GRACIELLE VIEIRA RAMOS

**EFEITO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO (T3) SOBRE A
EXPRESSÃO DA E3 LIGASE MDM2 E SUAS IMPLICAÇÕES
NA REGULAÇÃO DO TROFISMO MUSCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutora em
Ciências

São Paulo
2014

GRACIELLE VIEIRA RAMOS

**EFEITO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO (T3) SOBRE A
EXPRESSÃO DA E3 LIGASE MDM2 E SUAS IMPLICAÇÕES
NA REGULAÇÃO DO TROFISMO MUSCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ramos, Gracielle Vieira.

Efeito do hormônio tireoidiano (T3) sobre a expressão da E3 ligase Mdm2 e suas implicações na regulação do trofismo muscular / Gracielle Vieira Ramos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia celular e molecular do músculo estriado.

Versão do título para o inglês: Effects of thyroid hormone (T3) on Mdm2 E3 ligase expression and its implications in the muscle trofism regulation.

1. Tecido muscular 2. Atrofia 3. T3 4. E3 ligase 5. Mdm2 I. Moriscot, Prof. Dr. Anselmo Sigari II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB093/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gracielle Vieira Ramos.

Título da Tese: Efeito do hormônio tireoidiano (T3) sobre a expressão da E3
ligase Mdm2 e suas implicações na regulação do trofismo
muscular.

Orientador(a): Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEEA.015/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 168/05/CEEA, datado de 23.02.05 e por solicitação do Prof. Dr. *Anselmo Sigari Moriscot*, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos *Gracielle Vieira Ramos* e *Andrei Rozanski* ao Projeto de Pesquisa "*Aspectos estruturais e moleculares da plasticidade muscular*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 05 de abril de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

À Deus que tem direcionado minha trajetória todos estes anos e que tem me dado suporte para galgar novas conquistas.

Aos meus pais e irmãos por estarem sempre de prontidão para me reerguer diante das minhas fraquezas e dificuldades. Obrigada pelas sábias palavras de conforto e compreensão, pelo apoio e companheirismo e por acreditar na minha capacidade de aperfeiçoamento diante do novo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me direcionar e por tornar possível mais esta conquista na minha vida.

À minha família, pais, irmãs e cunhados por me apoiarem e entenderem meus momentos de ausência em prol de um bem maior.

À Melissa por estar ao meu lado todos os dias, independente das dificuldades. Obrigada pela compreensão e apoio para que pudesse adquirir e compartilhar mais essa vitória na minha vida.

Aos meus amigos de São Paulo que hoje são minha segunda família e que estiveram ao meu lado em todos os momentos de turbulência e felicidade nessa trajetória. Obrigada pelo companheirismo, pela felicidade extrema e por me ajudar a enxergar a vida de uma forma mais divertida.

Aos meus amigos mais distantes, que mesmo não estando presente em todos os momentos contribuíram igualmente para que pudesse obter mais essa vitória.

Ao meu amigo Rodrigo que me deu todo o suporte para que pudesse colher os frutos de hoje.

À Sir, que vem acompanhando toda minha jornada, e que foi imprescindível para que pudesse obter a maturidade e formação que tenho atualmente.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pelas boas risadas, ensinamentos, colaboração e auxílio diante das dificuldades e acertos no cotidiano daquele ambiente de pesquisas e descobertas. Em especial ao Igor pela paciência em me ensinar, mostrar e por me ajudar a compreender e tornar atraente e apaixonante esse mundo intrigante que é a biologia molecular.

Ao meu orientador Anselmo Sigari Moriscot pela oportunidade, ensinamentos e experiências repassadas durante estes 4 anos de doutorado. Obrigada pela receptividade e pela confiança depositada para que pudesse desenvolver e aprimorar minha formação.

À Universidade de São Paulo e especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida para a realização deste projeto (2010/50321-0).

A todos os meus amigos e todas as pessoas que fazem ou fizeram parte da minha vida e que, de uma forma ou de outra me auxiliaram e possibilitaram que esse longo caminho fosse trilhado.

RESUMO

RAMOS, G. V. **Efeito do hormônio tireoidiano (T3) sobre a expressão da E3 ligase Mdm2 e suas implicações na regulação do trofismo muscular.** 2014. 61f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Estudos preliminares através de microarray nos mostraram que a E3 ligase Mdm2 foi regulado positivamente no músculo de animais hipertireoideos. Dessa forma, nós inferimos uma possível relação de Mdm2 com a atrofia causada por T3. Para testar nossa hipótese, ratos foram induzidos ao hipertireoidismo para análises subsequentes. Concomitante com a perda de massa muscular foi confirmado um aumento da expressão de Mdm2 tanto no nível gênico ($p < 0.05$) quanto protéico. Interessantemente, Mdm2 foi preferencialmente expresso em fibras tipo I, mostrando maior sensibilidade dessas fibras ao T3. Além disso, foi observado uma diminuição severa na expressão de Pax7/MyoD associado à superexpressão de Mdm2, sugerindo inatividade das células satélites. Surpreendentemente, a inibição de Mdm2 em miotubos cultivados provocou uma diminuição severa no diâmetro destes (~35%, $p < 0.05$), ou seja, tal inibição foi incapaz de minimizar a proteólise muscular causada por T3. Portanto, nós concluímos que a responsividade de Mdm2 ao T3 agiria como um mecanismo compensatório numa tentativa de minimizar a proteólise muscular causada pelo hipertireoidismo. Esta conclusão é reforçada pela atrofia observada em miotubos durante a inibição de Mdm2 sem a presença de T3.

Palavras-chave: Tecido muscular. Atrofia. T3. E3 ligase. Mdm2

ABSTRACT

RAMOS, G. V. Effects of thyroid hormone (T3) on Mdm2 E3 ligase expression. and its implications in the muscle trofism regulation. 2014. 61f. Ph.D. Thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Previous studies in our lab through microarray assay observed Mdm2, an E3 ligase, up regulated in soleus muscle from hyperthyroid rats. In this sense, we inferred that Mdm2 could be related to muscle atrophy caused by T3. To test our hypothesis, rats were induced to experimental hyperthyroidism for subsequent analysis. Along the muscle mass loss, the increase on Mdm2 gene expression was confirmed ($p<0.05$) as well as protein expression by RT-PCR and Western Blot, respectively. Interestingly, Mdm2 was expressed predominantly in fiber I type during T3 treatment, demonstrating a higher sensibility when compared to type II fiber. Moreover, it was observed a severe decrease in Pax7/MyoD labeling, associated to an increase on Mdm2 labeling, suggesting that T3 could be associated with inactivation of satellite cells. Surprisingly, Mdm2 inhibition in myotubes have induced severe decrease on myotubes diameter (~35%, $p<0.05$), in other words, Mdm2 inhibition was not able to decrease muscle proteolysis during high levels of T3. Thus, the increase on Mdm2 levels could be a compensatory effect to reduce the muscle mass loss during T3 treatment. This conclusion is highlighted by the myotubes atrophy observed during the Mdm2 inhibition without T3 treatment.

Key Words: Skeletal muscle. Atrophy. T3. E3 Ligase. Mdm2

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 HIPERTIREOIDISMO E OS MECANISMOS MOLECULARES DA AÇÃO DO T3.....	14
1.2 O HIPERTIROIDISMO E SUA RELAÇÃO COM O TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.....	18
1.3 O HIPERTIROIDISMO E A VIA UBIQUITINA-PROTEASSOMA	19
1.4 MDM2 E O MÚSCULO ESQUELÉTICO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
3.2 REALIZAÇÃO DO MICROARRAY NO SÓLEO DE ANIMAIS CONTROLE E TRATADO.....	29
3.2.1 ISOLAMENTO DO RNA TOTAL	29
3.2.2 SÍNTESE DE CDNA	29
3.2.3 PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO DA Sonda.....	30
3.2.4 FASE DE LEITURA E ANÁLISE DE DADOS OBTIDOS PELO MICROARRAY	30
3.2.5 PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DOS DADOS ADQUIRIDOS PELO MICROARRAY	31
3.2.6 ANÁLISE QUALITATIVA	32
3.2.7 ANÁLISE EXPLORATÓRIA	32
3.3 VALIDAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	33
3.4 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA	34
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE T4 NO SORO	35
3.6 WESTERN BLOT	35
3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA	36
3.8 HISTOQUÍMICA MUSCULAR.....	38
3.9 ABORDAGEM IN VITRO	38
3.9.1 CULTURA PRIMÁRIA DE MIOBLASTOS	38
3.10 MENSURAÇÃO DOS MIOBASTOS.....	40
3.11 EXTRAÇÃO DE RNA DOS MIOBASTOS	41
A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE RNAM POR RT-PCR DOS MIOBASTOS CULTIVADOS FOI EFETUADA ATRAVÉS DA EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL PELO REAGENTE TRIZOL (INVITROGEN, CARLSBAD, CALIF.) SEGUINDO AS NORMAS E RECOMENDAÇÕES DO FABRICANTE.	41
3.12 OUTROS MODELOS DE ATROFIA.....	41
3.12.1 IMOBILIZAÇÃO	42
3.12.2 DEXAMETASONA	42
3.12.3 JEJUM	42
4 RESULTADOS	43
4.1 DADOS GERAIS	43

4.2 ANÁLISE GLOBAL DOS GENES RESPONSIVOS AO T3 QUE ATUAM EM VIAS PROTEOLÍTICAS ATRAVÉS DO MICROARRAY	44
4.3 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE MDM2	47
4.4 MDM2 É INDUZIDO POR T3 EM FIBRAS TIPO I	51
4.4 MDM2 CO-LOCALIZA COM MIONUCLEOS.....	52
4.5 MDM2 TEM UM PAPEL CHAVE NO TROFISMO DE MIOTUBOS	54
5 DISCUSSÃO	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS*	67

APRESENTAÇÃO

A estrutura dessa tese foi organizada por numeração progressiva das seções de um documento de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT-NBR 6024). Esta sistematização teve o objetivo de facilitar o entendimento das ideias propostas durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

A atrofia muscular causada pelo hipertireoidismo tem sido evidenciada desde a década 80, onde alguns pesquisadores demonstraram que doses elevadas de T3 provocava um aumento da degradação proteica no músculo esquelético¹. Entretanto, os mecanismos moleculares relacionados à perda de massa muscular provocada por T3 ainda é pouco estabelecida. Recentemente foi demonstrado que os atrogenes Atrogin/MuRF1 também são modulados em animais hipertireoideos², sugerindo o envolvimento dos mesmos na perda de massa muscular desses animais. Entretanto, é improvável que Atrogin e MuRF1 sejam as únicas E3 ligases responsáveis pela modulação da massa muscular decorrente da ubiquitinação de proteínas. Neste sentido, a caracterização bem como o entendimento da funcionalidade de outras E3 ligases potencialmente reguladas no músculo esquelético precisam ser exploradas, na tentativa de se obter um melhor entendimento da importância dessas "novas" E3 na regulação da massa muscular.

Através do modelo experimental utilizado no presente trabalho nós demonstramos que apesar do T3 provocar uma proteólise muscular acelerada decorrente de doses suprafisiológicas, também é acionado em paralelo outra E3 ligase conhecida como Mdm2 (*murine double minute 2*) que age de forma contrária aos atrogenes numa tentativa de minimizar a atrofia muscular decorrente de doses elevadas de T3. Vale salientar que estes dados já foram compilados em um manuscrito e está em fase de preparação para submissão do mesmo ao "*Journal of Molecular Endocrinology*".

1 INTRODUÇÃO

O tecido muscular esquelético representa aproximadamente 50% da massa corporal total, sendo assim caracterizado como o tecido mais abundante do organismo. É um tecido plástico altamente adaptável, que responde a estímulos tanto ambientais e/ou fisiológicos como: stress mecânico, disponibilidade de nutrientes, estimulação hormonal, inatividade e lesão que por sua vez irão impactar diretamente no fenótipo do músculo através de modificações tanto em termos de tamanho, no que diz respeito à quantidade de massa quanto de composição, devido à modificação do conteúdo das proteínas contráteis MHC (myosin have chain) que determina os diferentes tipos de fibra existentes no músculo.^{3; 4 5; 6}. Funcionalmente, o músculo esquelético tem suma importância na realização de numerosas atividades no organismo tais como: manutenção da postura, execução de movimentos articulares, locomoção bem como ventilação dos pulmões através dos músculos respiratórios⁷. Metabolicamente, o músculo esquelético também tem sua importância agindo como armazenador de glicose na forma de glicogênio, importante substrato energético durante o exercício⁸.

