEPHANOU, A.; KNIGHT, R. D.; HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. W.; LATCHMAN, D. S. Protective effects of the urocortin homologues stresscopin (SCP) and stresscopin-related peptide (SRP) against hypoxia/reoxygenation injury in rat neonatal cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 35, n. 10, p. 1295-1305, 2003.

CHAO, H.; LI, H.; GRANDE, R.; LIRA, V.; YAN, Z.; HARRIS, T. E.; LI, C. Involvement of mTOR in Type 2 CRF Receptor Inhibition of Insulin Signaling in Muscle Cells. **Mol Endocrinol**, v. 29, n. 6, p. 831–841, 2015.

CHEN, A.; VAUGHAN, J.; VALE, W. W. Glucocorticoids Regulate the Expression of the Mouse Urocortin II Gene : A Putative Connection between the Corticotropin-Releasing Factor Receptor Pathways. **Mol Endocrinol**, v. 17, n. 8, p. 1622–1639, 2003.

CHEN, R.; LEWIS, K. A.; PERRIN, M. H.; VALE, W. W. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. **PNAS**, v. 90, n. 19, p. 8967-8971, 1993.

CHEN, A.; BRAR, B.; CHOI, C.S.; ROUSSO, D.; VAUGHAN, J.; KUPERMAN, Y.; KIM, S.N.; DONALDSON, C.; SMITH, S.M.; JAMIESON, P.; LI, C.; NAGY, T.R.; SHULMAN, G.I.; LEE, K.F.; VALE, W. Urocortin 2 modulates glucose utilization and insulin sensitivity in skeletal muscle. **PNAS**, v. 103, n. 44, p. 16580-16585, 2006.

CONG, M.; GOLL, D. E.; ANTIN, P. B. cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter. **Biochim et Biophys Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1443, n. 1-2, p. 186-192, 1998.

COSTE, S. C.; KESTERSON, R. A.; HELDWEIN, K. A.; STEVENS, S. L.; HEARD, A. D.; HOLLIS, J. H.; MURRAY, S. E.; HILL, J. K.; PANTELY, G. A.; HOHIMER, A. R.; HATTON, D. C.; PHILLIPS, T. J.; FINN, D. A.; LOW, M. J.; RITTENBERG, M. B.; STENZEL, P.; STENZEL-POORE, M. P. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 403-409, 2000.

CRESPO, P.; XU, N.; SIMONDS, W. F.; GUTKIND, J. S. Ras-dependent activation of MAP

kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits, **Nature**, v. 369, p. 418-420, 1994.

DARDEVET D.; SORNET C.; TAILLANDIER D.; SAVARY I.; ATTAIX D.; GRIZARD J. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitinproteasome proteolytic pathway in aging. **J Clin Invest**, v. 96, p. 2113-2119, 1995.

DAUTZENBERG, F. M.; PY-LANG, G.; HIGELIN, J.; FISCHER, C.; WRIGHT, M. B.; HUBER, G. Different binding modes of amphibian and human corticotropin-releasing factor type 1 and type 2 receptors: evidence for evolutionary differences. **J Pharmacol Experim Therap**, v. 296, n. 1, p. 113-120, 2001.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 239-252, 2000.

DEVAL C; MORDIER S; OBLED C; BECHET D; COMBARET L; ATTAIX D; FERRARA M. Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. **Biochem J**, v. 15, n. 360, p. 143-150, 2001.

DE ROOIJ, J.; ZWARTKRUIS, F. J.; VERHEIJEN, M. H.; COOL, R. H.; NIJMAN, S. M.; WITTINGHOFFER, A.; BOS, J. L. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 474-7, Dec 3 1998.

DINAN, T. G. Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functionLife Sciences. **Life Sci**, v. 58, n. 20, p. 1683-1694, 1996.

EPSTEIN, F. H.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Mechanisms of Muscle Wasting — The Role of the Ubiquitin–Proteasome Pathway. **New Eng J Med**, v. 335, n. 25, p. 1897-1905, 1996.

FAURE, M.; VOYNO-YASENETSKAYA, T. A.; BOURNE, H. R. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. **J Biol Chem**, v. 269, p. 7851-7854, 1994.

FISCHER, A. H.; JACOBSON, K. A.; ROSE, J.; ZELLER, R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **Cold Spring Harbor Protoc**, 2008.

FORMICA, C. A.; COSMAN, F.; NIEVES, J.; HERBERT, J.; LINDSAY, R. Reduced Bone Mass and Fat-Free Mass in Women with Multiple Sclerosis: Effects of Ambulatory Status and Glucocorticoid Use. **Calcif Tissue Int**, v. 61, n. 2, p. 129–133, 1997.

FULKS, R. M.; LI, J. B.; GOLDBERG, A. L. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. **J Biol Chem**, v. 250, n. 1, p. 290–298, 1975.

