Mirella Ribeiro Bento

**Efeito da suplementação de leucina sobre a
via GSK3- β durante a atrofia muscular
esquelética induzida por imobilização**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari
Moriscot

Versão Corrigida

São Paulo
2017

RESUMO

Bento MR Efeito da suplementação de leucina sobre a via GSK3- β durante atrofia muscular esquelética induzida por imobilização. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O músculo esquelético é um tecido muito importante para a saúde, e seu desequilíbrio está relacionado com diversas doenças. Existe um grande interesse na identificação e caracterização dos agentes/mecanismos responsáveis pelo controle das vias anabólicas/catabólicas da massa muscular que contribuem para a manutenção da homeostase do músculo esquelético. A atrofia muscular é caracterizada pela perda de massa muscular, levando a redução de capacidade funcional. Dada à importância deste tecido na locomoção e muitas outras funções fisiológicas do organismo, o processo de atrofia pode inferir ao indivíduo o aumento da morbidade e perda de sua qualidade de vida, tornando assim, de grande importância a compreensão dos processos moleculares envolvidos. Neste trabalho exploramos a capacidade da suplementação de leucina em proteger a massa muscular durante a atrofia induzida por imobilização, através da inibição de vias catabólicas. A leucina é um alvo atraente, uma vez que é considerado um aminoácido anti-atrófico capaz de regular as vias intracelulares envolvidas na síntese e degradação das proteínas, desta forma, abordamos se o efeito anti-atrófico da leucina envolve modulação do eixo GSK3- β / β -Catenina. Ratos Wistar, suplementados com leucina, tiveram sua pata posterior esquerda imobilizada com o músculo sóleo em posição encurtada. Em seguida, o músculo sóleo foi removido, pesado e processado para avaliar a expressão de genes e proteínas por qRT-PCR e Western blot, respectivamente. Além disso, secções transversais musculares foram utilizadas em ensaios de imunofluorescência para análise de localização celular. Após 1 dia de imobilização, foi observado a ativação de GSK3- β no músculo sóleo, e a suplementação de leucina foi capaz de bloquear esse efeito. Embora os níveis proteicos de β -Catenina tenham sido inalterados pela imobilização ou pela suplementação de leucina, a análise de localização celular, mostrou uma diminuição nuclear da β -Catenina causada pela imobilização, porém, a suplementação de leucina foi capaz de aumentar os níveis de β -Catenina no núcleo. A análise Confocal confirmou a translocação nuclear de β -Catenina, durante a suplementação de leucina. Também analisamos os níveis de expressão proteica de NF- κ B por ser potencialmente regulado por β -Catenina, no entanto, não foram observadas alterações nos níveis desta proteína entre os grupos. Assim, este estudo revela β -Catenina como uma nova molécula chave envolvida nos efeitos anti-atróficos da leucina.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Atrofia. Imobilização. Leucina. GSK3- β . β -Catenina. NF κ B.

ABSTRACT

Bento MR. Effect of leucine supplementation upon GSK3- β pathway during skeletal muscle atrophy during immobilization. [Mastesthesis (MorfofunctionalScience)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Skeletal muscle is a very important tissue for health, and its depletion predicts the prognosis of several diseases. There is great interest in the identification and characterization of the agents/mechanisms responsible for the control of muscle mass through anabolic/catabolic pathways that contribute to maintenance of skeletal muscle homeostasis. Muscle atrophy is characterized by loss of muscle mass, leading to a reduction in functional capacity. Due the importance of this tissue in locomotion and many other physiological organism functions, the process of atrophy can infer to the individual the increase of the morbidity and loss of his quality of life, thus making of great importance to the understanding the molecular processesinvolved. In this work, leucine supplementation is sought to protect muscle mass during atrophy induced by immobilization through the inhibition of catabolic pathways. Leucine is an attractive target, since it is considered an anti-atrophic amino acid capable of regulating intracellular pathways involved in the synthesis and degradation of proteins. Therefore, we approached whether the anti-atrophic effect of leucine involves modulation of the GSK3- β / β -Catenin. Male Wistar rats, supplemented with leucine, had their left hind limb immobilized with the soleus muscle in a shortened position. Thereafter, the soleus muscle was removed, weighed and processed to evaluate an expression of genes and proteins by qPCR and Western blot, respectively. In addition, muscle cross-sections were performed in immunofluorescence assays for cell localization analysis. After 1 day of immobilization, activated GSK3- β in the soleus muscle was observed, and leucine supplementation was able to block this effect. Although protein levels of β -Catenin were unchanged by immobilization or by leucine supplementation, cell localization analysis showed a nuclear decrease of β -Catenin caused by immobilization, however, leucine supplementation was able to increase levels of β -Catenin in the nucleus. Confocal analysis confirmed nuclear translocation of β -Catenin during leucine supplementation. We also analyzed the expression levels of NF- κ B by being potentially regulated by β -Catenin, however, no changes were observed in NF- κ B protein levels between the groups. Thus, this study reveals β -Catenin as a new key molecule involved in the anti-atrophic effects of leucine.