O músculo esquelético também tem seu papel na manutenção da qualidade de vida bem como no aumento da expectativa de vida em idosos. Nestes indivíduos existe uma forte associação entre redução da massa muscular, inaptidão e mortalidade, devido a um declínio da habilidade do idoso em executar tarefas ou atividades do dia a dia, como por exemplo, subir escadas, tomar banho, vestir-se, caminhar, etc. Este quadro de limitação pode levar à predisposição de doenças e risco de quedas, culminando na diminuição da expectativa de vida. Outros aspectos também estão associados à perda de massa

muscular como distúrbios psicossociais e diminuição da auto-estima^{9; 10}. Desta forma fica claro que a manutenção da massa muscular não resulta em benefícios somente relacionados à motricidade ou manutenção postural, ela também se torna fundamental para o bem estar mental e social.

No que diz respeito ao trofismo muscular, é sabido que a manutenção da massa muscular depende de um equilíbrio entre a síntese (anabolismo) e degradação de proteínas (catabolismo), processos estes hoje bem estudados e regulados por diversas vias intracelulares. Como exemplo destas vias nos processos anabólicos destaca-se a via estimulada pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF/AKT/mTOR), que age em prol do aumento da síntese protéica^{11; 12}. Já nos processos catabólicos, a estimulação de vias proteolíticas tais como o sistema clássico ubiquitina-proteassoma, tem a função de regular a degradação das mesmas¹³. Nesse sentido, é possível inferir que qualquer desequilíbrio entre ambos os sistemas pode ter consequências no trofismo muscular. Um quadro clínico clássico observado pelo desequilíbrio entre os fatores anabólicos e catabólicos é a atrofia muscular, que a partir de agora daremos mais enfoque no presente texto.

A atrofia muscular é uma condição clínica caracterizada pela perda de massa muscular. Este quadro clínico pode ser causado pela supressão da síntese protéica ou aumento da degradação nas células musculares, que progressivamente observar-se-á redução da área de secção transversal bem diminuição do trofismo muscular^{14; 15}. Um estudo demonstrou que a atrofia muscular tanto em idosos quanto em jovens pode causar mudanças na contratilidade muscular, bem como alterações no grau de ativação neural e

arquitetura, prejudicando enfim o desempenho do músculo e consequentemente do indivíduo ¹⁶. Neste sentido, numerosos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de se obter um melhor entendimento da atuação tanto de vias anabólicas e catabólicas no tecido muscular, na medida em que se possa buscar recursos ou terapias para o melhor funcionamento e preservação deste sistema.

A perda de massa muscular pode ocorrer em consequência de vários processos patológicos como: denervação, lesão, imobilização, acamamento, câncer, idade, sepse e alterações hormonais ¹⁵. Dentre as alterações hormonais, daremos neste estudo destaque ao hipertireoidismo, condição esta que também está associada à atrofia muscular.

1.1 Hipertireoidismo e os Mecanismos moleculares da ação do T3

O hipertireoidismo é uma doença causada por um desequilíbrio funcional da glândula tireóide, glândula endócrina de grande importância para o bom funcionamento do organismo. Esta glândula é formada por dois lobos que se localizam na parte anterior do pescoço à frente da traquéia. É uma doença caracterizada pela produção excessiva de 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T4) ou 3,5,3'-triiodotironina (T3) ou ambos, hormônios estes sintetizados e secretados pela tireóide. São hormônios que tem ações biológicas em praticamente todos os tecidos do corpo humano, sendo estes responsáveis pela regulação de importantes mecanismos fisiológicos que ocorrem no interior da célula como: atividade metabólica, proliferação, diferenciação e apoptose, ¹⁷.

No que diz respeito à concentração de hormônio circulante no plasma sabe-se que o T4 é aproximadamente 45 vezes maior que o de T3, este último considerado a forma biologicamente ativa. Uma importante fonte de produção de

T3 ocorre através da conversão de T4 em T3, em consequência da desiodação de T4 promovida pelas desiodases nos tecidos periféricos. A livre circulação destes hormônios no organismo é pequena, somente 0,03% de T4 e 0,3% de T3, visto que a grande parte circula associada a proteínas plasmáticas. Esta ligação aumenta a meia-vida destes hormônios assegurando uma melhor distribuição dos mesmos nos tecidos alvos. A entrada e saída do hormônio tireoidiano nas células ocorrem em menor proporção por difusão passiva. Este processo é realizado principalmente por transportadores de membrana específicos que tem a função de regular o influxo e efluxo deste hormônio na célula ¹⁸.

Consta na literatura que as ações de T3 no interior da célula podem ser promovidas tanto por vias genômicas quanto não-genômicas. As ações não-genômicas de T3 na célula ainda são pouco conhecidas, entretanto há evidências que seus efeitos ocorrem em segundos os quais estão relacionados com a ativação de quinases, captação de glicose e transporte de cálcio ¹⁹. Apesar do T3 ter a capacidade de agir em vias não genômicas, os efeitos biológicos são atingidos predominantemente através das vias genômicas através da ativação de fatores de transcrição denominados receptores do T3 (THR) que se encontram no núcleo das células ^{20; 21}.

Os THRs pertencem à superfamília de receptores nucleares os quais tem a função de agir como reguladores transcricionais dependente de ligante. Dentre estes receptores destacam-se os receptores do ácido retinóico, vitamina D, ácidos graxos e prostaglandinas bem como "receptores órfãos", denominação dada devido a não identificação, até o momento, de seus ligantes. Estruturalmente, os receptores nucleares têm uma organização similar. Os domínios de ativação

transcricional independente de ligante encontram-se na região amino-terminal, região esta conhecida como fator de ativação 1 (AF1). Nesta região encontra-se também o domínio zinc-finger, que é bem conservado entre os membros desta família, os quais têm a função de ligar a sequências específicas do DNA conhecidas como elementos responsivos. Já na região carboxi-terminal localiza-se os domínios responsáveis pela homodimerização e heterodimerização do receptor com proteínas correpessoras e coativadoras. Também se encontra nesta região o domínio de localização nuclear. Outro domínio situado nesta região é o de ligação do ligante do receptor, que tem suma importância na regulação transcricional dependente de ligante, sendo assim esta região foi denominada fator de ativação 2 (AF2) (Figura 1).

Figura 1 - Desenho esquemático simplificado modificado da estrutura primária dos receptores nucleares representando os seus domínios funcionais e fatores de ativação: domínio amino-terminal (NH2); domínio de ligação ao DNA (DBD); dobradiça (H); domínio de ligação ao ligante (LBD) e suas respectivas funções. Fator de ativação 1 (AF1); fator de ativação 2 (AF2). Fonte: Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoideano. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2004;48:1, 25-39. Barra e colaboradores.

Uma vez ligado ao T3, os THR's vão interagir com elementos responsivos do hormônio tireoidiano (THREs) que são formados predominantemente por sequências consenso, normalmente organizadas como repetições palindrômicas

do hexâmero AGGTCA localizados na região promotora de genes alvos, que formando o complexo T3-THR-THRE, tem a função de regular a transcrição destes genes ²².

Conforme pode ser observado pela figura 2, na ausência do ligante, neste caso o T3, os THRs ligam-se aos THREs como homodímeros ou heterodímeros associados à proteínas correpessoras (Figura 2A). Esta interação permite a compactação da cromatina na região promotora, incapacitando a maquinaria de transcrição basal (MTB) iniciar a transcrição de genes alvos. Já na presença do ligante, os TRs sofrem uma mudança conformacional, dissociando as proteínas correpessoras dos homodímeros (THR/THR). Esta dissociação permite a interação dos THRs com o receptor X da retinóide (RXR) formando heterodímeros e também com proteínas coativadoras, que por sua vez vão permitir o relaxamento da cromatina na região promotora. Esta interação tem o intuito de recrutar a MTB, ativando enfim a transcrição de genes responsivos ao T3 (Figura 2B) ¹⁸.

Figura 2 – Desenho esquemático modificado do mecanismo de ação dos receptores de T3 (THRs) na região promotora de genes alvos. (A) Repressão da transcrição; (B) Ativação da transcrição. Fonte: Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoideano. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2004;48:1, 25-39. Barra e colaboradores.

De uma forma geral, os vertebrados contêm dois diferentes genes que codificam os receptores do hormônio tireoidiano (THRs), α e β . Os genes correspondentes aos THRs durante o processo de transcrição podem sofrer *splicing* alternativo gerando diferentes isoformas de THRs. Há várias isoformas de THRs descritas, as quais são codificadas por 2 genes (THRa e THRb) localizados nos cromossomos 17 e 3 respectivamente em humanos. O gene THRa codifica as variantes THRa1 e THRa2, sendo que a última não se liga ao T3. Já o gene THRb codifica 3 isoformas funcionais, THRb1, THRb2 e THRb3 e uma isoforma truncada denominada de THR Δ b3¹⁷. As isoformas de THRs embora presentes em quase todos os tecidos humanos, são diferentemente expressos dependendo do tipo celular, entretanto, no músculo esquelético a isoforma THRa1 é a mais abundante¹⁸.

1.2 O hipertireoidismo e sua relação com o tecido muscular esquelético

No músculo esquelético doses elevadas de T3 podem notoriamente causar proteólise muscular, contribuindo de fato para o quadro atrófico observado em animais hipertireoideos^{2; 23}. Também é bem estabelecida na literatura a atuação do T3 como um potente modificador do fenótipo da fibra muscular, agindo na conversão do tipo de fibras. Estudos realizados desde 1981 já mostravam que doses moderadas de T3 eram efetivas na conversão de fibras musculares tipo I para tipo II. Nestes estudos já era demonstrado também a redução da massa muscular decorrente de doses elevadas de T3^{23; 24}. Nesta época alguns estudiosos evidenciaram que a perda de massa muscular causada pelo hipertireoidismo estava relacionada com um aumento na degradação de proteínas miofibrilares mensurada através da liberação de aminoácidos *in vitro*, embora,

uma redução na síntese de proteínas também poderia contribuir com a evolução do quadro atrófico ¹. No entanto, ainda não está bem estabelecido quais processos moleculares participam ativamente na proteólise muscular dependente de T3.

A literatura tem mostrado que a proteólise dependente do sistema ubiquitina-proteassoma é um importante mecanismo ativo no desenvolvimento da atrofia muscular em diversas condições catabólicas ¹⁴. A expressão aumentada de E3 ligases específicas do músculo, Atrogin-1 e MuRF1, conhecidos como atrogenes, tem sido notada em músculos atroficos. O primeiro indicativo da perda de massa muscular ocasionada por T3 através da via ubiquitina-proteassoma foi em 1997 por Tawa e colaboradores. Neste estudo observou-se uma redução de 40-70% da proteólise muscular induzida por T3 ao utilizar inibidores que bloqueiam a atividade proteassomal ²⁵. Através deste trabalho foi possível inferir que a regulação do hormônio tireoideano no catabolismo do músculo esquelético pode estar correlacionada com a regulação da expressão de genes que participam ativamente no funcionamento deste sistema.

1.3 O Hipertireoidismo e a Via Ubiquitina-Proteassoma

A via ubiquitina-proteassoma é um dos principais sistemas atuantes na proteólise muscular, no qual se diferencia dos outros sistemas proteolíticos devido a sua dependência em ATP ²⁶. Em 1980 estudos já mostravam que o bloqueio de proteases lisossomais bem como de calpaínas causavam uma diminuição de apenas 10% a 20% da degradação de proteínas, sendo que este bloqueio não impedia a degradação de proteínas contráteis. A via ubiquitina-proteassoma é mediada por uma cascata multienzimática no qual se têm como produto final, a

sinalização de proteínas alvo a serem degradadas. A ubiquitinação do substrato para que este possa ser degradado envolve 3 etapas: (1) ativação da ubiquitina pela enzima E1; (2) conjugação da ubiquitina pela enzima E2; (3) ubiquitinação da proteína alvo por meio da enzima E3-ligase ²⁷. A ubiquitinação da proteína alvo permite seu reconhecimento pelo proteassoma 26S que têm a função de degradar a proteína sinalizada.

Em todos os tecidos, a maioria das proteínas intracelulares é degradada pelo sistema ubiquitina-proteassoma. No entanto, outros sistemas proteolíticos também contribuem para o processo de degradação de proteínas que inicialmente não podem ser degradadas pelo sistema proteassomal ou que não são sinalizadas pelo mesmo. Dentre estes sistemas temos: calpains, caspases e lisossomos. Proteínas extracelulares e algumas proteínas de membrana são captadas por endocitose e degradadas intracelularmente pelos lisossomos. Algumas proteínas que se encontram no citoplasma também podem ser degradadas pelos lisossomos após elas serem envolvidas por vacúolos autofágicos que se fundem aos lisossomos. Este processo é ativado na maioria das vezes devido à falta de insulina ou aminoácidos essenciais. Já o processo proteolítico que envolve a ativação das calpaínas depende de altas concentrações de Ca^{+2} . Estas proteases parecem ser ativadas quando as células sofrem alguma injúria. Desse modo, elas podem desenvolver um importante papel na lesão tecidual, necrose e autólise. Um outro grupo de proteases que participa do processo de degradação são as caspases, estas responsáveis pela regulação da apoptose celular {Lecker, 2006 #34}. Visto a complexidade e a possibilidade de participação das diversas vias de degradação supracitadas, estudos posteriores que buscam um melhor entendimento da interação bem como a ativação das mesmas em conjunto com o

sistema proteassomal são de suma importância visto que estudos já demonstraram que a degradação de proteínas miofibrilares necessita de mecanismos adicionais para auxiliar o proteassoma 26S na degradação do complexo de proteínas miofibrilares formado principalmente pela actina, miosina, troponina e tropomiosina (85, 92).