FURUNO, K.; GOODMAN, M. N.; GOLDBERG, A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. **J Biol Chem**, v. 265, n. 15, p. 8850–8857, 1990.

GENG, J.; KLIONSKY, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. **EMBO Rep**, v. 9, n. 9, p. 859–864, 2008.

GEYER, M.; WITTINGHOFER, A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: Taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 7, n. 6, p. 786–792, 1997.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. **Physiol Rev.**, v. 82, p. 373–428, 2002

GOLDBERG, A. L.; CASCIO, P.; SARIC, T.; ROCK, K. L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. **Mol Immunol**, v. 39, p. 147–164, 2002.

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; TAYLOR, R. G.; OUALI, A. The calpain system and skeletal muscle growth. **Canadian J Animal Sci**, v. 78, n. 4, p. 503–512, 1998.

GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **PNAS**, v. 98, n.

5, p. 14440-14445, 2001.

GONÇALVES, D. A. P.; LIRA, E. C.; BAVIERA, A. M.; CAO, P.; ZANON, N. M.; ARANY, Z.; BEDARD, N.; TANKSALE, P.; WING, S. S.; LECKER, S. H.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5395–5404, 2009.

GOODMAN, C. A.; HORNBERGER, T. A. Measuring protein synthesis with SUnSET: a valid alternative to traditional techniques? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 41, n. 2, p. 107–115, 2015.

GOODMAN, C.A.; PIERRE, P.; HORNBERGER, T.A. Imaging of protein synthesis with puromycin. **PNAS**. v. 109, p. e989, 2012.

GROLL, M.; KOGUCHI, Y; HUBER, R.; KOHNO, J. Crystal structure of the 20 S Proteasome: TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. **J Mol Biol.**, v. 311, n. 3, p. 543–548, 2001.

HADDAD, F.; ARNOLD, C.; ZENG, M.; BALDWIN, K. Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. **Muscle & Nerve**, v. 20, n. 12, p. 1487-1496, 1997.

HADDAD, F.; ADAMS, G. R. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 1, p. 203-210, 2004.

HALL, J. E.; KACZOR, J. A. N. J.; HETTINGA, B. P. Effects of a CRF2R agonist and exercise on *mdx* and *wildtype* skeletal muscle. **Muscle & Nerve**, v. 36, n. 3, p. 336–341, 2007.

HANDSCHIN, C.; KOBAYASHI, Y.M.; CHIN, S.; SEALE, P.; CAMPBELL, K.P.; SPIEGELMAN, B.M. PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. **Genes Dev**, v. 21, n. 7, p. 770-783, 2007

HARA, K.; YONEZAWA, K.; KOZLOWSKI, M. T.; SUGIMOTO, T.; ANDRABI, K.; WENG, Q. P.; KASUGA, M.; NISHIMOTO, I.; AVRUCH, J. Regulation of eIF-4E-BP1 phosphorylation by mTOR. **J Biol Chem**, v. 272, p. 26457-26463, 1997.

HASSELGREN, P.O. Glucocorticoids and muscle catabolism. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 2, p. 201–205, 1999.

HAUGER, R. L.; OLIVARES-REYES, J. A.; BRAUN, S.; HERNANDEZ-ARANDA, J.; HUDSON, C. C.; GUTKNECHT, E.; DAUTZENBERG, F. M.; OAKLEY, R. H. Desensitization of human CRF2(a)receptor signaling governed by agonist potency and β arrestin2 recruitment. **Regul Pept**, v. 186, p. 62-76, 2013.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Ann Rev Biochem**, v. 67, p. 425-479, 1998.

HE, J.; WATKINS, S.; KELLEY, D. E. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 50, n. 4, p. 817-823, 2001.

HINKLE, R. T.; DONNELLY, E.; CODY, D. B.; BAUER, M. B.; ISFORT, R. J. Urocortin II treatment reduces skeletal muscle mass and function loss during atrophy and increases nonatrophying skeletal muscle mass and function. **Endocrinol**, v. 144, n. 11, p. 4939–4946, 2003a.

HINKLE, R. T.; DONNELLY, E.; CODY, D. B.; SAMUELSSON, S.; LANGE, J. S.; BAUER, M. B.; TARNOPOLSKY, M.; SHELDON, R. J.; COSTE, S. C.; TOBAR, E.; STENZEL-POORE, M. P.; ISFORT, R. J. Activation of the CRF 2 receptor modulates skeletal muscle mass under physiological and pathological conditions. **Am J Physiol - Endocrinol Metab**, v. 285, n. 4, p. E889–E898, 2003b.

HINKLE, R.T.; DONNELLY, E.; CODY, D.B.; BAUER, M.B.; SHELDON, R.J.; ISFORT, R.J. Corticotropin releasing factor 2 receptor agonists reduce the denervation-induced loss of rat skeletal muscle mass and force and increase non-atrophying skeletal muscle mass and

force. **J Muscle Res Cell Motil.** v. 25, n. 7, p. 539-547, 2004.