Keywords: Skeletal muscle. Atrophy. Immobilization. Leucine. GSK3- β . β -Catenina. NF κ B.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Tecido Muscular e o processo de atrofia

O tecido muscular esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano e compreende aproximadamente de 40% a 60% de toda a massa corporal. É constituído por células alongadas, cilíndricas e multinucleadas, que podem variar de 10 a 100 micrômetros de diâmetro e chegar a vários centímetros de comprimento. Seus núcleos são localizados na periferia, junto à membrana plasmática (conhecida como sarcolema) e seu citoplasma é preenchido por filamentos proteicos dispostos longitudinalmente denominados miofibrilas. A miofibrila é formada pelas unidades básicas de contração, denominada sarcômero. O sarcômero é observável pela microscopia eletrônica e os elementos mais facilmente notáveis são estrias transversais denominadas de bandas claras (I) e escuras (A). No centro de cada banda A está presente uma banda clara, denominada de banda H, que é dividida ao meio por uma linha chamada de M. Já a banda I é dividida ao meio por uma linha escura, a linha Z. O Sarcômero é a região da miofibrila entre duas linhas Z (Figura 1). A união da força motriz gerada pelos Sarcômeros em série, permite a contração da fibra muscular, gerando assim a tensão necessária para a dinâmica de movimento do tecido. É importante destacar que o tecido muscular esquelético é capaz de se modificar, adicionando ou removendo essas unidades contráteis (sarcômeros), induzindo o ganho ou perda de força, que ocorrem nos processos adaptativos de hipertrofia e atrofia, respectivamente (1, 2).

As células musculares estriadas esqueléticas são formadas durante o desenvolvimento embrionário, provenientes da fusão de mioblastos, células precursoras das fibras musculares esqueléticas, que se alinham e fundem-se para formação de longas células multinucleadas, chamadas miotubos(3). Estes miotubos produzem as miofibrilas (compostas basicamente por duas proteínas contráteis, Actina e Miosina) e começam a se maturar a partir do momento em que os núcleos vão sendo direcionados para a periferia da célula e seu interior é preenchido com as proteínas contráteis, originando assim a fibra muscular madura (1).

Figura 1 - Esquema ilustrativo representando o Sarcômero. Estão representadas as proteínas miofibrilares, Actina e Miosina; as divisões de bandas claras (I) e de bandas escuras (A), além de indicar as linhas M e Z. Adaptado de Castro-Ferreira 2011(4).

A propriedade de gerar tensão do músculo esquelético está relacionada com várias funções do organismo, como por exemplo, fixação, suporte e mobilidade do esqueleto, retorno venoso, movimentação do globo ocular, termogênese e respiração. O músculo esquelético é um importante regulador metabólico, exercendo funções como armazenamento de glicogênio e desempenhando um papel na degradação de proteínas, e consequentemente fornecer aminoácidos para processos metabólicos em condições de extrema demanda metabólica, como no câncer e durante privação alimentar (1).

