

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

Diego de Moraes Leite

Papel dos glicocorticoides na regulação da síntese de proteínas e autofagia em
músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio

Ribeirão Preto

2023

Diego de Moraes Leite

Papel dos glicocorticoides na regulação da síntese de proteínas e na autofagia em músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Ribeirão Preto

2023

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

LEITE, Diego de Moraes

Papel dos glicocorticoides na regulação da síntese de proteínas e na autofagia em músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio. Ribeirão Preto, 2023.

71 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Navegantes, Luiz Carlos Carvalho

1. Glicocorticoides. 2. Síntese Proteica. 3. Redd1. 4. Autofagia.

LEITE, D. M. Papel dos glicocorticoides na regulação da síntese de proteínas e autofagia em músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatoria

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha tia Alda Carvalho Leite, pela sua luta diária para me dar o melhor desse mundo.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a todas as pessoas e instituições que me ajudaram durante este trabalho de dissertação. Sem o apoio e encorajamento de todos vocês, este projeto não seria possível.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha tia, **Alda**, e aos meus pais, **Nalva e Ivan**, por sempre me apoiarem em minhas escolhas e estarem ao meu lado, independente de quaisquer circunstâncias.

Agradeço também ao **Luiz Carlos Carvalho Navegantes**, meu professor e orientador, por ter me dado a oportunidade de aprender com ele e por me guiar durante todo o processo, compreendendo minhas limitações e incentivando-me a progredir.

À Professora **Isis do Carmo Kettelhut** que merece minha admiração e gratidão pelo exemplo que ela é como profissional e como pessoa. Agradeço por todos os seus ensinamentos e por suas palavras e sorrisos que sempre nos deixam leves e confortados.

Gostaria de agradecer a todos os membros do Laboratório de Controle do Metabolismo, em especial Alexandre Zara, Aline Zanatta, Ana Assis, Elza Fillipin, Gabriel Skiba, Henrique Morgan, Karine Emanuelle, Letícia Andrade, Lilian Heck, Maria Antonieta Garófalo, Matheus Moro, Natalia Lautherbach, Natany Reis, Vinicius Taboni, Juliano Machado, Neusa Zanon, Rafael Rossi e Victor Galban. Obrigado por compartilharem seus conhecimentos, conversas, paciência, risadas, broncas, sugestões, mas acima de tudo, obrigado pela amizade.

Também gostaria de agradecer ao laboratório dos professores José Antunes e Lucila Elias do Departamento de Fisiologia da FMRP, e à Maria Valci pelas análises de corticosterona.

Agradeço ao professor Dr. Ricardo M. Xavier Leão e às professoras Dra. Evelin Capellari Carnio e Dra. Margaret de Castro pela valiosa contribuição durante minha banca de qualificação.

Agradeço ao corpo docente, administrativo e técnico dos Departamentos de Fisiologia e de Bioquímica e Imunologia da FMRP por sempre estarem à disposição quando foi necessário. Em especial, agradeço à Cláudia Vanzela, Elisa Aleixo e Fernando Rastello pelo apoio administrativo e à Evelin Cárnio pela sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho como minha supervisora.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família, incluindo tios, avós e primos, por todo o incentivo, compreensão e carinho que me deram em todos os períodos da minha vida. Não tenho palavras para expressar o quão importante vocês são para mim.

Este trabalho é resultado de um esforço conjunto de cada um de vocês que contribuíram de uma forma única e especial. Mais uma vez, agradeço por acreditarem em mim e no meu trabalho.

Meus sinceros agradecimentos também vão para a CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro fornecido.

Resumo

RESUMO

LEITE, Diego de Moraes. Papel dos glicocorticoides na regulação da síntese de proteínas e autofagia em músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio. 2023. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2023