HINKLE, R. T.; LEFEVER, F. R.; DOLAN, E. T.; REICHART, D. L.; DIETRICH, J. A.; GROPP, K. E.; THACKER, R. I.; DEMUTH, J. P.; STEVENS, P. J.; QU, X. A.; VARBANOV, A. R.; WANG, F.; ISFORT, R. J. Corticotrophin releasing factor 2 receptor agonist treatment significantly slows disease progression in mdx mice. **BMC Med**, v. 11, p. 1–11, 2007.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. **Nat Med**, v. 7, n. 5, p. 605–611, 2001.

HUANG, H.; REGAN, K. M.; WANG, F.; WANG, D.; SMITH, D. I.; VAN DEURSEN, J. M. A.; TINDALL, D. J. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. **PNAS**, v. 102, n. 5, p. 1649-1654, 2005.

HUANG, J.; DIBBLE, C.C.; MATSUZAKI, M.; MANNING, B.D. The TSC1- TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. **Mol Cell Biol**, v. 28, p. 4104–4115, 2008.

INOKI, K.; LI, Y.; ZHU, T.; WU, J.; GUAN, K. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 9, 2002, 2003.

INOMATA, M.; HAYASHI, M.; NAKAMURA, M.; IMAHORI, K.; KAWASHIMA, S. Purification and characterization of a calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle which requires calcium ions of μM order concentration. **J Biochem**, v. 93, n. 1, p. 291-294, 1983.

IYENGAR, R.; HILDEBRANDT, J. D. G Protein Pathways: Part B, G Proteins and Their Regulators. **Methods in Enzymology**, v. 344. San Diego, CA: Academic, 2001.

IZUMIYA, Y.; HOPKINS, T.; MORRIS, C.; SATO, K.; ZENG, L.; VIERECK, J.; HAMILTON, J.A.; OUCHI, N.; LEBRASSEUR, N.K.; WALSH, K. Fast/Glycolytic muscle

fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. **Cell Metab**, v. 7, p. 159–172, 2008.

JACKMAN, R. W. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **AJP: Cell Physiology**, v. 287, n. 4, p. C834–C843, 2004.

JAGOE, R. T.; LECKER, S. H.; GOMES, M.; GOLDBERG, A. L. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. **FASEB J**, v. 16, p. 1697–1712, 2002.

JEFFERSON, L. Regulation by Insulin of Amino Acid Release and Protein Turnover in the Perfused Rat Hemicorpus. **J Biol Chem**, v. 252, n. 4, p. 1476–1483, 1977.

JONES, N.C.; FEDOROV, Y.V.; ROSENTHAL, R.S.; OLWIN, B.B. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. **J Cell Physiol**, v. 186, p. 104–115, 2001.

KATUNUMA, N.; YASOGAWA, N.; KITO, K.; SANADA, Y.; KAWAI, H.; MIYOSHI, K. Abnormal expression of a serine protease in human dystrophic muscle. **J. Biochem.**, v. 83, p. 625-628, 1978.

KEIPER, M.; STOPE, M. B.; SZATKOWSKI, D.; BÖHM, A.; TYSACK, K.; VOM DORP, F.; SAUR, O.; OUDE WEERNINK, P. A; EVELLIN, S.; JAKOBS, K. H.; SCHMIDT, M. Epac- and Ca²⁺ -controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors. **J Biol Chem**, v. 279, p. 46497-46508, 2004.

KETTELHUT, I. C. **Regulação da degradação de proteínas em músculo esquelético**. 1994. 171 f. Livre Docência (Livre Docência). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 1994.

KETTELHUT, I. C.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. **Diabetes Metab Rev**, v. 4, n. 8, p. 751-72, 1988.

KISHIMOTO, T.; PEARSE, R. V.; LIN, C. R.; ROSENFELD, M. G. A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. **PNAS**, v. 92, n. 4, p. 1108-1112, 1995.

KISSELEV, A.F.; AKOPIAN, T. N.; WOO, K. M.; GOLDBERG, A.L. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. **J Biol Chem**, v. 274, n. 6, p. 3363-3371, 1999.

KISSELEV, A.F.; GOLDBERG, A.L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. **Chem Biol.**, v. 8, n. 8, p. 739–758, 2001.

KLIONSKY, D. J.; ABELIOVICH, H.; AGOSTINIS, P.; AGRAWAL, D. K.; ALIEV, G. *et al.*, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. **Autophagy**, v; 4, n. 2, p. 151-175, 2008.

KLINE, W.O.; PANARO, F.J.; YANG, H.; BODINE, S.C. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. **J Appl Physiol**, v. 102, p. 740–747, 2007.

KOCH, W. J.; HAWES, B. E.; ALLEN, L. F.; LEFKOWITZ, R. J. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. **PNAS**, v. 91, n. 26, p. 12706-12710, 1994.