A ativação do sistema ubiquitina-proteassoma ocorre em diversos quadros atróficos como imobilização, sepse, denervação ¹⁵. O'Neal e colaboradores ² em 2009 mostraram a modulação desta via após administrações suprafisiológicas de T3. Neste estudo notou-se que os níveis de RNAm (RNA mensageiro) de Atrogin e MuRF1 aumentaram duas vezes mais em apenas 3 dias de tratamento com T3, sugerindo então sua participação no processo de degradação. Porém, há indicativos de outras centenas de E3-ligases, que ainda não foram exploradas mas que necessitam ser investigadas ²⁸.

Dados provenientes de um ensaio de Microarray do músculo sóleo de ratos tratados com T3 em nosso laboratório indicou que dentre os genes analisados atuantes em todas as vias proteolíticas (lisossomal, calpaínas, catepsinas, ubiquitina-proteassoma), o sistema proteassomal correspondeu à aproximadamente 57% das respostas em relação às outras vias proteolíticas analisadas. Dentre os componentes da via proteassomal que foram modulados por T3, 64% correspondiam às E3-ligases, que conforme dito anteriormente são responsáveis pela marcação do substrato para degradação pelo proteassoma 26S (Tabela 2). Dentre as E3 ligases analisadas, uma chamou nossa atenção, conhecida como *murine double minute 2* (Mdm2). Mdm2 foi a que mais respondeu consistentemente ao tratamento por T3 após validação por Reação em Cadeia da

Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). A expressão do RNAm desta “nova E3” responsiva ao T3 foi 2 vezes maior em 7 dias de tratamento vs. controle. Neste sentido nós decidimos focar nossas investigações sobre esta “nova E3” visto que há pouquíssimo estudos elucidando o papel funcional desta proteína no tecido muscular.

1.4 Mdm2 e o Músculo esquelético

O Mdm2 é um oncogene que se encontra amplificado em diversos tipos de sarcomas. Estudos prévios mostraram que a expressão aumentada de Mdm2 foi primeiramente localizado em corpos nucleares extra-cromossômicos denominados *double minutes* que se encontravam em células tumorais de fibroblastos de camundongo denominadas 3T3DM, transformadas espontaneamente. Nesta época Oliner et al, 1992 mostraram que a amplificação de Mdm2 estava presente em 30% dos sarcomas. Hoje já se sabe que a expressão aumentada de Mdm2 está relacionada com o crescimento de células tumorais através da sua interação com diversas proteínas regulatórias do ciclo celular, principalmente o supressor tumoral p53, um limitador chave do ciclo celular (Momand et al, 2000; Boesten et al, 2006).

Estruturalmente, o gene Mdm2 é formado por 12 exons que pode codificar isoformas distintas. A região regulatória de Mdm2 é formada por dois promotores distintos, sendo o segundo promotor responsável pela responsividade ao supressor tumoral p53 devido à presença de dois elementos responsivos. Esses promotores geram duas proteínas de Mdm2, uma de 90KDa e outra de 76KDa. Uma proteína mais longa de Mdm2 (90KDa) que é formada por 489 aminoácidos é traduzida no primeiro códon de iniciação ATG que se encontra no exon 3. Já

uma proteína mais curta de Mdm2 (76KDa) é traduzida a partir do segundo ATG que se encontra no exon 4 (Figura 3A). Numerosas variantes de Mdm2 oriundas de splicing alternativo também já foram observadas em alguns estudos tumorais de camundongo e humanos. Estas variantes muitas das vezes competem com a Mdm2 que apresenta o comprimento total (90KDa) impedindo-a de realizar sua função como reguladora negativa de p53. A proteína mais longa de Mdm2 (90KDa) é formada por alguns domínios funcionais, conforme pode ser observado na Figura 3B, sendo estes: NLS (sinal de localização nuclear) e NES (sinal de exportação nuclear), estes sinais são responsáveis pela translocação de Mdm2 entre o núcleo, função de suma importância para a regulação da atividade de p53. Entre a região de 464-471 aminoácidos encontra-se o motif de localização de nucleolar de significância biológica ainda desconhecida. Há também a presença de um domínio ácido central que interage com a proteína ribossomal L5 e com a proteína p300. *Downstream* ao domínio ácido encontra-se o domínio zinc finger de função ainda também desconhecida. Finalmente à frente do domínio zinc finger encontra-se o domínio RING, este importante para a função de E3 ligase de Mdm2 {Iwakuma, 2003 #52}.

Em condições fisiológicas o Mdm2 tem um papel crucial na sobrevivência da célula, visto que uma de suas principais funções é manter o p53 em níveis adequados. A função regulatória de Mdm2 exercendo ação supressora sobre p53 pode ocorrer através de 3 mecanismos: a) ligando-se ao domínio de ativação de p53. Esta ligação impede a ativação transcricional de genes que são modulados por este fator de transcrição; b) agindo como uma E3 ligase. Esta interação torna p53 alvo para a degradação proteassomal; c) atua na exportação de p53 do

núcleo, aumentando o transporte da proteína p53 para o citoplasma. Esse processo é necessário para que p53 seja degradado {Zhao, 2014 #41}.

Figura 3: Desenho modificado da estrutura da proteína e do gene Mdm2. (A) Estrutura gênica de Mdm2 representada por 12 exons que correspondem às caixas cinzas numeradas em algarismos romanos e 2 elementos responsivos para p53 no primeiro intron representada pelos quadrados menores que se encontram entre os exons I e II. Duas regiões promotoras são representadas pelas setas à esquerda. Mdm2 total p90 é traduzido a partir do primeiro codon de iniciação ATG (exon 3). A forma mais curta de Mdm2, p76, é traduzido à partir do segundo ATG (exon 4). Dois splicins alternativos principais do gene Mdm2 humano são mostrados, Mdm2-A e Mdm2-B. (B) Representação do Mdm2 total e seus motivos: NLS (sinal de localização nuclear); NES (sinal de exportação nuclear); Zn-finger (domínio zinc-finger); NoLS (sinal de localização nucleolar); RING-finger (domínio RING finger). Fonte: Mdm2, An Introduction. *Molecular Cancer Research*. 2003;1:993-1000. Iwakuma, T e Lozano, G.

Existe um mecanismo de retroalimentação entre Mdm2 e p53 no qual p53 regula a transcrição de Mdm2, enquanto Mdm2 é responsável pela diminuição dos níveis da proteína p53 através da sua ubiquitinação²⁹. Este mecanismo tem suma importância uma vez que níveis elevados de p53 podem causar atraso no ciclo celular e apoptose^{30; 31}.

Alguns estudos já mostraram que a inativação de Mdm2 é letal em camundongos^{32; 33}. Estes trabalhos mostraram que a letalidade desses animais está associada com níveis elevados de p53. Interessantemente, trabalhos subsequentes mostraram que a deleção de p53 nos animais *knockdown* para Mdm2 reduziu fortemente a letalidade.³⁰. Todavia, estes trabalhos nos mostraram

que a manutenção de Mdm2 em níveis fisiológicos é fundamental para a função celular³⁴.

Os fatores de transcrição FoXO também foi encontrado ser alvo de Mdm2. Foi sugerido que Mdm2 age *downstream* de p53, promovendo a degradação dos fatores FoXO através de sua ubiquitinação³⁵. A ubiquitinação de FoXO por Mdm2 também foi encontrada no músculo esquelético de camundongos submetidos à denervação³⁶. Neste estudo foi mostrado que a inibição do Mdm2 por RNA de interferência induziu um acúmulo endógeno de FoXO3a bem como aumento da expressão de genes alvos dependente de FoXO, como Atrogin. Através desses trabalhos é possível sugerirmos que Mdm2 aja como um regulador positivo da massa muscular esquelética. Nesse sentido, o objetivo principal do presente estudo foi analisar a relação entre a expressão de Mdm2 e o trofismo muscular regulado por T3. Todavia, após análises subsequentes, foi possível identificar e caracterizar a responsividade do gene Mdm2 ao T3 bem como determinar os níveis de expressão e localização celular. Além disso, nós mostramos *in vitro* que Mdm2 é essencial para a manutenção do trofismo muscular. Estes dados nos mostram que além de ativar vias proteolíticas, o T3 age ao mesmo tempo na contenção da proteólise através da expressão aumentada de Mdm2.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivos Gerais*

a) Determinar o padrão global de expressão de genes envolvidos com as vias intracelulares relacionadas à proteólise no tecido músculo-esquelético mediado pelo hormônio tireoideano (T3).

2.2 *Objetivos Específicos*

a) Analisar o padrão da expressão gênica no músculo estriado esquelético, submetido à técnica de microarray em situações de hipertireoidismo experimental, após tratamento com T3 por 12 e 24 horas e 7 dias;

b) Analisar a expressão gênica das vias intracelulares dos sistemas ubiquitina-proteassoma, lisossomal, calpaínas e caspases, possivelmente moduladas por T3;

c) Analisar genes responsivos ao T3 para posteriormente escolher um gene de interesse e estudar sua relação com o trofismo muscular;

d) Caracterizar a responsividade do gene de interesse ao T3 tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Protocolo Experimental*

A técnica de Microarray já realizada pelo nosso laboratório envolvendo tratamento com T3, foi efetuada no músculo sóleo de 12 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* pesando entre 200 e 260g (9 semanas de idade), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas – USP. O microarray foi realizado anteriormente como parte de um projeto temático sob nossa coordenação (FAPESP 06/6131-7).

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do ICB-USP, de acordo com os Princípios de Ética em Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), (protocolo 168/05).

Ao longo do período experimental os ratos foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB-USP), onde foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro e temperatura de 24 °C), com livre acesso a água e ração.

Os animais estudados foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo Controle (animais eutiroideos) e Grupo T3 (animais tratados com T3). O grupo T3 foi subdividido em tempos de tratamento sendo: Grupo T3-12h; Grupo T3-24h e Grupo T3-7dias. Os animais pertencentes aos grupos T3 foram induzidos ao hipertireoidismo experimental, pela administração de 6µg de T3/100g Peso Corpóreo/dia (20x a dose fisiológica) dissolvido em 40mM NaOH através de

injeções intraperitoneais. O volume correspondente à dose de 20x foi administrado via intraperitoneal com 300 µL de solução salina 0,9% a fim de garantir a entrada do volume total de T3 no organismo para todos os animais. Vale salientar que cada grupo foi composto por 3 animais.

O volume do hormônio injetado foi ajustado de acordo com o peso corporal para manter a mesma dosagem durante todo o experimento. Os animais controle também receberam injeções intraperitoneais diárias somente com solução salina 0,9% para posterior confirmação de que os efeitos moleculares provocados no tecido muscular foram decorrentes do tratamento com o referido hormônio e não devido ao estresse do animal pela injeção.

Uma vez adquirido e analisado os dados do microarray dos genes de interesse um novo experimento foi realizado com novos animais. Este novo experimento teve o intuito de reproduzir as mesmas condições de tratamento supracitado a fim de obtermos material biológico suficiente para realizar as análises moleculares subseqüentes. Seguido o período de tratamento os animais foram sacrificados por decapitação para realizar a coleta do sangue para mensuração da concentração de T4 no plasma. Em seguida, o coração e o músculo sóleo foram removidos, pesados e congelados no nitrogênio líquido para garantir a conservação dos tecidos para futuras análises moleculares. Todas as amostras removidas foram estocadas no freezer -80 °C.

Para certificarmos de que o tratamento com T3 foi efetivo, o peso do coração foi utilizado como controle positivo, visto que na literatura já está estabelecido que doses elevadas de T3 induzem hipertrofia cardíaca ³⁷. Para as análises histológicas, o músculo sóleo foi cortado transversalmente no ponto mais largo do

músculo (ventre muscular), a partir dessa divisão, metade do mesmo foi congelado no isopentano gelado por aproximadamente 30 segundos afim de proteger o músculo de artefatos de congelamento. Cortes transversais (10µm) do sóleo foram realizados no criostato (Leica CM3050, Germany). A outra metade do sóleo foi utilizada para extração de RNA. O sóleo contralateral do animal foi removido para análise protéica.