As respostas adaptativas a ambientes de baixa temperatura envolvem diversas alterações endócrinas, metabólicas, cardiovasculares e comportamentais. Estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que a exposição ao frio, durante 24h, inibe a síntese de proteínas em músculos esqueléticos de ratos. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes a essas respostas e as possíveis diferenças dependentes do tipo de fibra muscular não são bem conhecidos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o papel dos glicocorticoides na regulação da síntese proteica e autofagia, assim como nas vias de sinalizações relacionadas em diferentes tipos de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao estresse térmico agudo. Para isso, camundongos machos C57/Bl6 (8-12 semanas) foram submetidos à adrenalectomia (ADX) ou à cirurgia fictícia (Sham) e expostos ao frio (4°C) ou temperatura ambiente (24°C), por 3 h (CEUA 211/2016). Após a eutanásia, o sangue foi coletado e os músculos esqueléticos EDL (glicolítico), soleus (oxidativo) e gastrocnêmio (misto) removidos. Em seguida, procedeu-se avaliações hormonais, bioquímicas e moleculares. Todos os valores foram expressos como média \pm SEM (n=6-8) e a análise de variância (ANOVA) foi usada como teste estatístico (p<0,05). O estresse térmico aumentou a secreção plasmática de corticosterona (~2x), reduziu a síntese de proteínas (~50%), avaliada por métodos *in vitro* e *in vivo*, e aumentou a expressão gênica (~10x) e o conteúdo (~8x) de Redd1 (Regulated in Development and DNA Damage Responses 1), um potente inibidor da sinalização da via mTOR, exclusivamente em músculos EDL. Todos esses efeitos induzidos pelo frio foram abolidos em animais do grupo ADX. Além disso, a exposição ao frio reduziu o estado de fosforilação de proteínas alvos da mTOR, a p-S6 (~75%), em ambos os músculos EDL e soleus, e p-4E BP1 (~40%), apenas no soleus. Em EDL, o frio também reduziu a fosforilação de Akt^{Thr308} no grupo Sham, mas não no grupo ADX. O tratamento com rapamicina (inibidor da mTORC1) preveniu completamente o efeito supressor da ADX na inibição da síntese proteica induzida pelo frio. Em paralelo, o RNAm da I κ B β , um

gene autofágico, aumentou (~3x) nos músculos dos animais expostos ao frio, mas esse efeito não foi observado no grupo ADX. Para a avaliação do fluxo autofágico, os animais foram tratados com colchicina e se verificou que o estresse térmico aumentou o conteúdo muscular de LC3II, sendo este efeito completamente abolido pela adrenalectomia. O conjunto desses dados sugere que a corticosterona secretada pela adrenal, em condições de exposição aguda (3h) a baixas temperaturas, ativa Redd1 e leva à inibição da via Akt/mTOR com consequente redução da síntese proteica de músculos glicolíticos e aumento da autofagia.

Palavras-chave: Glicocorticoides; Síntese proteica; Redd1; Autofagia.

ABSTRACT

LEITE, Diego de Moraes. The role of glucocorticoids in the regulation of protein synthesis and autophagy in skeletal muscles of mice exposed to cold. 2023. 71 f. Dissertation (Master in Physiology) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2023

Adaptive responses to low-temperature environments involve various endocrine, metabolic, cardiovascular, and behavioral changes. Previous studies from our laboratory have shown that exposure to cold for 24 hours inhibits protein synthesis in rat skeletal muscles. However, the underlying molecular mechanisms of these responses and the possible fiber type-dependent differences are not well known. Therefore, the present study aimed to investigate the role of glucocorticoids in regulating protein synthesis and autophagy, as well as related signaling pathways in different types of skeletal muscles of mice exposed to acute thermal stress. For this purpose, male C57/Bl6 mice (8-12 weeks) were subjected to adrenalectomy (ADX) or sham surgery (SHAM) and exposed to cold (4°C) or room temperature (24°C) for 3 hours (CEUA 211/2016). After euthanasia, blood was collected, and skeletal muscles EDL (glycolytic), soleus (oxidative), and gastrocnemius (mixed) were removed, followed by hormonal, biochemical, and molecular evaluations. All values were expressed as mean \pm SEM (n=6-8), and analysis of variance (ANOVA) was used as a statistical test ($p < 0.05$). Thermal stress increased plasma corticosterone secretion (~2x), reduced protein synthesis (~50%), evaluated by *in vitro* and *in vivo* methods, and increased gene expression (~10x) and content (~8x) of Redd1 (Regulated in Development and DNA Damage Responses 1), a potent inhibitor of the mTOR signaling pathway, exclusively in EDL muscles. All these cold-induced effects were abolished in ADX animals. In addition, cold exposure reduced the phosphorylation state of mTOR target proteins, p-S6 (~75%) in both EDL and soleus muscles, and p-4E BP1 (~40%) only in soleus. In EDL, cold also reduced Akt^{Thr308} phosphorylation in the sham group but not in the ADX group. Treatment with rapamycin (mTORC1 inhibitor) completely prevented the suppressive effect of ADX on cold-induced protein synthesis inhibition. In parallel, *Ic3b* mRNA, an autophagic gene, increased (~3x) in the muscles of animals exposed to cold, but this effect was not observed in the ADX group. For the evaluation of autophagic flux, animals were treated with colchicine, and