KOOPMAN, R.; GEHRIG, S.M.; LEGER, B.; TRIEU, J.; WALRAND, S.; MURPHY, K.T.; LYNCH, G.S. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic (beta)-adrenoceptor stimulation in mice. **J Physiol**, v. 588, p. 4811–4823, 2010.

KUPERMAN, Y.; ISSLER, O.; VAUGHAN, J.; BILEZIKJIAN, L.; VALE, W.; CHEN, A. Expression and Regulation of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 2 β in Developing and Mature Mouse Skeletal Muscle. **Mol Endocrinol**, v. 25, n. 1, p. 157–169, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Slowing muscle atrophy: Putting the brakes on protein breakdown. **Journal of Physiology**, v. 545, n. 3, p. 729, 2002.

LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L.; MITCH, W.E. Protein degradation by the ubiquitin–proteasome pathway in normal and disease states. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 1807–1819, 2006.

LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S. R.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **FASEB J**, v. 18, p. 39–51, 2004.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Clinical Trials for the Treatment of Secondary Wasting and Cachexia Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin- Proteasome Pathway in Normal and Disease States. **J Nutrition**, v. 129, p. 227–237, 1999.

LEE, J. W.; CHEN, H.; PULLIKOTIL, P.; QUON, M. J. et al. Protein Kinase A- α Directly Phosphorylates FoxO1 in Vascular Endothelial Cells to Regulate Expression of Vascular Cellular Adhesion Molecule-1 mRNA. **J Biol Chem**. v. 286, n.8, p. 6423-6432, 2011.

LEWIS, K.; LI, C.; PERRIN, M. H.; BLOUNT, A.; KUNITAKE, K.; DONALDSON, C.; VAUGHAN, J.; REYES, T. M.; GULYAS, J.; FISCHER, W.; BILEZIKJIAN, L.; RIVIER, J.; SAWCHENKO, P. E.; VALE, W. W. Identification of urocortin III , an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. **PNAS**, v. 98, n. 13, 2001.

LIN, J.; WU, H.; TARR, P.T.; ZHANG, C.Y.; WU, Z.; BOSS, O. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**. v. 188, n. 6899, p. 207-216.

LIRA, E. C.; GRAC, A.; GONC, D. A. P.; ZANON, N. M.; BAVIERA, A. M.; STRINDBERG, L.; LO, P.; HE, R.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterases inhibitors reduces skeletal muscle protein catabolism in septic rats. **Shock**, v. 27, n. 6, 2007.

LIRA, E.C.; GONÇALVES, D.A.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; ZANON, N.M.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Phosphodiesterase-4 inhibition reduces proteolysis and atrogenes expression in rat skeletal muscles. **Muscle Nerve**. v. 44, n. 3, p. 371-381, 2011.

LIU, C.; JACOBSON, A. D. Functions of the 19S Complex in Proteasomal Degradation. **Trends Biochem Sci**, v. 38, n. 2, p. 103–110. 2013.

LOVENBERG, T. W.; LIAW, C. W.; GRIGORIADIST, D. E.; CLEVENGER, W.; CHALMERST, D. T.; SOUZAT, E. B. D. E.; OLTERSDORF, T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **PNAS**, v. 92, n. 3, p. 836–840, 1995.

LOKIREDDY, S.; MOULY, V.; BUTLER-BROWNE, G.; GLUCKMAN, P. D.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; MCFARLANE, C. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. **AJP: Cell Physiology**, v. 301, n. 6, p. C1316-1324, 2011.

LOWRY, C. A. Functional subsets of serotonergic neurones: Implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **J Neuroendocrinol**, v. 14, n. 11, p. 911-923, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUITEN, P. G. M.; TER HORST, G. J.; KARST, H.; STEFFENS, A. B. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. **Brain Res**, v. 329, n. 1-2, p. 374-378, 1985.

LUKAS, G.; BRINDLE, S. D.; GREENGARD, P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 178, n. 3, p. 562-564, 1971.

MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; BONNER, P.; BERNARDI, R.; FRANZ, D. N.; WITTE, D.; CORDON-CARDO, C.; PANDOLFI, P. P. Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase-mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 15, p. 7106-7112, 2007.

MAMMUCARI, C.; MILAN, G.; ROMANELLO, V.; MASIERO, E.; RUDOLF, R.; DEL PICCOLO, P.; BURDEN, S.J.; DI LISI, R.; SANDRI, C.; ZHAO, J.; GOLDBERG, A.L.; SCHIAFFINO, S.; SANDRI, M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. **Cell Metab**, v. 6, p. 458-471, 2007.

MANNING, B. D.; TEE, A. R.; LOGSDON, M. N.; BLENIS, J.; CANTLEY, L. C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. **Molecular Cell**, v. 10, n. 1, p. 151-162, 2002.