O processo de atrofia do músculo esquelético é fortemente regulado por alterações moleculares e celulares e é definido como a perda do conteúdo proteico muscular (particularmente, proteínas miofibrilares como já comentado anteriormente) e caracterizado pela redução na área de secção transversal das fibras musculares e do conteúdo protéico, redução de força e potência, aumento da fadigabilidade, podendo levar ao aumento da resistência à insulina (5, 6). Condições como diminuição dos padrões de atividades físicas, desuso, imobilização e microgravidade (exemplos de diminuição de estresse mecânico), câncer, sepse e AIDS (exemplos de fatores metabólicos), uso prolongado de glicocorticóides e hipertireoidismo (exemplos de sobrecarga hormonal) são as principais causas de atrofia muscular esquelética (7).

A redução da área de secção transversal induzida pelo desuso é resultado do desequilíbrio entre síntese e degradação de proteínas miofibrilares, sendo que quantitativamente a proteólise desempenha um papel preponderante em muitas, senão todas, as situações atróficas (8, 9).

Existem três principais sistemas proteolíticos no músculo esquelético: o sistema lisossomal (via autofágica), o sistema proteolítico dependente de cálcio (relacionado com atividade de proteases conhecidas como calpaínas) (10) e o sistema Ubiquitina Proteassoma (UPS). Entre as vias proteolíticas conhecidas no músculo esquelético destaca-se a via ubiquitina proteassoma(11, 12). O UPS tem como finalidade reduzir o conteúdo das proteínas intracelulares durante o remodelamento do músculo (13). Após clivagem específica de proteínas de ancoramento, as proteínas miofibrilares actina e miosina são dissociadas da estrutura sarcomérica(10). No citosol essas proteínas podem ser degradadas pelo proteassoma(14).

As proteínas alvo de degradação pelo proteassoma são primeiramente conjugadas com ubiquitina (Ub), um peptídeo constituído por 76 aminoácidos. A ubiquitinação (ou conjugação com ubiquitina) consiste na ligação isopeptídica entre a ubiquitina e a proteína alvo e envolve a ação de três classes de enzimas: E1 (enzima ativadora de ubiquitina); E2 (enzimas conjugadoras/carreadoras de ubiquitina ativada) e E3 (ligases de ubiquitina-proteína), conforme mostra a figura 2. As E3-ligases são responsáveis pela especificidade da degradação, reconhecendo o substrato e transferindo o conjugado ubiquitina para resíduos de lisina na proteína alvo. A proteína marcada é então degradada no complexo 26S do proteassoma(15).

Figura 2 - Sistema Ubiquitina Proteassoma. (a) Ativação de Ub pela E1. Carregamento de Ub ativada pela E2 e ligação de Ub no substrato indicado para degradação pelo E3; resultando assim em (b) ligação de uma única molécula de Ub (Mono ubiquitinação); ligação de unidades múltiplas de UB sobre a mesma proteína (multiubiquitinação) ou a síntese de cadeias de Ub (poliubiquitinação). (c)

Degradação de proteínas ubiquitinadas através do Proteassoma 26S, que consiste dos complexos catalíticos 20S e 19S. Adaptado de Kaiser e Huang 2005 (16).

A musculatura esquelética possui duas principais ubiquitina-ligases superexpressas em diferentes quadros atróficos durante a proteólise muscular, MAFbx/Atrogin-1 (muscle atrophy F box) e MuRF-1 (muscle ringer finger protein 1) (11, 12) também conhecidas como atrogenes. Além disso, a indução destes atrogenes são processos cruciais para o desencadeamento do processo atrófico, uma vez que a ablação destes pode proteger o músculo durante o processo catabólico (11). Estudos na literatura mostram que durante atrofia induzida por vários modelos, as proteínas FoxO ("fork head Family transcription factors") estão envolvidas no controle de genes ligados ao quadro atrófico (5). FoxO é um subgrupo de uma grande família de fatores de transcrição e é dividido em quatro membros, sendo eles: FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6. Diversos estudos mostram que FoxO1 e FoxO3, tem uma maior participação na transcrição dos atrogenes MAFbx/atrogin-1 e MuRF-1 (17-19).