3.2 Realização do Microarray no sóleo de animais controle e tratado

3.2.1 Isolamento do RNA total

O RNA total dos tecidos foi isolado utilizando 50-100mg/mL de Trizol (Trizol – INVITROGEN), seguindo recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado em um espectrofotômetro de alta sensibilidade (Nanodrop – UNISCIENCE) e sua qualidade e integridade foi avaliada em um sistema de eletroforese com base capilar (Bio-Rad), pois foram fundamentais para que a síntese do cDNA (DNA complementar) produzido para posterior hibridação adquirisse qualidade e pureza adequadas.

3.2.2 Síntese de cDNA

Foi realizada a reação de transcrição reversa a partir de 5µg de RNA total extraído para a síntese das fitas de cDNA, utilizando kit fornecido pela Invitrogen. Para a remoção dos nucleotídeos fluorescentes não incorporados, as amostras foram filtradas em coluna GFX (Pharmacia) e o filtrado foi eluído em 50uL de TE (Tris-EDTA). Após a purificação da amostra, esta foi totalmente desidratada através de um secador a vácuo.

3.2.3 *Pré-hibridização e hibridização da sonda*

Para a hibridização das sondas, foram utilizadas lâminas para microarray contendo aproximadamente 30000 genes do genoma de rato (GE Healthcare – Amersham biosciences). Inicialmente, as lâminas foram imersas em uma solução de pré-hibridização contendo 5XSSC, 0,1%SDS e 1% de BSA por 45 min a 42°C. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas com água milliQ e já submetidas ao processo de hibridização. Cada sonda marcada foi ressuspensa em 12 µL de tampão contendo 50% de formamida, 5XSSC e 0,1%SDS. Foi adicionada a cada amostra uma solução contendo 12 µL de Cy 3 e Cy 5, 1µL de COT1-DNA (20µg/µL) (Life Technologies) e 1µL de Poly (A)-DNA (20µg/µL) para bloquear hibridizações inespecíficas. As amostras foram aquecidas a 95°C por 3min, em seguida centrifugadas e aplicadas sobre a lâmina de microarray já pré-hibridizada. Em cima da lâmina foi colocada uma lamínula e levada ao forno de hibridização a 42°C por 16-20hs. Ao término do tempo, a lâmina foi lavada com 1XSSC e 0,2% SDS, sob agitação por 4 minutos, e quando totalmente seca, a lâmina estava pronta para a fase de leitura.

3.2.4 *Fase de Leitura e análise de dados obtidos pelo Microarray*

O ensaio de microarray é uma técnica que é capaz de medir os níveis de expressão de transcritos em larga escala simultaneamente. Isto é possível em decorrência da hibridização dos RNAs mensageiros provenientes das amostras biológicas em um chip que contém sequências complementares de oligonucleotídeos desses transcritos. A detecção simultânea da expressão gênica é viável, pois estas amostras de RNAm são marcadas com fluoróforos que uma vez excitados vão permitir a aquisição dos dados.

Para leitura dos chips e análise dos resultados do ensaio de microarray, foi utilizado um scanner a laser (Plataforma Code Link – GE Healthcare Bio-Sciences) que se encontra localizado no Laboratório de Ginecologia Molecular da UNIFESP, chefiado pelo Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva. O scanner opera no comprimento de onda de 550nm e 650nm, excitando os compostos fluorescentes Cy3 e Cy5, respectivamente.

Uma vez disponibilizado os dados adquiridos pelo microarray, foi adequado dar início a análise global da expressão dos genes de interesse que foram responsivos ao tratamento com T3 por um período de 12 horas, 24 horas ou 7 dias comparado ao grupo controle.

3.2.5 Parâmetros utilizados para a análise dos dados adquiridos pelo Microarray

Para a interpretação dos dados brutos, a análise foi dividida em 2 etapas conforme ilustra a figura 2, sendo: (1) análise qualitativa, visando num primeiro momento melhorar a qualidade dos dados adquiridos; e (2) análise exploratória que teve como objetivo confirmar a originalidade dos genes alvos bem como interpretação dos dados.

Figura 4 – Fluxograma – Etapas da análise dos dados adquiridos pelo microarray

3.2.6 *Análise Qualitativa*

Uma vez obtido os dados por meio da leitura dos chips de microarray das referidas amostras, os mesmos foram pré-processados pelo algoritmo MAS 5.0, que possibilitou a normalização dos dados para posterior comparação.

Com o intuito de selecionar valores de expressão mais confiáveis evitando ruído em relação ao background optou-se por realizar a filtragem dos dados com valor absoluto de 50 ou mais, valor este que representou a expressão dos genes analisados neste estudo. Para esse processo foi utilizado um script na linhagem de programação Perl efetuado pelo aluno de mestrado Andrei Rozanski. Terminada esta etapa o passo seguinte foi buscar genes de interesse na planilha disponibilizada pelo programa citado acima.

Adquirido a lista de genes de interesse para o referido estudo, iniciou-se a análise comparativa dos níveis de expressão gênica entre o grupo controle e os grupos tratados com T3 (12h, 24h e 7 dias).

A comparação dos níveis de expressão entre os grupos foi efetuada através da variação expressa pelo fold change (FC) calculado para todos os genes. Foi considerado como critério de comparação entre grupos, genes que apresentaram uma variação na expressão superior a 15% em qualquer um dos tempos de tratamento em relação ao grupo controle.

3.2.7 *Análise Exploratória*

Para fazer uma busca e análise dos genes de interesse na referida planilha, foram utilizados sites de busca os quais dispõem de um banco de dados que viabiliza informações como número de identificação do gene, número de probeset e sequenciamento do cDNA. Esta análise teve como objetivo encontrar e

confirmar a originalidade dos genes alvos analisados. Os sites utilizados foram: (1) National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) que permitiu a análise do sequenciamento de cDNA (BLAST) das probes escolhidas bem como a busca de seus referidos genes através do número de identificação. (2) banco de dados da Universidade da Califórnia de Santa Cruz (UCSC) Genome Browser (www.genome.ucsc.edu) e (3) Affymetrix GeneChip® (www.affymetrix.com) que disponibiliza o número e sequências do cDNA das probes escolhidas.

3.3 Validação dos genes de interesse por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

Terminada a etapa exploratória de análise global da expressão dos genes de interesse responsivos ao T3, foi iniciada a validação (confirmação dos dados) da expressão diferencial, por RT-PCR.

A determinação dos níveis de expressão de RNAm por RT-PCR, foi efetuada através da extração do RNA total do músculo sóleo pelo reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) seguindo as normas e recomendações do fabricante. Posteriormente, 1µg de RNA total foi utilizado para a reação de transcrição reversa para preparação do cDNA. Os iniciadores (primers) para a amplificação dos genes de interesse para rato foram: Atrogin, Mdm2 e Murf-1, que foram desenhados pelo Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e sintetizados pela IDT ([Integrated DNA Technologies](http://www.idt.com)) (Tabela 1). Uma vez realizado todas as etapas supracitadas foi possível dar início à execução da RT-PCR dos referidos genes através do equipamento Rotor Gene (Qiagen). A reação foi efetuada com cDNA (DNA complementar), diluído em mix contendo Power

Sybr Green PCR Master Mix (APPLIED BIOSYSTEMS), água MiliQ e respectivos iniciadores senso e anti-senso. Os parâmetros de ciclagem foram: 60 °C por 1 minuto, 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos. A amplificação foi realizada em 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 60 segundos. A quantificação da amplificação dos genes foi efetuada pelo software Rotor-Gene Q Series através do *cycle threshold* (Ct) que é definido como o número do ciclos necessários para se obter um sinal de fluorescência suficiente que indica a quantidade de cDNA amplificado nas amostras, consequentemente, os níveis de RNAm presentes na reação. A expressão gênica foi medida por meio da fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Nestes experimentos a expressão gênica da Ciclofilina foi utilizada como controle interno.

Tabela 1 - Primers usados no real-time PCR (RT-PCR)

Primers	NCBI Accession Number	Forward	Reverse
Atrogin/Fbxo32	NM_133521.1	TAC TAA GGA GCG CCA TGG ATA CT	GTT GAA TCT TCT GGA ATC CAG GAT
Ciclofilina A	NM_017101.1	GCC GAT GAC GAG CCC TTG	TGC CGC CAG TGC CAT TAT
Ciclofilina A (camundongo)	NM_008907.1	GCC GAT GAC GAG CCC TTG	TGC CGC CAG TGC CAT TAT G
Mdm2	NM_001108099.1	GAG GAT GAT GAG GTC TAT CG	GGA GGA TTC ATT TCA TTG CAC
Mdm2 (camundongo)	NM_001288586.1	ACG ATG GCG TAA GTG AGC AT	CTG TGA CCC GAT AGA CCT CA
Murf1	NM_080903.1	TGA CCA AGG AAA ACA GCC ACC AG	TCA CTC CTT CTT CTC GTC CAG GAT GG

3.4 Reação de Transcrição Reversa

Para a reação de transcrição reversa foi utilizado 1µg do RNA extraído do músculo sóleo, 500ug/ml de Oligo dT, 10nM de dNTP Mix, 5x First Strand Buffer, 0,1M de DTT e 200U de transcriptase reversa (MMLV Reverse Transcriptase - Promega Corporation). A transcrição reversa foi efetuada a 70 °C por 10 minutos. Posteriormente foi adicionada a enzima, continuando o ciclo a 42 °C por 60minutos e 95 °C por 10minutos.

3.5 Quantificação de T4 no soro

Os níveis séricos de T4 total foram mensurados por um kit comercial de radioimunoensaio (Schering Cis Bio International - France). O soro foi separado por centrifugação e congelado imediatamente em freezer -80°C (5.000 rpm; 30 minutes).

3.6 Western Blot

Os anticorpos primários utilizados para detecção das proteínas de interesse foram: (1) anticorpo monoclonal-mouse anti-MDM2 (1:1000; Cat. #NB100-2736; Novus Biologicals, Cambridge, Massachusetts); (2) anticorpo monoclonal-mouse anti-sarcomeric actin (1:1000; Cat. #M0874; Dako, USA); (3) anticorpo polyclonal-rabbit anti-Foxo3 total (1:1000, Cat. # ab47409; Abcam, USA) e (4) anticorpo policlonal-rabbit anti-Foxo3 fosforilado (1:1000, Cat. #9466S; Cell Signaling, USA). Os anticorpos secundários utilizados foram: (1) Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/AP (1:1000; Cat. No. D0314; Dako, USA) e (2) Polyclonal rabbit anti-rabbit immunoglobulins/AP (1:1000; Cat. No. D0487; Dako, USA). As proteínas do músculo sóleo foram extraídas utilizando o tampão rippa modificado [0,625% Nonidet P-40; 0,625% ácido deoxiolático; 0,00625M fosfato de sódio pH 7,2; 1mM EDTA pH 8,0] contendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de um coquetel de inibidor de protease (SigmaAldrich). Em seguida, o extrato protéico foi centrifugado (10,000g por 10 minutos) em 4°C . Efetuada a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi removido e aliquotado para armazenamento no freezer -80°C . A quantificação do extrato protéico foi determinada pelo método Bradford (Bio-Rad, Hercules, California), com BSA (bovine serum albumin) como padrão. O extrato protéico foi corrido em um gel de 12% sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gels

electrophoresis (SDS-PAGE) e transferido para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, USA).

As membranas foram coradas com Ponceau S para confirmar a quantidade de carregamento de proteína em cada poço do gel. Em seguida foram lavadas com TBS-T 0,1% Tween [Trisbuffered saline solution 0.5 M NaCl, 50 mM TrisHCl (pH 7.4), e 0.1% Tween-20]. Todas as membranas foram incubadas por 40 minutos em temperatura ambiente com solução de bloqueio [TBS-T; 5% no-fat milk]. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T 0,1% Tween (3x5 minutos) e incubadas *overnight* com anticorpo primário à 4 °C. Seguida incubação *overnight* as membranas foram lavadas novamente por 15 minutos (3x5 minutos) para remoção do anticorpo primário. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 1 hora. Após este processo as mesmas foram lavadas com TBS-T 0,1% Tween (2x5 minutos). Para detecção das proteínas de interesse as membranas foram lavadas por 5 minutos com detection buffer (100mM Tris-HCL; 100mM Cloreto de Sódio pH9.5). As proteínas ligadas no anticorpo foram detectadas pelo sistema de fosfatase alcalina (NBT/BCIP Stock Solution; Roche, USA).