MEI, F. C.; QIAO, J.; TSYGANKOVA, O. M.; MEINKOTH, J. L.; QUILLIAM, L. A.; CHENG, X. Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. **J Biol Chem**, v. 277, n. 13, p. 11497-504, Mar 29 2002.

MCCMAHON, J. M.; SIGNORI, E.; WELLS, K. E.; FAZIO, V. M.; WELLS, D. J. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase - Increased expression with reduced muscle damage. **Gene Ther**, v. 8, n. 16, p. 1264-1270, 2001.

MCKINSEY, T. A.; ZHANG, C. L.; OLSON, E. N. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. **PNAS**, v. 97, n. 14400-14405, 2000.

MUCHIR, A.; KIM, Y. J.; REILLY, S. A.; WU, W.; CHOI, J. C.; WORMAN, H. J.

Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling has beneficial effects on skeletal muscle in a mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by lamin A/C gene mutation. **Skelet Muscle**, v. 18, n. 2, p. 241-247, 2013.

NADER, G. A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: Getting the “AKT” together. **Internat J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 1985–1996, 2005.

NAKANO, K.; HARA, H. Measurement of the protein-synthetic activity in vivo of various tissues in rats by using [3H]Puromycin. **Biochem J**, v. 184, n. 3, p. 663–668, 1979.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, p. E663-E668, 2000.

NAVEGANTES LCC, RESANO NMZ, MIGLIORINI RH, KETTELHUT IC. Catecholamines inhibit Ca²⁺-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β 2-adrenoceptors and cAMP. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 281, p. E449–E454, 2001.

NEUFELD-COHEN, A.; TSOORY, M. M.; EVANS, A. K.; GETSELTER, D.; GIL, S.; LOWRY, C. A.; VALE, W. W.; CHEN, A. A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. **PNAS**, v. 107, n. 44, p. 19020-19025, 2010.

NISHIDA, E.; YUKIKO, G. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. **Trends Biochem Sci**, v. 18, n. 4, p. 128-131, 1993.

ODDIE GY. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 2, p. 449 – 471, 2004.

OGATA, T.; OISHI, Y.; HIGUCHI, M.; MURAOKA, I. Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. **Biochem Biophys Research Commun**, v. 394, n. 1, p. 136-140, 2010.

PALLAFACCHINA, G.; CALABRIA, E.; SERRANO, A. L.; KALHOVDE, J. M.; SCHIAFFINO, S. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. **PNAS**, v. 99, n. 14, p. 9213-9218, 2002.

PATEL, K.; RADEMAKER, M. T.; KIRKPATRICK, C. M. J.; CHARLES, C. J.; FISHER, S.; YANDLE, T. G.; RICHARDS, A. M. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of urocortins 1, 2 and 3 in healthy sheep. **Br J Pharmacol**, v. 166, n. 6, p. 1916-1925, 2012.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

PETTE, D.; STARON, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc Res Tech**. v. 50, n. 6, p. 500–509, 2000.

PEPATO, M. T.; MIGLIORINI, R. H.; GOLDBERG, A. L.; KETTELHUT, I. C. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. **Am J Physiology**, v. 271, n. 2 Pt 1, p. E340-347, 1996.

PERRIN, M.; DONALDSON, C.; CHEN, R.; BLOUNT, A. M. Y.; BERGGREN, T.; BILEZIKJIAN, L.; SAWCHENKOT, P.; VALE, W. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. **PNAS**, v. 92, n. March, p. 2969–2973, 1995.

PERRIN, M. H.; SUTTON, S. W.; CERVINI, L. A.; RIVIER, J. E.; VALE, W. W. Comparison of an agonist, urocortin, and an antagonist, astressin, as radioligands for characterization of corticotropin-releasing factor receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, n. 2, p. 729-734, 1999.

PEYRON, C.; PETIT, J. M.; RAMPON, C.; JOUVET, M.; LUPPI, P. H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. **Neuroscience**, v. 82, n. 2, p. 443-468, 1997.

PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem.**, v. 70., p. 503–533, 2001.

PICKART C. M. Back to the future with ubiquitin. **Cell.** v. 116, p. 181–190, 2004.

PYRONNET, S. Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. **Biochem Pharmacol**, v. 60, n. 8, p. 1237-1243, 2000.

RAHNERT, J. A.; LUO, Q.; BALOG, E. M.; SOKOLOFF, A. J.; BURKHOLDER, T. J. Changes in growth-related kinases in head, neck and limb muscles with age. **Exp Gerontol**, v. 46, n. 4, p. 282-291, 2011.

RECHSTEINER, M.; CARLSON, N. Microinjection of ubiquitin: intracellular distribution and metabolism in HeLa cells maintained under normal physiological conditions. Further 1987. 3: 1987. **J Cell Biol**, v. 104, n. 3, p. 537-546, 1987.