it was found that thermal stress increased the muscle content of LC3II, which ADX completely abolished. Taken together, these data suggest that corticosterone secreted by the adrenal gland under conditions of acute exposure (3h) to low temperatures activates Redd1 and leads to inhibition of the Akt/mTOR pathway, resulting in reduced protein synthesis in glycolytic muscles and increased autophagy.

Keywords: Glucocorticoids; Protein synthesis; Redd1; Autophagy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11β-HSDs	11 β -Hidroxiesteroide Desidrogenase
4E- BP1	<i>Eucaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein-1</i>
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ADX	Adrenalectomia
AGLs	Ácidos Graxos Livres
Atgs	<i>Autophagy-Related Genes</i>
Akt	Protein kinase B
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
Ddit4	<i>DNA Damage Inducible Transcript 4</i>
dig2	<i>Gene 2 Induced By Dexamethasone</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDL	Extensor Digitorum Longus
eIF4E	<i>Eucaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>
eIF4F	<i>Eukaryotic initiation factor 4F</i>
eIF4G	<i>Eucaryotic Translation Initiation Factor 4G</i>
FOXO	Forkhead box protein O1
Gabarap	<i>γ-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein</i>
GC	Glicocorticoides
GR	Receptor de Glicocorticoides
HPA	Hipotálamo – Hipófise (Pituitária) – Adrenal
LC3	<i>Microtubule-Associated Protein Light Chain 3</i>
MAFbx	<i>Muscle Atrophy F-box</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
MuRF1	Muscle RING Finger 1
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
Redd1	<i>Regulated in development and DNA damage response 1</i>
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
Sham	Animais submetidos a cirurgia fictícia
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SUnSet	SURface SEnsing of Translation

TA	Temperatura Ambiente
TAB	Tecido Adiposo Branco
TSC	Tuberous Sclerosis
TXNIP	Tioredoxina
Ub	Ubiquitina
UPS	Ubiquitina Proteassoma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. <i>Glicocorticoides</i>	20
1.2. <i>Controle do metabolismo intermediário durante a exposição ao frio</i>	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. <i>Objetivos específicos</i>	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. <i>Animais</i>	30
3.2. <i>Delineamento experimental</i>	30
3.2.1. <i>Adrenalectomia</i>	31
3.2.2. <i>Determinação da glicemia e dosagens séricas de insulina e ácidos graxos livres</i>	31
3.2.3. <i>Determinação de corticosterona plasmática</i>	31
3.2.4. <i>Avaliação da síntese total de proteínas em músculos isolados</i>	32
3.2.5. <i>Velocidade de síntese proteica in vivo pelo método SUnSet</i>	32
3.2.6. <i>Western blotting</i>	33
3.2.7. <i>Expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real</i>	34
3.2.8. <i>Tratamento in vivo com rapamicina</i>	35
3.2.9. <i>Análise in vivo do fluxo autofágico</i>	36
3.3. <i>Análise Estatística</i>	36
4. Resultados.....	39
4.1. <i>Parâmetros bioquímicos e hormonais em camundongos expostos ao frio</i>	39
4.2. <i>Efeito do frio na síntese proteica em diferentes tipos de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio</i>	41
4.3. <i>Efeito do frio no conteúdo de Redd1 em diferentes tipos de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio</i>	43
4.4. <i>Efeito do frio na via da mTOR em diferentes tipos de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio</i>	44
4.5. <i>Papel dos glicocorticoides na síntese de proteínas e na expressão de Redd1 em músculos glicolíticos e mistos de camundongos expostos ao frio</i>	45
4.6. <i>Participação da via mTORC1 na redução da síntese de proteínas induzida pelo frio</i>	47
4.7. <i>Regulação do fluxo autofágico em músculos de camundongos expostos agudamente ao frio</i>	49
4.8. <i>Regulação da via Akt/FOXO em camundongos expostos ao frio agudo</i>	51

5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é composto basicamente por proteínas e representa cerca de 40-50% da massa corporal total. Além de sua função motora, o tecido muscular esquelético exerce um papel essencial no balanço do metabolismo energético (SARTORI; ROMANELLO; SANDRI, 2021; VAINSHTEIN; SANDRI, 2020). A massa muscular esquelética é o resultado de um fino equilíbrio entre os processos de síntese e degradação de proteínas musculares e é regulada por sinais anabólicos e catabólicos provenientes de fatores mecânicos, neurais, hormonais, genéticos e nutricionais (BODINE; FURLOW, 2015). Desta forma, o balanço proteico da musculatura esquelética pode ser modificado por alterações do ambiente externo e por diferentes tipos de estresse (NADER; MCLOUGHLIN; ESSER, 2005).