1.2 Suplementação de leucina na atrofia muscular esquelética

Algumas condições podem ocasionar a perda de massa muscular, como o envelhecimento, processos patológicos (Sepse, doenças auto-imunes), uso de glicocorticóides e a diminuição das habituais atividades físicas e nutricionais. Essas alterações levam à diminuição da massa muscular esquelética resultante de uma diminuição da síntese de proteínas do músculo e um aumento de degradação da proteína muscular. Além disso, a perda de massa e consequentemente de força muscular têm sido relacionados com morbidade e mortalidade (20, 21).

Diversas estratégias terapêuticas têm sido utilizadas, com o objetivo de diminuir a atrofia muscular esquelética, como por exemplo, a suplementação com aminoácidos essenciais de cadeia ramificada. Os aminoácidos essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados endogenamente (não são sintetizado pelo organismo), sendo assim, são ingeridos através de dieta. Dentre esses aminoácidos essenciais, são destacados três aminoácidos de cadeia ramificada, Valina, Leucina e Isoleucina. Evidências mostram o papel dos aminoácidos de cadeia ramificada na regulação de processos anabólicos envolvendo a síntese de proteínas musculares

(22, 23). A Leucina pode ser destacada, dentre estes aminoácidos de cadeia ramificada, pois é o mais potente deles no contexto de aumento de síntese protéica e redução de proteólise (24).

Nesse sentido, a suplementação com o aminoácido leucina tem sido muito estudada. A literatura demonstra que a leucina pode aumentar a síntese de proteínas musculares por meio da ativação de componentes da cascata de sinalização da via da PI3/Akt/mTOR (25-30).

Sugawara e colaboradores mostraram em um modelo animal de deprivação protéica, um efeito protetor da massa muscular, ocasionado pela ingestão de leucina, não por meio da ativação de vias de síntese, mas sim por meio da inibição de vias catabólicas, em particular a redução da atividade da via lisossomal, em que a digestão dos conteúdos proteicos ocorre dentro do lisossomo (autofagia) (31). Entretanto, um dos estudos de nosso laboratório constatou que a suplementação de leucina em animais com imobilização induzida, foi capaz de atenuar fortemente a perda de massa muscular através da redução da via proteolítica UPS, confirmada pela redução da expressão de atrogenes (MuRF-1 e MAFbx /Atrogin-1), e ainda conferir uma maior facilidade de recuperação muscular pós-desuso, principalmente na atenuação da diminuição da área de secção transversal (CSA) de fibras do tipo I, sem interferir na síntese protéica (32).

Embora esteja claro o efeito protetor de leucina, ainda não está bem estabelecido por quais mecanismos celulares este aminoácido exerce essa função.

1.3 O papel de GSK3- β na regulação de β -Catenina e NF κ B durante atrofia

Em estudo recente, Verhees et. al. (9) constataram que a presença de GSK3- β é essencial para a expressão gênica de MuRF-1, enquanto atrogin-1 requer a expressão do RNAm e a atividade enzimática de GSK3- β . GSK3- β pode ser considerada uma proteína chave no nosso trabalho, pois além de ser considerada uma enzima importante para o metabolismo da célula muscular, possui capacidade de integrar respostas metabólicas (via intracelular responsiva à insulina e glicose) e está relacionada também à proteínas intracelulares ligadas a expressão gênica, como β -Catenina (33). No músculo esquelético, GSK3- β pode ser inibida pela ativação da via Akt (34) e a diminuição citoplasmática dos níveis de GSK3- β ativados resulta na ativação da sinalização da via Wnt/ β -Catenina e no aumento da

expressão de genes alvos da Wnt/ β -Catenina (35). A ativação desta via inibe a formação de um complexo de multi-proteínas e a fosforilação de β -Catenina por GSK3- β . Como resultado, a β -Catenina se acumula e transloca-se para o núcleo, associando os fatores de transcrição da família TCF/LEF para a expressão de uma ampla gama de genes (36). Em culturas celulares, foi demonstrado que β -Catenina é capaz de regular várias proteínas miogênicas, como Myod e Myogenina (37). Além disso, há evidências de que β -Catenina desempenha um papel fundamental no controle da massa muscular esquelética (38-41). No entanto, os fatores que regulam β -Catenina no músculo esquelético ainda não foram completamente compreendidos. A literatura mostra que β -Catenina também pode interagir fisicamente e inibir o fator de transcrição NF-kappaB(NFkB) no citoplasma, desempenhando um importante papel na oncogênese e agindo como um fator anti-inflamatório (42-44). Recentemente, foi mostrado que a superexpressão de MuRF-1, durante a atrofia induzida por desuso, é controlada por NFkB e não por FoxO(45).