REUTENAUER-PATTE, J.; BOITTIN, F.; PATTHEY-VUADENS, O.; RUEGG, U. T.; DORCHIES, O. M. Urocortins Improve Dystrophic Skeletal Muscle Structure and Function through Both PKA- and Epac-Dependent Pathways. **Am J Physic Antropol**, v. 180, n. 2, p. 749–762, 2012.

REYES, T. M.; LEWIS, K.; PERRIN, M. H.; KUNITAKE, K. S.; VAUGHAN, J.; ARIAS, C. A.; HOGENESCH, J. B.; GULYAS, J.; RIVIER, J. Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. **PNAS**, v. 98, n. 5, p. 2–7, 2001.

ROBINSON, M. J.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 180-186, 1997.

ROMMEL, C.; BODINE, S. C.; CLARKE, B. A.; ROSSMAN, R.; NUNEZ, L.; STITT, T. N.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 11, p. 1009-1113, 2001.

ROCK K. L.; GRAMM C.; ROTHSTEIN L.; CLARK K.; STEIN R.; DICK L.; HWANG D.; GOLDBERG A. L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class 1 molecules. **Cell**. v. 78, p.: 761–771, 1994

ROUX, P. P.; BALLIF, B. A.; ANJUM, R.; GYGI, S. P.; BLENIS, J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. **PNAS**, v. 101, n. 37, p. 13489-13494, 2004.

RUDOLF, R.; BOGOMOLOVAS, J.; STRACK, S.; CHOI, K.; KHAN, M. M.; WAGNER, A.; BROHM, K.; HANASHIMA, A.; GASCH, A.; LABEIT, D.; LABEIT, S. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. **AGE**, v. 35. p.1663-1674, 2013.

RYALL, J. G.; PLANT, D. R.; GREGOREVIC, P.; SILENCE, M. N.; LYNCH, G. S. Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. **J Physiol**, v. 555, p. 175-188, 2004.

SACHECK, J. M.; HYATT, J.-P. K.; RAFFAELLO, A.; JAGOE, R. T.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. **FASEB J**, v. 21, n. 1, p. 140-155, 2006.

SAMUELSSON, S.; LANGE, J.S.; HINKLE, R.T.; TARNOPOLSKY, M.; ISFORT, R.J. Corticotropin-releasing factor 2 receptor localization in skeletal muscle. **J Histochem Cytochem**, v. 52, n. 7, p. 967-977, 2004.

SANADA Y.; YASOGAWA N.; KATUNUMA N. Crystallization and amino acid composition of a serine protease from rat skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 82, p.: 108-113, 1978.

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Foxo Transcription

Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399–412, 2004.

SANDRI, M.; LIN, J.; HANDSCHIN, C.; YANG, W.; ARANY, Z. P.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; SPIEGELMAN, B. M. PGC-1 protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **PNAS**, v. 103, n. 44, 2006.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiol (Bethesda)**, v. 23, p. 160-170, 2008.

SANO M.; WADA Y.; IL, K.; KOMIMAMI E.; KATUNUMA N.; TSUKAGOSHI H. Immunolocalization of cathepsins B, H and L in skeletal muscle of X-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Acta Neuropathol**, v. 75, p.: 217-225, 1988.

SARBASSOV, D.D.; GUERTIN, D.A.; ALI, S.M.; SABATINI, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, v. 307, p. 1098–1101, 2005.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 4, p. 2435-2444, 1999.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SCHMIDT, E.K.; CLAVARINO, G.; CEPPI, M.; PIERRE, P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. **Nat Methods**, v. 6, p. 275–277, 2009.

SCHWINDINGER, W. F.; ROBISHAW, J. D. Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. **Oncogene**, v. 20, n. 13, p. 1653-1656, 2001.

SEABERG, B.; HENSLEE, G.; WANG, S.; PAEZ-COLASANTE, X.; LANDRETH, G. E.; RIMER, M. Muscle-derived ERK1/2 MAP kinases are required for the maintenance of adult myofibers and their neuromuscular junctions. **Mol Cell Biol**, v. 35, n. 7, p. MCB.01071-14, 2015.

SENSKY, P. L.; JEWELL, K. K.; RYAN, K. J. P.; PARR, T.; BARDSLEY, R. G.; BUTTERY, P. J. Effect of anabolic agents on calpastatin promoters in porcine skeletal muscle and their responsiveness to cyclic adenosine monophosphate- and calcium-related stimuli. **J Anim Sci**, v. 84, n. 11, p. 2973-2982, 2006.

SHI, H.; SCHEFFLER, J. M.; ZENG, C.; PLEITNER, J. M.; HANNON, K. M.; GRANT, A. L.; GERRARD, D. E. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 296, n. 5, p. C1040-1048, 2009.