3.7 Imunofluorescência

Os anticorpos primários utilizados para imunofluorescência foram: (1) monoclonal-mouse anti-MDM2 (1:1000; Cat. #NB100-2736; Novus Biologicals, Cambridge, Massachusetts), (2) polyclonal rabbit anti-Myod (1:200; Cat# sc760; Santa Cruz Biotechnology), (3) polyclonal rabbit anti-Pax7 (1:200; Cat# ARP 32742; Aviva Systems Biology); (4) polyclonal rabbit anti-dystrophin (1:250; Cat# sc15376; Santa Cruz Biotechnology) e (5) polyclonal rabbit anti-Foxo3a total

(1:300; Cat# ab9466S; Abcam). Os anticorpos secundários foram: (1) goat antimouse IgG-Cyanine Cy2 (1:50; cat# 115–225–174 Jackson Lab), (2) donkey anti-mouse Cyanine Cy3 (1:300; cat# 715–165–150 Jackson Lab), (3) goat anti-rabbit IgG-Cyanine Cy2 (1:50; cat# 111–225–008 Jackson Lab) e (4) donkey anti-rabbit IgG-Cyanine Cy3 (1:300; cat# 711–165–152 Jackson Lab). As lâminas com cortes transversais do músculo sóleo foram fixadas com acetona por 10 minutos à -20 °C. Em seguida foram lavadas com PBS (1X Phosphate Buffer Saline pH 7.4) misturado com Nonidet-40 0,1% (3X5 minutes). Posteriormente foram incubadas com uma solução de bloqueio (PBS + Nonidet-40 + 1% BSA) por 30 minutos à 37 °C. Em seguida as lâminas foram incubadas *overnight* com a solução de bloqueio contendo o anticorpo primário em uma cuba escura à 4 °C. No dia seguinte as lâminas foram lavadas com PBS misturado com Nonidet-40 0,1% (3X5 minutos), e logo depois foram incubadas com anticorpo secundário misturado à solução de bloqueio por 1 hora novamente em cuba escura. Posteriormente, as lâminas foram lavadas novamente com PBS misturado ao Nonidet-40 0,1% (3x5 minutos). Por fim as mesmas foram montadas com Vectashield misturado ao 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (cat# H-1200, Vector Labs) para marcação nuclear e fechada com lamínula.

A aquisição das imagens das lâminas submetidas à imunofluorescência foi efetuada no Centro de Facilidades para Pesquisa (CEFAP) da USP através do microscópio confocal multifótons Zeiss LSM-780 NLO e os respectivos arquivos foram analisados pelo software Carl Zeiss Zen 2009 Edition.

3.8 Histoquímica muscular

No intuito de efetuar a classificação dos tipos de fibra existentes no músculo sóleo dos animais controle e tratados com T3 cortes transversais deste tecido foram submetidas à histoquímica. As fibras foram classificadas como oxidativa-lenta (tipo I) e oxidativa glicolítica-rápida (tipo IIa) com base na reação de coloração da atividade da enzima ATPase localizada na cabeça da miosina de cada tipo de fibra. O método utiliza estágios de preincubação alcalina (pH 9.4) ou ácida (pH 4.1) no intuito de explorar as diferenças de sensibilidade de pH da enzima presente nos referidos tipos de fibra encontrado no músculo. Em seguida, fotomicrografias dos cortes corados foram adquiridos no microscópio Nikon Eclipse TS 100 e as seguintes imagens foram capturadas pelo programa NIS-Elements BR. O padrão de coloração do tipo de fibra no pH 9.4 (escura-fibras tipo IIa; clara-fibras tipo I) foi comparado com o padrão de coloração reversa (clara-tipo IIa; escura tipo I) nos cortes corados no pH 4.1.

3.9 Abordagem in vitro

Para caracterizar a responsividade de T3 sobre o gene Mdm2 foram realizados experimentos in vitro com células do músculo esquelético de camundongo.

3.9.1 Cultura Primária de mioblastos

Mioblastos primários foram isolados das patas dos membros posteriores de camundongos. Posteriormente foram imersas em solução de PBS (*phosphate buffered saline*) estéril para remover qualquer resquício de pêlo do animal. Em sequência, os músculos removidos foram cortados em pequenos fragmentos para

facilitar a digestão tecidual. Para realizar o plaqueamento dos mioblastos em placas de 24 poços foram utilizados um total de 2 camundongos. Uma vez adquirido os fragmentos musculares foi iniciado o processo de digestão tecidual. Todo o processo de digestão tecidual foi realizado de acordo com protocolo padrão do presente laboratório adaptado de estudos prévios (Perruchot, 2012 #50}{Doi, 2002 #51}. Resumidamente, os tecidos obtidos dos camundongos foram digeridos duas vezes, inicialmente em um meio filtrado (15mL) contendo High DMEM Glucose (Dulbeco modified Eagle medium) + Colagenase tipo II (22,5 mg) por 45 minutos e High DMEM Glucose + Colagenase tipo II (22,5 mg) + tripsina (37,5 mg) por 15 minutos à 37°C através de um agitador de células. Vale salientar que ao meio contendo High DMEM Glucose foi adicionado também, 4 mM de L-Glutamina, 1,5g/L de bicarbonato de sódio, 4,5 g/L de glicose e 1.0 mM de piruvato de sódio. A este meio também foi adicionado os antibióticos penicilina e estreptomicina a 1%. Entre os intervalos de digestão as soluções foram centrifugadas em 400xg à 4°C por 30 minutos para obter um pull de células. Após a centrifugação da última digestão o pellet foi ressuspensionado em 30 mL de High DMEM Glucose + 20% de FBS (soro fetal bovino) e centrifugado novamente na mesma condição supracitada. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e em sequência foi adicionado mais 30 mL de High DMEM Glucose + 20% de FBS. Em seguida, a solução foi filtrada em poros de 100 μ M e 40 μ M, respectivamente para finalmente ser efetuado o pré-plaqueamento em placas de cultura de 15 X 35 mm de diâmetro na tentativa de aderir fibroblastos presentes na solução. A duração do pré-plaqueamento foi de 40 minutos, sendo estas placas mantidas em estufa úmida à 37°C e 5% de CO₂. Finalizado o pré-plaqueamento, a solução contendo

os mioblastos isolados foram resgatados para dar início ao processo de plaqueamento das células.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços, estéreis pré-tratadas com Matrigel, contendo 1 mL meio onde os mioblastos foram isolados. As células foram incubadas em estufa úmida conforme dito anteriormente sendo estas mantidas à 37 °C com 5% de CO₂. As células foram mantidas em meio de crescimento (*DMEM 20% FBS, 1% penicillin-streptomycin*) por 3-4 dias até atingir uma confluência de 70%. Em seguida o meio foi modificado para um meio de diferenciação (*DMEM 2% horse serum, 1% penicillin-streptomycin*) para estimular a fusão dos mioblastos e consequentemente, formação de miotubos. Após 3 dias de diferenciação alguns poços foram tratados por 72 horas com T3 (3×10^{-7} M; cat #T2877, Sigma), inibidor farmacológico de Mdm2, Nutlin (8 uM; cat #18585, Cayman Chemical) ou ambos. O Nutlin é uma potente molécula inibidora e seletiva que impede a interação entre Mdm2-p53 e bem como a atividade antitumoral {Vassilev, 2004 #30}. Esses tratamentos foram utilizados para comparar a influência do T3 e Mdm2 na modulação da massa muscular. Para controle do experimento alguns poços foram tratados com álcool etílico (veículo), outros poços foram mantidos somente com meio de diferenciação por 6 dias sem qualquer tipo de tratamento.

3.10 Mensuração dos Miotubos

A aquisição das imagens para mensurar o diâmetro dos miotubos foi realizada através de um microscópio (Nikon Eclipse TS 100) equipado com uma câmera de vídeo digital interligado em um computador. As imagens foram capturadas através do software NIS-Elements BR. A mensuração do diâmetro dos

miotubos foi efetuada através do software Image Pro Plus Demo software. Uma vez visualizado os miotubos numa magnitude de 100X, alguns campos foram selecionados aleatoriamente de cada grupo para posterior quantificação. Aproximadamente 165 miotubos foi quantificado por grupo. Para quantificar o diâmetro, pelo menos 3 medidas da espessura de cada miotubo foi efetuada. Posteriormente, a média dessas medidas foi calculada.

3.11 *Extração de RNA dos Miotubos*

A determinação dos níveis de expressão de RNAm por RT-PCR dos miotubos cultivados foi efetuada através da extração do RNA total pelo reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) seguindo as normas e recomendações do fabricante.

3.12 *Outros Modelos de Atrofia*

Para analisar a modulação gênica de Mdm2 em outros modelos de atrofia um novo grupo de ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200 e 260g (9 semanas de idade), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas – USP foram utilizados. Cada grupo analisado foi composto de 5 animais que foram divididos randomizadamente em 3 grupos: controle, tratado ou imobilizado por 1 dia e tratado ou imobilizado por 3 dias. Vale salientar que todos os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais controladas supracitadas. Desse modo, os seguintes modelos adicionais utilizados no estudo foram: imobilização, tratamento com dexametasona e jejum. Ao final de cada período de tratamento ou imobilização os animais foram eutanasiados e o músculo sóleo foi removido para realização do RT-PCR.

3.12.1 Imobilização

Para realizar a imobilização inicialmente os animais foram anestesiados (30 mg/kg corporal de ketamina e 10mg/kg corporal de xilazina). Posteriormente, a pata posterior esquerda foi imobilizada com o músculo sóleo colocado em posição encurtada (flexão plantar), com o auxílio de esparadrapo e gesso durante o período de 1 e 3 dias.

3.12.2 Dexametasona

Os animais foram tratados com dexametasona (1200ug/Kg peso corporal) em uma dose diária intraperitoneal, sempre no mesmo horário, por 1 ou 3 dias.

3.12.3 Jejum

Os animais permaneceram em jejum por 1 ou 3 dias em gaiolas metabólicas somente com água *ad libitum*

4 RESULTADOS

4.1 Dados Gerais

Para confirmar se os animais encontravam-se no estado de hipertireoidismo experimental decorrente do tratamento por T3, tanto a quantificação de T4 total circulante bem como a mensuração do peso muscular do sóleo e coração foi efetuado. Na tentativa de diminuir a variabilidade dos dados intragrupo, foi realizada também a análise dos pesos relativo do músculo bem como do coração, obtido por meio da relação dos pesos brutos com o peso corporal do animal. Conforme pode ser observado na Tabela 2, nenhuma diferença significativa foi observada no peso corporal entre os grupos tratado e controle, mostrando que o crescimento desses animais encontrava-se em condições normais. Entretanto foi constatado que o tratamento com T3 diminuiu significativamente o peso muscular do músculo sóleo após 0.5 dias (~10%, $p < 0.05$), 1 dia (~8%, $p < 0.05$) e 7 dias (~11%, $p < 0.05$) de tratamento com T3 (Tabela 2). Como esperado, o tratamento com T3 diminuiu os níveis plasmáticos de T4 (~10 fold, $p < 0.05$) após 7 dias de tratamento bem como aumentou o peso do coração (~12%, $p < 0.05$) (Tabela 2) mostrando que o tratamento provocou a inibição do eixo hipotálamo-hipófise bem como hipertrofia cardíaca causada por doses elevadas de T3, dados estes já bem estabelecida na literatura.

Tabela 2 – Dados gerais dos níveis séricos de T4, Peso Corporal (PCor), Peso Coração (PC), Peso Muscular (PM) e relação PC/PCor, PM/PCor dos animais controle e tratados com T3

Grupos	Peso Corporal (g) (n=11)	T4 (nmol/L) (n=8)	PC (mg) (n=8)	Soleus PM (mg) (n=16)	PC/PCor (mg/cm) (n=8)	PM/PCor(mg/cm) (n=16)
Controle	235.1 ± 33.4	44.2 ± 13.6	851.00 ± 48.18	89.00 ± 8.22	3.47 ± 0.18	0.36 ± 0.03
T3 - 0.5 dias	226.0 ± 18.6	33.2 ± 10.3	803.13 ± 39.72	80.31 ± 8.02 *	3.68 ± 0.13	0.37 ± 0.04
T3 - 1 dias	225.5 ± 21.1	27.9 ± 9.3 *	775.50 ± 35.58	81.69 ± 6.86 *	3.58 ± 0.24	0.38 ± 0.04
T3 - 7 dias	228.2 ± 12.5	4.1 ± 0.5 *	949.38 ± 84.42*	78.81 ± 7.03 *	4.16 ± 0.21*	0.35 ± 0.04

Valores expressos como média ± SD.

* $p < 0.05$ vs. Controle

4.2 *Análise global dos genes responsivos ao T3 que atuam em vias proteolíticas através do Microarray*

A proposta inicial do presente estudo foi traçar um perfil de expressão gênica dos diversos genes que atuam nas principais vias proteolíticas existentes no músculo dentre estas: calpaínas, caspases, lisossomal e ubiquitina-proteassoma a fim de verificar quais destas vias era a mais responsiva ao T3. Uma vez constatado a principal via responsiva ao T3 a próxima etapa do trabalho foi escolher e estudar com maior ênfase um possível gene alvo envolvido na atrofia muscular mediado pelo hormônio tireoidiano. Nesse sentido, a ferramenta que nos possibilitou analisar a expressão de uma grande quantidade de genes simultaneamente foi o Microarray, dos quais foi analisado um total de 120 genes que atuam nas vias proteolíticas citadas acima. De acordo com a análise efetuada nessa primeira etapa foi possível notar que 47% (57 genes) dos genes analisados foram regulados por T3 (Figura 5A) e interessante, 57% (32 genes) desses genes responsivos ao T3 pertencem à via ubiquitina-proteassoma (Figura 5B). Dos genes responsivos ao T3 que atuam na via ubiquitina-proteassoma, foi possível notar que a grande maioria, 64% (21 genes) correspondia às E3 ligases, enzimas responsáveis pela marcação da proteína que será degradada pelo proteassoma 26S (Figura 5C).