NF-kappaB (NFkB) é um fator nuclear, necessário para síntese de imunoglobulinas de cadeia leve *kappa* em linfócitos B e está presente em praticamente todos os tipos de células (46). Ao ser ativado este fator de transcrição transloca-se para o núcleo exercendo um papel fundamental na inflamação, devido a sua capacidade de induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios, como citosinas, quimiocinas e moléculas de adesão, sendo, portanto um fator crítico para ativação do processo imunológico (47, 48). Este complexo protéico possui duas principais subunidades: p65 (ou RelA) e p50 (NFkB1) (49, 50). Porém, são descritas outras subunidades, como p52 (NFkB2), c-Rel e RelB, que formam outros tipos de combinações não somente pela combinação de p65/p50 (46). A formação do complexo protéico de NFkB, é proveniente da junção dessas subunidades, que se dimerizam em diversas combinações para ativação de diferentes genes. Em contrapartida, à medida que a maioria dos dímeros constituídos ativa a transcrição gênica, a formação de homodímeros é capaz de reprimí-la (51). Essas subunidades possuem um domínio N-Terminal conhecido como domínio de homologia Rel (RHD) responsável pela sua ligação ao DNA, translocação, dimerização e associação com seu inibidor (I κ B) (52). NFkB está presente no citoplasma da maioria das células numa forma inativa, que é ligada a um inibidor de kappa B, I κ B (53). NFkB é liberado a partir da fosforilação/degradação de I κ B, e se transloca para o núcleo, onde regula

positivamente a transcrição de genes alvos (46). Existem quatro I κ Bs: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ e BCL-3(B cell leukemia-3), que são caracterizados pela presença de repetições de Ankirina (ANK) no seu C-Terminal, o que permite a interação de NF κ B via RHD, e assim, impede a exposição das sequências de sinal de localização nuclear (NLS), presentes no NF κ B, resultando no bloqueio da sua migração para o núcleo (52). São descritas duas vias distintas de ativação de NF κ B, a via canônica e a via não canônica. A via clássica ou canônica, está ligada à translocação de dímeros contendo C-Rel, RelA e p50, enquanto que a via não canônica, realiza a translocação de dímeros contendo as subunidades RelB e p52 (54). A literatura evidencia a ativação de uma via alternativa de NF κ B durante a atrofia por desuso envolvendo a ativação de p50 mas não da p65 (55). Hunter e colaboradores mostraram que durante a atrofia muscular induzida pelo desuso é necessária a ativação não só da P50, mas também de BCL-3. Além disso, estes autores também demonstram que animais com a deleção destes genes, possuem resistência a perda de massa muscular e diminuição da CSA (56).

BCL-3 (B cell leukemia-3) é um membro da família de I κ Bs e predominantemente reside no núcleo, porém, não é degradado com a ativação de NF κ B, como o restante dos inibidores e tem como alvo especificamente subunidade p50 (57). A relação entre BCL-3 e NF κ B é duplamente descrita, pois dependendo da sua fosforilação e concentração, BCL-3 pode agir não só como inibidor de NF κ B, mas também como um co-fator, através de sua associação com p50 (58). É também bastante evidenciada a relação entre BCL-3 e GSK3- β , pois BCL-3 serve como substrato para GSK3- β (59) assim, BCL-3 é fosforilado e deixa de inibir NF κ B que fica livre e se transloca para o núcleo. GSK3- β pode ao mesmo tempo, regular a estabilidade de NF κ B, através da fosforilação do precursor da p50, a p105 (60).