SILVEIRA, W.A.; GONÇALVES, D.A.; GRAÇA, F.A.; ANDRADE-LOPES, A.L.; BERGANTIN, L.B.; ZANON, N.M.; GODINHO, R.O.; KETTELHUT, I.C.; NAVEGANTES, L.C. Activating cAMP/1 PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. **J Appl Physiol**, v. 117, n. 1, p.11-19, 2014.

SIM, L. J.; JOSEPH, S. A. Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception. **J Chem Neuroanat**, v. 4, n. 2, p. 97-109, 1991.

SMITH, L. R.; BARTON, E. R. SMASH – semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology: a MATLAB application SMASH – semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology: a MATLAB application. **Skelet Muscle**, v. 4, n. 21 2014.

SOLOMON, V.; BARACOS, V.; SARRAF, P.; GOLDBERG, A. L. Rates of ubiquitin conjugation increase when muscles atrophy, largely through activation of the N-end rule pathway. **PNAS**, v. 95, n. 21, p. 12602-12607, 1998.

SORIMACHI, H.; ONO, Y.; SUZUKI, K. Skeletal muscle-specific calpain, p94, and connectin/titin: their physiological functions and relationship to limb-girdle muscular dystrophy type 2A. **Adv Exp Med Biol**, v. 481, p. 383-395, 2000.

STEWART, R.; AKHMEDOV, D.; ROBB, C.; LEITER, C.; BERDEAUX, R. Regulation of

SIK1 abundance and stability is critical for myogenesis. **PNAS**. v. 110, n. 1, p. 117-122, 2012.

STITT, T. N.; DRUJAN, D.; CLARKE, B. A.; PANARO, F.; TIMOFEYVA, Y.; KLINE, W. O.; GONZALEZ, M.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J.; PHARMACEUTICALS, R.; YORK, N. The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Short Article Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. **Mol Cell**, v. 14, p. 395–403, 2004.

STUART, C. A.; MCCURRY, M. P.; MARINO, A.; SOUTH, M. A.; HOWELL, M. E. A.; LAYNE, A. S.; RAMSEY, M. W.; STONE, M. H. Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 5, p. 2027-2036, 2013.

SUZUKI, K.; SORIMACHI, H.; YOSHIKAWA, T.; KINBARA, K.; ISHIURA, S. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. **Biol Chem Hoppe-Seyler**, v. 376, n. 9, p. 523-529, 1995.

TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; MEYNIAL-DENIS, D.; BECHET, D.; FERRARA, M.; COTTIN, P.; DUCASTAING, A.; BIGARD, X.; GUEZENNEC, C. Y.; SCHMID, H. P. Coordinate activation of lysosomal, Ca^{+2} -activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. **Biochem J**, v. 316, p. 65-72, 1996.

TANNER, C. J.; BARAKAT, H. A.; DOHM, G. L.; PORIES, W. J.; MACDONALD, K. G.; CUNNINGHAM, P. R. G.; SWANSON, M. S.; HOUMARD, J. A. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. **Am J Physiol - Endocrinol Metab**, v. 282, n. 6, p. E1191-1196, 2002.

TALBOT, J.; MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 5, n. 4, p. 518-534, 2016.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, p. 2503-2518, 2004.

TANSEY, M.G.; CHU, G.C.; MERLIE, J.P. ARIA/HRG regulates AChR epsilon subunit gene expression at the neuromuscular synapse via activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/MAPK pathway. **J Cell Biol**, v. 134, p. 465–476, 1996.

TIDBALL, J. G.; SPENCER, M. J. Calpains and muscular dystrophies. **Internat J Biochem Cell Biol**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2000.

TIDBALL, J. G.; SPENCER, M. J. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. **J Physiol**, v. 545, p. 819-828, 2002.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **PNAS**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRAN, H.; BRUNET, A.; GRIFFITH, E. C.; GREENBERG, M. E. The Many Forks in FOXO's Road. **Sci STKE**, v. 2003, n. 172, 2003.

UEYAMA, T.; KAWASHIMA, S.; SAKODA, T.; RIKITAKE, Y.; ISHIDA, T.; KAWAI, M.; YAMASHITA, T.; ISHIDO, S.; HOTTA, H.; YOKOYAMA, M. Requirement of activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade in myocardial cell hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 32, n. 6, p. 947-960, 2000.

VAN DER VOS, K. E.; COFFER, P. J. The extending network of FOXO transcriptional target genes. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 4, p. 579–592, 2011.

WAGATSUMA, A.; FUJIMOTO, K.; YAMADA, S. Effect of treatment with nifedipine, an L-type calcium channel blocker, on muscular atrophy induced by hindlimb immobilization. **Scand J Med Sci Sports**, v. 12, n. 1, p. 26-30, 2002.