Figura 5: Vias proteolíticas e genes responsivos ao T3 no músculo sóleo pelo microarray. (A) Análise global de genes responsivos por T3 que atuam nas vias proteolíticas; (B) Especificação da responsividade por T3 das vias proteolíticas: ubiquitina-proteassoma; calpaínas; caspases e lisossomos (C) Responsividade ao T3 das enzimas: E1, E2 e E3 que atuam na via ubiquitina-proteassoma.

Estas análises preliminares foram de suma importância, uma vez que foi constatada a modulação de outras E3 ligases no músculo-esquelético além dos atrogenes (Atrogin/MuRF1) já bem caracterizados pela literatura no que diz respeito à atrofia muscular. Portanto, a partir destes dados nós decidimos direcionar nossas análises sobre essas E3 ligases, visto que umas destas poderia ser um alvo potencial na perda de massa muscular causada por T3. Portanto, o próximo passo foi comparar o nível de expressão gênica entre essas "novas" E3 ligadas moduladas por T3 no músculo sóleo.

Ao comparar o nível de expressão gênica entre os grupos tratado (0.5, 1 e 7 dias) e controle de todas as E3 ligases responsivas por T3, uma chamou nossa

atenção, sendo esta denominada Mdm2. Conforme pode ser observado pela Tabela 3, Mdm2 foi regulada positivamente em todos os tempos de tratamento analisados (fold change 1.18, 1.30 e 1.22). Além de Mdm2, somente MuRF1 (fold change 1.23, 1.26 e 1.25), E3 ligase expressada especificamente no músculo, foi também regulado positivamente por T3 em todos os tempos de tratamento. Deste modo, nós decidimos focar nossas investigações sobre Mdm2 visto que a regulação desta E3 pelo hormônio tireoidiano mostrou-se constante com o decorrer do tratamento de forma semelhante ao MuRF1, que encontra-se superexpressado em diversos processos patológicos que causam atrofia muscular.

Uma vez escolhido o gene alvo para estudar sua relação com a proteólise muscular causada por doses elevadas de T3, o próximo passo foi reproduzir os dados com um novo grupo de animais para que pudéssemos confirmar a modulação dessa “nova” E3 utilizando as mesmas condições experimentais do ensaio de Microarray.

Tabela 3 - Fold Change da expressão gênica das E3 ligases responsivas ao T3 durante os tempos de tratamento de 0.5; 1 e 7 dias em comparação ao grupo controle através do Microarray

Gene Symbol	0.5	1	7
Atrogin	1.00	1.07	1.16
Cblc	1.16	0.90	0.42
Chrf	1.08	1.25	1.42
E3 alpha	1.08	1.16	1.30
Hace1	1.11	1.26	1.25
Herc1	1.09	1.16	1.23
Herc4	1.02	1.02	1.19
Herc6	0.74	0.36	0.67
KIAA0614	1.16	1.10	1.04
Map3k1	0.77	0.82	0.91
Mdm2	1.18	1.30	1.22
Murf1	1.23	1.26	1.25
Nedd4	1.36	0.63	0.98
Riken	1.18	1.01	1.14
Rnf4	1.22	1.06	1.05
Rnf40	1.21	0.67	0.81
Rnf 149	1.12	1.08	1.27
Siah1a	0.70	1.00	0.94
Smurf2	1.21	1.02	1.19
Ube3a	0.83	0.82	0.95
Wwp2	0.83	0.80	0.70
Fold Change $\geq$ 15%			

4.3 Níveis de Expressão de Mdm2

Após confirmar a efetividade do tratamento a próxima etapa foi efetuar a validação do perfil de expressão gênica de Mdm2 por RT-PCR. Como pode ser observado na Figura 6B a expressão de RNAm de Mdm2 aumentou rapidamente com 0.5 dias de tratamento mantendo-se aumentada com 1 e 7 dias de tratamento, onde atingiu seu pico máximo (fold change = 2.66). A expressão gênica de Atrogin-1 e MuRF1 também foram analisadas para serem utilizadas

como mais um controle positivo do tratamento. Conforme previsto, a expressão gênica dos mesmos (Atrogin/MuRF1) também aumentou, confirmando mais uma vez a efetividade do tratamento com T3.

Experimentos de Western Blot confirmaram a responsividade de Mdm2 ao T3 também no nível protéico em 1 e 7 dias de tratamento em comparação ao grupo controle, similar ao que foi observado à nível gênico (Figura 7A). Também foram efetuados experimentos para verificar se a modulação de Mdm2 é dose-dependente, tanto à nível protéico quanto gênico. Conforme pode ser visto pela figura 6B, a expressão de RNAm de Mdm2 foi aumentada em todos os tempos de tratamento, atingindo seu pico com a dose fisiológica de 20x ($p < 0,05$). Estes resultados também foram vistos no nível proteico, exceto para a dose fisiológica de 50x (Figura 7C), onde nós observamos efeitos similares ao grupo controle. Todavia, nós acreditamos que a modulação de Mdm2 tanto no nível gênico quanto protéico pode estar ocorrendo em tempos diferentes.

Figura 6 - Nível de expressão gênica através do RT-PCR. (A) Expressão gênica de Atrogin e, MuRF1 após tratamento por T3 (0.5, 1 e 7 dias). (B) Expressão gênica de Mdm2 após tratamento por T3 (0.5, 1 e 7 dias) * $p < 0.05$ vs. controle. Os valores são expressados como Média $\pm$ DP

Figura 7: (A) Expressão protéica de Mdm2 no músculo sóleo de animais controle e tratados com T3-20X por 0.5, 1 e 7 dias. (B) Nível de expressão de RNAm de MDM2 no mpusculo sóleo após tratamento com diferentes doses de T3 (5x, 20x, 50x) por 7 dias vs. controle. (C) Expressão protéica de MDM2 do músculo sóleo de animais controle e tratados com diferentes doses de T3 (5x, 20x, 50x) por 7 dias. * $p < 0.05$ vs. controle. Os valores são expressados como Média $\pm$ DP

no

músculo esquelético, a próxima etapa foi verificar se a expressão de RNAm de Mdm2 era também modulada em miotubos tratados com T3, através de experimentos *in vitro*. Curiosamente, nós constatamos que Mdm2 também foi regulado positivamente após tratamento com T3 nos mostrando que a modulação de Mdm2 por T3 é independente de efeitos sistêmicos (Figura 8B).

Figura 8 - Cultura de células musculares diferenciadas (miotubos). (A) Microscopia de contraste de fase de miotubos não tratados e tratados com T3; (B) Nível de expressão de RNAm de MDM2 em miotubos tratados com T3 (10^{-7} M) por 3 dias vs. controle. * $p < 0.05$ vs. controle. Os valores são expressados como Média $\pm$ DP

Visto que ainda não constava na literatura nenhuma evidência mostrando a expressão gênica de Mdm2 em outros modelos de atrofia, nós analisamos os níveis de RNAm nos animais submetidos à imobilização, tratamento com dexametasona e jejum (Figura 9). Entretanto, como pode ser notado, tanto a imobilização quanto o jejum causou um aumento nos nível de RNAm de Mdm2 vs. controle. A imobilização induziu um aumento moderado de RNAm de Mdm2 após 3 dias de imobilização (fold ~ 1.54, $p < 0.05$) (Figura 9A). Já no jejum, podemos notar um aumento robusto de aproximadamente 3x (~3.11 fold, $p < 0.05$) nos níveis de RNAm de Mdm2 (Figura 9C). Foi interessante observar que o RNAm de Mdm2 nos animais tratados com dexametasona não modificou (Figura 9B). Esses resultados suportam a idéia de que essas enzimas podem ser moduladas de diferentes formas nos vários processos patológicos que induzem atrofia.

Figura 9: Nível de expressão de Mdm2 no músculo sóleo em diferentes modelos de atrofia: (A) imobilização; (B) dexametasona (1200mg/Kg); (C) Jejum. * $p < 0.05$ vs. controle. Os valores são expressados como Média $\pm$ DP

4.4 Mdm2 é induzido por T3 em fibras tipo I

Uma vez que ainda não se tem um vasto conhecimento sobre a função de Mdm2 em tecidos não tumorais, em especial no músculo, que é o foco do presente estudo, a etapa subsequente deste trabalho foi caracterizar a localização de Mdm2 no músculo esquelético com ensaios de imunofluorescência. Desse modo, cortes transversais do músculo sóleo de animais controle e tratados com T3 foram utilizados. Inicialmente pôde-se notar que o tratamento com T3 por 1 e 7 dias causou um aumento da marcação para Mdm2 dentro da fibra muscular em comparação ao controle (Figura 10). Estes dados foram confirmados pela distribuição da frequência absoluta de pixels sobre a intensidade, que pode ser observada pelos histogramas mostrados na Figura 10B. A marcação de Mdm2 no interior da fibra encontra-se de forma puntiforme e bem distribuída ao longo da área de secção transversal. Notavelmente, certas fibras não apresentam uma marcação detectável de Mdm2 internamente (Figura 10A). Devido a essa heterogeneidade de expressão tecidual de Mdm2, nós então decidimos detectar se a expressão de Mdm2 no músculo sóleo é fibra-específica através do ensaio histoquímico de ATPase miofibrilar. Interessantemente, notou-se que o T3 aumenta a expressão de Mdm2 em fibras classificadas como tipo I (Figura 10A: d,g) em ambos pH, ácido (4.1) e alcalino (9.4) utilizados nesse experimento para classificar tipos de fibra. Esse resultado demonstra que as fibras tipo I são mais sensíveis ao hormônio tireoidiano.

Figura 10: Área de secção transversal do músculo sóleo para ensaios de imunofluorescência e ATPase. (A) Microscopia confocal para Mdm2 (vermelho). Observar aumento da marcação de Mdm2 após 1 e 7 dias de tratamento com T3 (A: d e g respectivamente) vs. controle (A: a). Identificação histoquímica dos tipos de fibra sobre cortes transversais do músculo sóleo após pré-incubação em pH 4.1 e 9.4. Padrão de coloração dos tipos de fibra no pH alcalino 9.4 (escura – fibras tipo IIa; clara – fibras tipo I) que foram comparadas com o padrão de coloração reversa (clara - tipo IIa; escura – tipo I) no corte corado pré incubado no pH ácido 4.1. (B): Distribuição da frequência absoluta de pixels sobre a intensidade de Mdm2 nas imagens 9A: a, d e g. (x400).

Diversos estudos mostram que Mdm2 localiza-se no núcleo de células tumorais com o intuito de controlar a atividade do supressor tumoral p53. Entretanto, nós decidimos observar num primeiro momento se Mdm2 co-localiza com o mionúcleo das fibras musculares. Através da microscopia confocal foi possível observar que Mdm2 co-localiza com o mionúcleo tanto dos animais eutiroideos quanto dos animais tratados com T3 (Figure 11A a-j). Desse modo, é possível que Mdm2, exerça um papel potencial na modulação dessas células.

Vale salientar que neste experimento a distrofina foi usada somente para delimitar a área das fibras musculares.

Figura 11: Imunofluorescência de cortes transversais do músculos sóleo. Microscopia confocal para DAPI (azul); distrofina (verde) e Mdm2 (vermelho). Observar a co-localização de Mdm2 com o mionúcleo de animais controle (d/e) bem como de animais tratados com T3 por 7 dias (i/j) (x630).

Visto que Mdm2 co-localizou com o mionúcleo de ambos os grupos (controle/tratado), o próximo passo foi verificar se essa co-localização

correspondia também com o núcleo de células satélites, células precursoras miogênicas de grande importância no remodelamento do tecido muscular, que se localizam adjacente às fibras musculares³⁸. Para avaliar se Mdm2 é expresso em células satélites nós utilizamos marcadores específicos de células satélites, Pax7 e MyoD, fatores miogênicos essenciais para a proliferação e diferenciação do músculo (Figura 12A e B).