Contudo, diversos estudos relacionados à atrofia muscular e GSK3- β têm surgido, envolvendo também β -Catenina e NF κ B (9, 33-35, 55, 56, 61-63). Como já foi dito, a literatura demonstra que β -Catenina tem um importante papel no controle da massa muscular esquelética (38-41), além de poder inibir o fator de transcrição de atrogenes, NF κ B (42-44). Assim, neste trabalho formulamos a hipótese de que um dos mecanismos pelo qual leucina exerce seus efeitos anti-atróficos, pode se dar por meio da inibição da via GSK3- β / β -Catenina e sua cascata de ativação/inibição, durante a atrofia muscular induzida por imobilização.

6 CONCLUSÃO

Finalmente, em conclusão, podemos articular que ao usar um modelo de atrofia muscular esquelética de curto prazo, como a imobilização, encontramos uma regulação transitória da atividade de GSK3- β , que por sua vez, levou a uma redução da localização nuclear de β -Catenina. Leucina, por outro lado, foi capaz de aumentar a quantidade desta proteína no núcleo, ou seja, esse aminoácido pôde estimular a translocação nuclear de β -Catenina e como consequência, a expressão de genes alvo, como C-Jun foi aumentada. Por fim, estes resultados revelam um novo mecanismo pelo qual a leucina pode exercer seus efeitos anti-atróficos.

REFERÊNCIAS*

1. Lieber RL. *Skeletal Muscle - Structure, Function and Plasticity*. Second ed. Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins; 2002.
2. Junqueira LCC, J. *Histologia Básica*. Tenth ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2004.
3. Gartner LP, Hiatt JL. *Color atlas of histology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990.
4. Castro-Ferreira R, Fontes-Carvalho R, Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF. The role of titin in the modulation of cardiac function and its pathophysiological implications. *Arq Bras Cardiol*. 2011 Apr;96(4):332-9.
5. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses*. 2007;69(2):310-21.
6. Hall JEG, A. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
7. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Leger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch*. 2011 Mar;461(3):325-35.
8. Fareed MU, et al. Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogen-1/MAFbx and MuRF1 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Jun;290(6):R1589-97.
9. Verhees KJ, et al. Glycogen synthase kinase-3beta is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 Nov;301(5):C995-C1007.
10. Goll DE, Dayton WR, Singh I, Robson RM. Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J Biol Chem*. 1991 May 5;266(13):8501-10.
11. Bodine SC, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
12. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14440-5.
13. Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Jun;288(6):R1423-31.
14. Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. *Biochem J*. 1986 Feb 15;234(1):237-40.
15. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79.
16. Kaiser P, Huang L. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol*. 2005;6(10):233.
17. Crossland H, Constantin-Teodosiu D, Gardiner SM, Constantin D, Greenhaff PL. A potential role for Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle. *J Physiol*. 2008 Nov 15;586(Pt 22):5589-600.
18. Yamazaki Y, et al. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. *Biochem J*. 2010 Apr 1;427(1):171-8.
19. Zheng B, Ohkawa S, Li H, Roberts-Wilson TK, Price SR. FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogen-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *FASEB J*. 2010 Aug;24(8):2660-9.
20. Machida S, Booth FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. *Medicine and science in sports and exercise*. 2004 Jan;36(1):52-9.
21. Vanitallie TB. Frailty in the elderly: contributions of sarcopenia and visceral protein depletion. *Metabolism: clinical and experimental*. 2003 Oct;52(10 Suppl 2):22-6.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