WALTHER, S.; PLUTEANU, F.; RENZ, S.; NIKONOVA, Y.; MAXWELL, J. T.; YANG, L.; SCHMIDT, K.; EDWARDS, J. N.; WAKULA, P.; GROSCHNER, K.; MAIER, L. S.; SPIESS, J.; BLATTER, L. A.; PIESKE, B.; KOCKSKÄMPER, J.; SCHMIDT, K.; JN, E.; WAKULA, P.; GROSCHNER, K.; LS, M. Urocortin 2 stimulates nitric oxide production in ventricular myocytes via Akt- and PKA-mediated phosphorylation of eNOS at serine 1177. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 2, p. 689–700, 2014.

WAALKES TP; UDENFRIEND S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J Lab Clin Med**, v. 50, n. 5, p. 733-736, 1957.

WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. **Trends Biochem Sci**, v. 23, n. 12, p. 481-485, 1998.

WIDEGREN, U.; RYDER, J.W.; ZIERATH, J.R. Mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle: effects of exercise and muscle contraction. **Acta Physiol Scand**, v. 172, p. 227–238, 2001.

WILEY, K. E.; DAVENPORT, A. P. CRF2 receptors are highly expressed in the human cardiovascular system and their cognate ligands urocortins 2 and 3 are potent vasodilators. **Br J Pharmacol**, v. 143, n. 4, p. 508-514, 2004.

WILLIAMS, A. B.; DECOURTEN-MYERS, G. M.; FISCHER, J. E.; LUO, G.; SUN, X.; HASSELGREN, P. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. **FASEB J**, v. 13, n. 11, p. 1435-1443, 1999.

WILKINSON, K. D.; Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. **J Nutr**, v. 129, n. 11, p. 1933–1936, 1999.

WING, S. S.; HAAS, A. L.; GOLDBERG, A. L. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. **Biochem J**, v. 307, p. 639-645, 1995.

WINTER, J. N.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. ERK and Akt signaling pathways function through parallel mechanisms to promote mTORC1 signaling. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 300, n. 5, p. C1172-1180, 2011.

XIE, Q.; CHEN, J.; YUAN, Z. Post-translational regulation of FOXO. **Acta Biochim et Biophysica Sinica**, v. 44, n. 11, p. 897-901, 2012.

XIE, Z, KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nat Cell Biol**, v. 9, p.: 1102-1109, 2007.

YAMAUCHI, N.; OTAGIRI, A.; NEMOTO, T.; SEKINO, A.; OONO, H.; KATO, I.; YANAIHARA, C.; SHIBASAKI, T. Distribution of Urocortin 2 in Various Tissues of the Rat. **J Neuroendocrinol**, v. 17, p. 656-663, 2005.

YANG, J. Y.; ZONG, C. S.; XIA, W.; YAMAGUCHI, H.; DING, Q.; XIE, X.; LANG, J. Y.; LAI, C. C.; CHANG, C. J.; HUANG, W. C.; HUANG, H.; KUO, H. P.; LEE, D. F.; LI, L. Y.; LIEN, H. C.; CHENG, X.; CHANG, K. J.; HSIAO, C. D.; TSAI, F. J.; TSAI, C. H.; SAHIN, A. A.; MULLER, W. J.; MILLS, G. B.; YU, D.; HORTOBAGYI, G. N.; HUNG, M. C. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 138-148, 2008.

YARMOLINSKY, M. B.; HABA, G. L. Inhibition By Puromycin of Amino Acid Incorporation Into Protein. **PNAS**, v. 45, n. 12, p. 1721-1729, 1959.

YIMLAMAI, T.; DODD, S.L.; BORST, S.E.; PARK, S. Clenbuterol induces musclespecific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. **J Appl Physio**, v. 99, p. 71-80, 2005.

YOKOYAMA, T.; TAKANO, K.; YOSHIDA, A.; KATADA, F.; SUN, P.; TAKENAWA, T.; ANDOH, T.; ENDO, T.; DA-Raf1, a competent intrinsic dominant negative antagonist of the Ras-ERK pathway, is required for myogenic differentiation. **J Cell Biol**, v. 177, p. 781-793, 2007.

ZHANG, X.; ODOM, D. T.; KOO, S.-H.; CONKRIGHT, M. D.; CANETTIERI, G.; BEST,

J.; CHEN, H.; JENNER, R.; HERBOLSHEIMER, E.; JACOBSEN, E.; KADAM, S.; ECKER, J. R.; EMERSON, B.; HOGENESCH, J. B.; UNTERMAN, T.; YOUNG, R. A.; MONTMINY, M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. **PNAS**, v. 102, n. 12, p. 4459-4464, 2005.

ZHAO, J.; BRAULT, J. J.; SCHILD, A.; CAO, P.; SANDRI, M.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Article FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic / Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. **Cell Metab**, v. 6, n. 6, p. 472–483, 2007.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 12, n. 1, p. 21-35, 2011.

ZWICKL, P.; VOGES, D.; BAUMEISTER, W. The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 354, n. 1389, p. 1501–1511, 1999.