Diferentemente do grupo controle, foi observado que doses supra-fisiológicas de T3 causou ausência de marcação de células positivas para Pax7 (Figura 12A: g) no músculo sóleo, caracterizando enfim a inatividade dessas células nesses animais. Resultado similar foi observado nos experimentos que foi utilizado MyoD (Figura 12B: g). Interessantemente foi notado novamente co-localização de Mdm2 no mionúcleo dos animais tratados com T3 por 7 dias (Figura 12 A: i/j;) (Figura 12B: i/j) mostrando que Mdm2 pode ter um importante papel regulatório na atividade dessas células em consequência do tratamento. Sendo assim, o fato de o remodelamento depender da capacidade mitótica dessas células, é possível que atrofia observada em animais hipertireoideos seja decorrente da inatividade dessas células.

4.5 Mdm2 tem um papel chave no trofismo de miotubos

Na tentativa de obter uma melhor compreensão do papel de Mdm2 e sua relação com o trofismo muscular, nós direcionamos novamente nossos experimentos para análises *in vitro* através de mioblastos em cultura que foram diferenciados em miotubos por 3 dias. Em seguida, nós tratamos esses miotubos por mais 3 dias com um inibidor farmacológico de Mdm2 denominado Nutlin e avaliamos o diâmetro dos mesmos. Surpreendentemente, o tratamento com Nutlin

diminuiu severamente o diâmetro dos miotubos (~35%, $p<0.05$) (Figura 13A e B). Como esperado, o tratamento com T3 também diminuiu o diâmetro dos miotubos (~12%, $p<0.05$), reproduzindo a atrofia muscular também observada nos animais hipertireoideos. Interessantemente, o tratamento com T3 associado ao Nutlin foi incapaz de reverter ou minimizar o quadro atrófico observado nos miotubos (Figura 13B, grupo T3+Nutlin). Vale salientar que o veículo (ETOH), não teve qualquer efeito sobre o diâmetro dos miotubos. Este ensaio funcional teve grande importância, pois nos mostrou que algumas E3 ligases podem desempenhar funções que favorecem a manutenção da integridade celular, neste caso, em especial a E3 ligase Mdm2, que mostrou ter um papel protetor na manutenção no trofismo músculo, em contraste das E3 ligases clássicas Atrogin e MuRF1 que têm se mostrado ser moduladoras negativas da massa muscular. Através destes resultados nós podemos inferir que Mdm2 pode ter uma atuação importante na regulação negativa de certas proteínas que estão relacionadas com a ativação da proteólise muscular, numa tentativa de manter a homeostase celular. Para confirmar nossa hipótese, a fase subsequente do presente estudo foi verificar a relação de Mdm2 com o fator de transcrição FoXO3a, o principal modulador da atrofia muscular.

Figura 12: Imunofluorescência de cortes transversais do músculos óleo. (A) (B) Microscopia confocal para DAPI (azul); Pax7/MyoD (verde) e Mdm2 (vermelho). Observar a co-localização de Mdm2 com Pax7 ou MyoD no grupo controle (A/B: b/e) e ausência de marcação de Pax7 ou MyoD no grupo tratado por T3 por 7 dias (A/B: g). Co-localização de Mdm2 no mionúcleo de animais tratados por T3 por 7 dias (A/B: i/j).. (x630).

Figura 13: Influência do T3 e (-)-Nutlin3 (inibidor de Mdm2) sobre o diâmetro dos miotubos. (A) Microscopia com contraste de fase dos miotubos não tratados e tratados com ETOH (veículo), T3 e (-)-Nutlin3 por 72 horas após 3 dias de diferenciação. (x200). (B) Quantificação do diâmetro dos miotubos não tratados e tratados com ETOH (veículo), T3 e (-)-Nutlin3 por 72 horas após 3 dias de diferenciação. As células musculares (mioblastos) foram cultivadas por 2-3 dias num meio de crescimento basal (DMEM + 20% FBS) para obter aproximadamente 70-80% de confluência. Posteriormente, os mioblastos foram induzidos à diferenciação através de um meio de diferenciação (DMEM + 2% horse serum) por 3 dias.

Estudos prévios têm mostrado que Mdm2 é responsável pela ubiquitinação de FoXO3a. Entretanto o próximo passo foi observar o comportamento de FoXO3a após tratamento com T3. Para responder nossa pergunta nós analisamos a localização de FoXO3a através de ensaios de imunofluorescência nos animais tratados por T3 por 7 dias. Com surpresa, observamos que nesses animais tratados com T3, o fator de transcrição FoXO3a localizava-se predominantemente no interior da fibra muscular (Figura 14A-e), similar à

localização de Mdm2 também observada nos animais tratados com T3 por 7 dias em experimentos anteriores (Figure 10) comparado com o grupo controle. A ausência de localização nuclear também pôde ser notada após 7 dias de tratamento vs. controle (Figura 14A-e;b respectivamente). Experimentos com western blot também mostraram um aumento na fosforilação de FoXO3a após 7 dias de tratamento com T3 (Figura 14D). Esses resultados suportam a idéia de que Mdm2 pode ser importante na modulação do FoXO3a agindo como um mecanismo compensatório numa tentativa de minimizar ou reprimir a expressão dos atrofines (Atrogin/MuRF1).

Figura 14 - (A) Imunofluorescência da área de secção transversal do músculo sóleo para DAPI (azul) e Foxo3a (vermelho). Observar a co-localização basal de Foxo3a no mionúcleo dos animais controle (A:b-c) e ausência de co-localização nuclear no grupo tratado com T3 por 7 dias, associada com um aumento de marcação citoplasmática vs. controle (A: e-f).(B) Expressão protéica de FoXO3a total e fosforilado no músculo sóleo de animais tratados com T3 por 0.5, 1 e 7 dias vs. controle

5 DISCUSSÃO

Já está bem estabelecido na literatura que doses elevadas de T3 causam fraqueza e perda de massa muscular devido à atrofia. Hoje já se sabe que este quadro atrófico observado em diversos processos patológicos, inclusive no hipertireoidismo é ocasionado pelo aumento da expressão de E3 ligases músculo-específicas conhecidas como Atrogin-1 and Murf-1^{2; 39; 40; 41}. Através de um ensaio global de expressão gênica nós identificamos no presente estudo uma E3 ligase, Mdm2, que é comumente superexpressada em diversos tipos de sarcoma humano, mas que foi altamente responsiva ao T3 no músculo esquelético. Os resultados apresentados neste estudo mostraram que Mdm2 desempenha um papel contrário das E3 ligases Atrogin e MuRF1, uma vez que esta “nova” E3 expressada no músculo demonstrou ter um papel potencial na manutenção do trofismo muscular em cultura de miotubos. Além disso, nós mostramos que Mdm2 é expresso preferencialmente em fibras tipo I e em células satélites.

No que diz respeito a desenvolvimento dos animais durante todo o tempo de tratamento, nós observamos que nos primeiros dias de tratamento com T3 estes animais apresentaram uma diminuição transitória do peso corporal, porém, após 7 dias de tratamento, o peso corporal desses animais eram similares ao grupo controle, mostrando que a dose de tratamento utilizada no presente estudo não provocou quaisquer modificações no crescimento desses animais. Resultados similares já foram observados anteriormente por Capó & Sillau (1982) and Sillau (1985)^{42; 43}, nestes estudos eles observaram que o metabolismo acelerado causado pelo T3 é compensado por um aumento na ingestão de

comida, fato justificado do peso corporal dos animais tratados e controle serem similares no final do tratamento.

A hipertrofia cardíaca dependente de T3 bem como a modulação dos seus níveis séricos por feedback negativo são bem consolidados ⁴⁴. (TodNorman and Litwack 1997). Todavia estes dados foram usados como controle positivo do estudo para confirmar a efetividade do tratamento por T3. Após confirmação do hipertireoidismo experimental, análises subsequentes do peso muscular do músculo sóleo de ambos os grupos, tratado e controle, foram observados. Como esperado, o tratamento com T3 reduziu a massa muscular do músculo sóleo após 7 dias de tratamento em comparação ao grupo controle, sugerindo um aumento da proteólise muscular conforme observado em estudos anteriores^{23; 42; 45}.

Alguns estudos indicam que a perda de massa muscular decorrente do hipertireoidismo é causada por um aumento da degradação protéica, embora uma redução na síntese protéica também pode contribuir para a proteólise muscular ^{1; 46}. Entretanto ainda não está claro quais os mecanismos moleculares que participam ativamente na proteólise muscular dependente de T3. O envolvimento dos atrogenes (Atrogin; MuRF-1) na proteólise muscular em diversos processos patológicos que causam a atrofia muscular já está bem estabelecido na literatura ⁴⁷. No entanto, somente em 2009 O'Neal et al ² mostraram a responsividade dessas E3 ligases (Atrogin/MuRF-1) em animais hipertireoideos, sugerindo o envolvimento delas na regulação da perda de massa muscular ocasionada por doses elevadas de T3. Porém, é pouco provável que apenas duas E3 ligases seja responsável pela ubiquitinação massiva que ocorre na atrofia. Há diversas E3 ligases que tem sido identificadas ubiquitar substratos distintos na tumorigênese

⁴⁸, mas quase nada se sabe sobre a ação das mesmas na atrofia muscular. Portanto, é possível especular que exista outras E3 ligases no músculo que aja também como moduladoras do trofismo muscular, além de Atrogin e MuRF1.

No presente estudo nós demonstramos através do microarray que há outras E3 ligases no músculo esquelético que foram responsivas ao T3, assim como Atrogin e MuRF1 que podem suportar nossa hipótese. Dentre essas E3 ligases que foram responsivas ao T3, a E3 ligase Mdm2 chamou nossa atenção uma vez que ela mostrou uma maior responsividade ao T3.

Mdm2 é um oncogene superexpressado em diversos tipos de sarcomas e em tecidos moles como liposarcomas, osteosarcomas, histiocitoma fibroso e rabdomiossarcoma ^{49; 50}. O principal mecanismo molecular envolvendo Mdm2 na tumorigênese está relacionado com a sua interação com a proteína supressora tumoral p53. Hoje já está bem consolidado que a expressão aumentada de Mdm2 em células tumorais age como um regulador negativo essencial para os níveis de p53 na célula, visto que a interação entre eles impede a transativação mediada por p53 bem como sua ubiquitinação e degradação pelo proteassoma ³⁰. Essas ações interferem diretamente no ciclo celular, uma vez que provocam a inibição do bloqueio que impede a progressão da fase G1 mediada por p53. Mdm2 também interage com o domínio de ativação dos fatores de transcrição E2F1 e DP1 que estimulam a fase S, resultando na estimulação da atividade transcripcional dependente de E2F1/DP1, e consequentemente, ativação da proliferação celular ⁵⁰. Apesar de estar bem fundamentado que Mdm2 age como um regulador do ciclo celular, esta ação em princípio ainda não está relacionado com a fibra muscular esquelética, uma célula estável, não divisível.

Recentemente, tem sido mostrado que Mdm2 é capaz de ubiquitinar e degradar o fator de transcrição Foxo3a num modelo de imobilização, sugerindo que Mdm2 pode regular a massa muscular esquelética via inibição de FoXO3a. Interessantemente, no presente estudo nós observamos que doses suprafisiológicas de T3 promovem uma ausência nuclear massiva de FoXO3a bem como aumento de sua fosforilação no músculo esquelético, sugerindo que o FoXO3a não é o fator de transcrição responsável por estimular a resposta atrófica mediada por T3. De fato, o aumento da expressão de Mdm2 por T3 pode ser o fator responsável pela inibição de FoXO3a observado nos animais hipertireoideos. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelos efeitos positivos de T3 sobre Mdm2 ainda não estão claros e pode incluir eventos transcripcionais e pós transcripcionais. Interessantemente, tem sido mostrado que Mdm2 contém elementos responsivos para o receptor de T3, que pode estar ativado em células em proliferação. Os autores propõem que este efeito pode explicar certas ações de T3 na proliferação. Todavia, ainda é necessário determinar se esses elementos responsivos do hormônio tireoidiano são funcionais no contexto da fibra muscular esquelética ⁵¹.

No presente estudo nós mostramos que a inibição de Mdm2 causa uma redução severa no diâmetro dos miotubos, sugerindo que Mdm2 tem um papel chave no controle da massa muscular. Estes dados vêm a corroborar e complementar os achados de Bertaggia et al³⁶ os quais demonstraram claramente que Mdm2 poderia inibir FoXO3a, no entanto, ainda não havia ficado claro se este evento resultaria em alterações na massa muscular.

Em nosso ensaio de microarray, dos genes proteolíticos relacionados e responsivos ao T3 (63 genes), a vasta maioria pertencia à via ubiquitina-proteassoma (57%, 32 genes), e a maioria deles eram genes que codificavam E3 ligases (64%, 21 genes). Esses dados reforçam a importância da via proteassomal para as ações de T3 no músculo esquelético.