22. Tom A, Nair KS. Assessment of branched-chain amino Acid status and potential for biomarkers. *The Journal of nutrition*. 2006 Jan;136(1 Suppl):324S-30S.
23. Shimomura Y, et al. Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. *The Journal of nutrition*. 2006 Jan;136(1 Suppl):250S-3S.
24. Moberg M, et al. Activation of mTORC1 by leucine is potentiated by branched-chain amino acids and even more so by essential amino acids following resistance exercise. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016 Jun 1;310(11):C874-84.
25. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr*. 2005 Mar;135(3):376-82.
26. Bolster DR, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *J Nutr*. 2004 Jul;134(7):1704-10.
27. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J Nutr*. 2000 Feb;130(2):139-45.
28. Koopman R, et al. Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men. *Am J Clin Nutr*. 2006 Sep;84(3):623-32.
29. Rieu I, et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol*. 2006 Aug 15;575(Pt 1):305-15.
30. Tipton KD, Elliott TA, Ferrando AA, Aarsland AA, Wolfe RR. Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009 Apr;34(2):151-61.
31. Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids*. 2009 Oct;37(4):609-16.
32. Baptista IL, et al. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle & nerve*. 2010 Jun;41(6):800-8.
33. Aschenbach WG, et al. Regulation of dishevelled and beta-catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced GSK-3beta signaling pathway. *American journal of physiology*. 2006 Jul;291(1):E152-8.
34. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.
35. Li C, et al. Sensitization of glioma cells to tamoxifen-induced apoptosis by PI3-kinase inhibitor through the GSK-3beta/beta-catenin signaling pathway. *PLoS One*. 2011;6(10):e27053.
36. Kockeritz L, Doble B, Patel S, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3--an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug Targets*. 2006 Nov;7(11):1377-88.
37. Ridgeway AG, Petropoulos H, Wilton S, Skerjanc IS. Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):32398-405.
38. Leal ML, et al. Effect of different resistance-training regimens on the WNT-signaling pathway. *Eur J Appl Physiol*. 2011 Oct;111(10):2535-45.
39. Sakamoto K, Arnolds DE, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jun 25;319(2):419-25.
40. Tanaka S, Terada K, Nohno T. Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells. *J Mol Signal*. 2011 Oct 05;6:12.
41. Schakman O, et al. Role of Akt/GSK-3beta/beta-catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology*. 2008 Aug;149(8):3900-8.
42. Deng J, et al. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell*. 2002 Oct;2(4):323-34.
43. Umar S, Sarkar S, Wang Y, Singh P. Functional cross-talk between beta-catenin and NFkappaB signaling pathways in colonic crypts of mice in response to progastrin. *J Biol Chem*. 2009 Aug 14;284(33):22274-84.
44. Liu K, et al. Defective CFTR- beta-catenin interaction promotes NF-kappaB nuclear translocation and intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Oncotarget*. 2016 Aug 31.

45. Wu CL, Cornwell EW, Jackman RW, Kandarian SC. NF-kappaB but not FoxO sites in the MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Apr 15;306(8):C762-7.
46. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
47. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.
48. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dec;1(6):a001651.
49. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*. 1996 Oct 4;87(1):13-20.
50. Siebenlist U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Feb 22;1332(1):R7-13.
51. Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular cell*. 2002 Mar;9(3):625-36.
52. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
53. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*. 1988 Oct 28;242(4878):540-6.
54. Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):71-85.
55. Hunter RB, et al. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J*. 2002 Apr;16(6):529-38.
56. Hunter RB, Kandarian SC. Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1504-11.
57. Wulczyn FG, Naumann M, Scheidereit C. Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. *Nature*. 1992 Aug 13;358(6387):597-9.
58. Herrington FD, Nibbs RJ. Regulation of the Adaptive Immune Response by the IkappaB Family Protein Bcl-3. *Cells*. 2016;5(2).
59. Viatour P, et al. GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Molecular cell*. 2004 Oct 8;16(1):35-45.
60. Demarchi F, Bertoli C, Sandy P, Schneider C. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):39583-90.
61. Jackman RW, Cornwell EW, Wu CL, Kandarian SC. Nuclear factor-kappaB signalling and transcriptional regulation in skeletal muscle atrophy. *Exp Physiol*. 2013 Jan;98(1):19-24.
62. Jackman RW, Wu CL, Kandarian SC. The ChIP-seq-defined networks of Bcl-3 gene binding support its required role in skeletal muscle atrophy. *PLoS One*. 2012;7(12):e51478.
63. Lee D, Goldberg AL. Muscle Wasting in Fasting Requires Activation of NF-kappaB and Inhibition of AKT/Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) by the Protein Acetylase, GCN5. *J Biol Chem*. 2015 Dec 18;290(51):30269-79.