Dados experimentais evidenciaram que a expressão de Mdm2 é aumentada por T3 após 24 horas de tratamento *in vivo*. Interessantemente, quando diferentes doses fisiológicas de T3 foram usadas, nós obtivemos maior aumento da expressão de Mdm2 com 20X a dose fisiológica. Na dose fisiológica de 50X nós notamos uma diminuição da expressão de Mdm2 tanto no nível gênico quanto no nível protéico. Esses dados sugerem que doses mais elevadas de T3 podem estimular mecanismos adicionais que podem impedir o aumento da expressão de Mdm2.

Através de ensaios *in vitro* com cultura de miotubos, foi possível notar que os mecanismos envolvendo as ações de T3 sobre Mdm2 não são dependente de fatores sistêmicos, visto que nós mostramos em miotubos diferenciados que o T3 também foi capaz de promover um aumento na expressão gênica de Mdm2 de aproximadamente 2 vezes.

Na tentativa de obter um melhor entendimento da modulação de Mdm2 sobre o músculo esquelético, nós decidimos mensurar os níveis de RNAm de Mdm2 em outros modelos de atrofia. A imobilização e o jejum causou um aumento significativo na expressão gênica de Mdm2, entretanto, não foi observado alterações na expressão gênica de Mdm2 após tratamento com

dexametasona. Esses dados sugerem que a expressão gênica de Mdm2 pode ser diferentemente modulada nos quadros que provocam atrofia no músculo.

Foi observado no presente estudo que Mdm2 é expresso preferencialmente em fibras tipo I no músculo sóleo de animais tratados com T3. Embora não tenha sido possível explorar um mecanismo possível envolvido, nós especulamos que Mdm2 pode estar envolvida na regulação de moléculas envolvidas na especificação de fibras tipo I. Uma hipótese levantada é que Mdm2 é induzido por T3 em fibras tipo I para promover a conversão das mesmas em fibras tipo II. Recentemente, tem sido mostrado que a calcineurina, proteína chave na especificação de fibras tipo I, pode ser ubiquitinada ⁵². Outra proteína chave relacionada com a especificação de fibras tipo I é o PGC-1 α , que também pode ser ubiquitinado e degradado na gordura marrom (referência). Todavia, estudos futuros são necessários para determinar se esses fatores podem ser alvos de Mdm2.

Ensaio de imunofluorescência nos mostraram que Mdm2 é expresso em células satélites em condições basais. Interessantemente, nós observamos que o T3 diminui a expressão dos marcadores de células satélites Pax7 e MyoD, tornando difícil a abordagem dos efeitos de T3 sobre a expressão de Mdm2 nestas células. Dados similares foram mostrados previamente nos músculos orbiculares, após tratamento com T3 ⁵³.

Para investigar o papel de Mdm2 no músculo esquelético, nós inibimos farmacologicamente os níveis de Mdm2 em miotubos tratados com T3. Como esperado, o tratamento com T3 foi capaz de diminuir o diâmetro dos miotubos, mimetizando seu efeito sobre a proteólise muscular. Surpreendentemente, a

inibição de Mdm2 causou uma redução severa no diâmetro dos miotubos, mais intenso do que o T3, sugerindo que Mdm2 tem um papel importante no trofismo do músculo esquelético. Estes dados corroboram com a ideia de que o T3 tem um papel dual na massa muscular esquelética: estimulando vias catabólicas, como o sistema proteassomal, mas também estimulando vias anabólicas como Mdm2, numa tentativa de manter a homeostase celular para minimizar os efeitos deletérios causados por doses excessivas de T3.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo apresentado nesta tese abordou os efeitos do hormônio tireoidiano sobre a expressão da E3 ligase Mdm2 e suas implicações na regulação do trofismo muscular. Neste sentido, foi demonstrado que apesar de doses elevadas de T3 acionarem vias proteolíticas que culminam na atrofia muscular, o mesmo aciona vias pró-tróficas através de Mdm2 numa tentativa de minimizar os efeitos deletérios provocados no músculo de animais hipertireoideos.

REFERÊNCIAS*

- ¹ CARTER, W. J.; VAN DER WEIJDEN BENJAMIN, W. S.; FAAS, F. H. Effect of experimental hyperthyroidism on skeletal-muscle proteolysis. **Biochem. J.**, v. 194, n. 3, p. 685-690, Mar 15 1981. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7306017>>.
- ² O'NEAL, P. et al. Experimental hyperthyroidism in rats increases the expression of the ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 and stimulates multiple proteolytic pathways in skeletal muscle. **J. Cell. Biochem.**, v. 108, n. 4, p. 963-973, Nov 1 2009. ISSN 1097-4644 (Electronic)0730-2312 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19777444>>.
- ³ ABE, T. et al. Exercise intensity and muscle hypertrophy in blood flow-restricted limbs and non-restricted muscles: a brief review. **Clin. Physiol. Funct. Imaging**, v. 32, n. 4, p. 247-252, Jul 2012. ISSN 1475-097X (Electronic)1475-0961 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681600>>.
- ⁴ AOKI, M. S. et al. Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. **Muscle Nerve**, v. 40, n. 6, p. 992-999, Dec 2009. ISSN 1097-4598 (Electronic)0148-639X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19705480>>.
- ⁵ BAPTISTA, I. L. et al. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 6, p. 800-808, Jun 2010. ISSN 1097-4598 (Electronic)0148-639X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20082419>>.
- ⁶ MIYABARA, E. H. et al. Thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. **Cell. Tissue Res.**, v. 321, n. 2, p. 233-241, Aug 2005. ISSN 0302-766X (Print) 0302-766X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947969>>.
- ⁷ JUNQUEIRA, L. C. C., J. . **Histologia Básica**. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995.
- ⁸ JENSEN, J. et al. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. **Front. Physiol.**, v. 2, p. 1-11, 2011. ISSN 1664-042X (Electronic) 1664-042X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232606>>.
- ⁹ RANTANEN, T. Muscle strength, disability and mortality. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 13, n. 1, p. 3-8, Feb 2003. ISSN 0905-7188 (Print) 0905-7188 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535311>>.
- ¹⁰ LEVEILLE, S. G.; RESNICK, H. E.; BALFOUR, J. Gender differences in disability: evidence and underlying reasons. . **Aging**, v. 12, n. 2, p. 106-112, 2000.
- ¹¹ BODINE, S. C. et al. 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, Nov 2001. ISSN

1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11715023> >.

¹² GLASS, D. J. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 346, p. 267-278, 2010. ISSN 0070-217X (Print) 0070-217X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593312> >.

¹³ 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, n. 7, p. 1807-1819, Jul 2006. ISSN 1046-6673 (Print) 1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738015> >.

¹⁴ GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 37, n. 10, p. 1974-1984, Oct 2005. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087388> >.

¹⁵ JAGOE, R. T.; GOLDBERG, A. L. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 4, n. 3, p. 183-190, May 2001. ISSN 1363-1950 (Print) 1363-1950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517350> >.

¹⁶ SUETTA, C. et al. Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. **J. Appl. Physiol.**, v. 107, n. 4, p. 1172-1180, Oct 2009. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661454> >.

¹⁷ YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, Jul 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427693> >.

¹⁸ BARRA, G. et al. Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoideano **Arquivo Brasileiro de endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

¹⁹ DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Thyroid**, v. 6, n. 5, p. 497-504, Oct 1996. ISSN 1050-7256 (Print) 1050-7256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8936679> >.

²⁰ LAZAR, M. A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocr. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 184-193, Apr 1993. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8325251> >.

²¹ NUNES, M. Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, p. 639-643, 2003.

²² RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annu. Rev. Med.**, v. 46, p. 443-453, 1995. ISSN 0066-4219 (Print) 0066-4219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7598477> >.

²³ NICOL, C. J.; BRUCE, D. S. Effect of hyperthyroidism on the contractile and histochemical properties of fast and slow twitch skeletal muscle in the rat. **Pflugers. Arch.**, v. 390, n. 1, p. 73-79,

Apr 1981. ISSN 0031-6768 (Print) 0031-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6454111> >.

²⁴ CAPÓ, L.; SILLAU, A. The effect of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. **The Journal of Physiology**, v. 342, p. 1-14, 1983.

²⁵ TAWA, N. E., JR.; ODESSEY, R.; GOLDBERG, A. L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 1, p. 197-203, Jul 1 1997. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202072> >.

²⁶ LECKER, S. H. et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J. Nutr.**, v. 129, n. 1S Suppl, p. 227S-237S, Jan 1999. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915905> >.

²⁷ ATTAIX, D. et al. [Regulation of ubiquitin-proteasome dependent muscular proteolysis by hormones and nutrients]. **Journ. Annu. Diabetol. Hotel. Dieu.**, p. 123-133, 2002. ISSN 0075-4439 (Print) 0075-4439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525137> >.

²⁸ HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 425-479, 1998. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759494> >.

²⁹ KOHN, K.; POMMIER, Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 331, p. 816-827, 2005.

³⁰ MOMAND, J.; WU, H. H.; DASGUPTA, G. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. **Gene**, v. 242, n. 1-2, p. 15-29, Jan 25 2000. ISSN 0378-1119 (Print) 0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721693> >.

³¹ VASSILEV, L. T. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. **Science**, v. 303, n. 5659, p. 844-848, Feb 6 2004. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704432> >.

³² MONTES DE OCA LUNA, R.; WAGNER, D. S.; LOZANO, G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. **Nature**, v. 378, n. 6553, p. 203-206, Nov 9 1995. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477326> >.

³³ BOESTEN, L. S. et al. Mdm2, but not Mdm4, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death. **Cell Death Differ.**, v. 13, n. 12, p. 2089-2098, Dec 2006. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729027> >.

³⁴ FAKHARZADEH, S. S.; TRUSKO, S. P.; GEORGE, D. L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. **EMBO J**, v. 10, n. 6, p.

1565-1569, Jun 1991. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2026149> >.

³⁵ FU, W. et al. MDM2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 21, p. 3987-4000, May 22 2009. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19321440> >.

³⁶ BERTAGGIA, E.; COLETTI, L.; SANDRI, M. Posttranslational modifications control FoxO3 activity during denervation. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 302, n. 3, p. C587-596, Feb 1 2012. ISSN 1522-1563 (Electronic) 0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094330> >.

³⁷ KINUGAWA, K. et al. Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Circ. Res.**, v. 89, n. 7, p. 591-598, Sep 28 2001. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577024> >.

³⁸ HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 16, n. 4-5, p. 575-584, Aug-Oct 2005. ISSN 1084-9521 (Print) 1084-9521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16095933> >.

³⁹ SACHECK, J. M. et al. 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, Jan 2007. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116744> >.

⁴⁰ GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, n. 25, p. 14440-14445, Dec 4 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717410> >.

⁴¹ BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, Nov 23 2001. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679633> >.

⁴² CAPO, L. A.; SILLAU, A. H. The effect of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. **J. Physiol.**, v. 342, p. 1-14, Sep 1983. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6226777> >.

⁴³ SILLAU, A. H. Skeletal muscle capillarity in hyperthyroid and hypothyroid rats. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 191, p. 341-353, 1985. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3008511> >.

⁴⁴ NORMAN, A.; LITWACK, G. Hormones. **New York: Academic Press** 1997.

⁴⁵ ALAMDARI, N.; O'NEAL, P.; HASSELGREN, P. O. Curcumin and muscle wasting: a new role for an old drug? **Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 125-129, Feb 2009. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028079> >.

- ⁴⁶ GOLDBERG, A. L. et al. Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. **Fed. Proc.**, v. 39, n. 1, p. 31-36, Jan 1980. ISSN 0014-9446 (Print) 0014-9446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7351242> >.
- ⁴⁷ GLASS, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends. Mol. Med.**, v. 9, n. 8, p. 344-350, Aug 2003. ISSN 1471-4914 (Print) 1471-4914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928036> >.
- ⁴⁸ KOHN, K. W.; POMMIER, Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the Off-On switch of p53 in response to DNA damage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 331, n. 3, p. 816-827, Jun 10 2005. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15865937> >.
- ⁴⁹ OLINER, J. D. et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 80-83, Jul 2 1992. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1614537> >.
- ⁵⁰ GUO, C. S. et al. Regulation of MyoD activity and muscle cell differentiation by MDM2, pRb, and Sp1. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 25, p. 22615-22622, Jun 20 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702724> >.
- ⁵¹ QI, J. S. et al. Regulation of the mdm2 oncogene by thyroid hormone receptor. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 864-872, Jan 1999. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858609> >.
- ⁵² MAEJIMA, Y. et al. MuRF1 Negatively Regulates Pathological Cardiac Hypertrophy Through Downregulation of Calcineurin A. **Circ. Heart. Fail.**, Feb 13 2014. ISSN 1941-3297 (Electronic) 1941-3289 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526353> >.
- ⁵³ HARRISON, A. R.; LEE, M. S.; MCLOON, L. K. Effects of elevated thyroid hormone on adult rabbit extraocular muscles. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 183-191, Jan 2010. ISSN 1552-5783 (Electronic) 0146-0404 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19628737> >.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002