O estresse pode ser definido como qualquer situação de perturbação do equilíbrio entre um organismo vivo e seu meio ambiente (RANABIR; REETU, 2011). Em uma situação de estresse, há dois principais sistemas neuroendócrinos que agem de maneira integrada para manter a homeostase e o funcionamento do organismo. O primeiro deles é o eixo Hipotálamo – Hipófise (Pituitária) – Adrenal (HPA), que vai responder frente ao agente estressor, físico ou emocional, por meio da secreção dos hormônios glicocorticoides (cortisol no homem e corticosterona nos roedores). O segundo sistema que responde ao estresse é o Sistema Nervoso Simpático (SNS), o qual é formado por dois componentes: as terminações simpáticas que liberam noradrenalina na fenda sináptica dos diferentes tecidos periféricos e a porção medular da adrenal que secreta adrenalina diretamente na circulação sanguínea (KETTELHUT; NAVEGANTES, In: Aires, 2018).

1.1. Glicocorticoides

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios esteroides sintetizados e secretados pelo córtex da glândula adrenal em resposta à ativação do eixo HPA. Neste eixo, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é sintetizado, principalmente, por neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e liberado na eminência mediana, onde é transportado pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário até o lobo anterior da hipófise. Nos corticotrofos hipofisários, o CRH ativa a cascata de sinalização da do AMPc, o que leva à síntese e secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para a corrente sanguínea. Por sua vez, o ACTH é o principal hormônio estimulador da

síntese e secreção dos GCs pelas células localizadas na zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais (AGUILERA, 1994; MEIJSING, 2015).

A secreção pulsátil de ACTH e de cortisol (ou corticosterona) obedece a um padrão de ritmo circadiano endógeno e depende do ciclo dia-noite, do padrão de sono e vigília e do hábito alimentar. Desta forma, sua secreção pode ser alterada por perturbações nos fatores mencionados e/ou por diferentes tipos de estresse agudos ou crônicos (RUGINSK et al., 2018).

Os GCs exercem diversas ações fisiológicas na regulação do metabolismo energético, no metabolismo hídrico e eletrolítico, nas reações imunes, no controle da pressão arterial sistêmica, etc. Mais especificamente no metabolismo intermediário, são hormônios essenciais na regulação do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos (ANDREWS; WALKER, 1999).

A biodisponibilidade dos GCs depende da ação das enzimas 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 1 e 2 (11 β -HSDs). Em condições fisiológicas, a 11 β -HSD do tipo 1 promove a conversão da cortisona (estado inativo) em cortisol (estado ativo) (BRAUN; MARKS, 2015), enquanto a do tipo 2 promove a inativação do cortisol. A dexametasona que é o corticoide sintético mais utilizado na prática médica não é suscetível à inativação pela enzima 11 β -HSD2 e, portanto, tem grande biodisponibilidade plasmática.

A ação clássica dos GCs é do tipo genômica, que se inicia com a ligação do hormônio ao Receptor de Glicocorticoides (GR), o qual é um membro da subclasse de receptores hormonais da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição. No citosol, o GR permanece ligado a um complexo inativo contendo a proteína de choque térmico HSP90. Ao ser ativado pelo hormônio, o GR desliga-se deste complexo e é translocado para o núcleo, onde age como um regulador transcricional específico da sequência de DNA de genes-alvo sensíveis ao GC. Além de sua atividade dependente da ligação ao DNA, grande parte da ação do GR também depende de sua capacidade direta de interação proteína-proteína com outros reguladores da transcrição e o controle subsequente de subconjuntos distintos de genes-alvo (KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013; VEGIOPOULOS; HERZIG, 2007).

Os GCs exercem um papel chave no controle do metabolismo de carboidratos. No fígado, o cortisol ativa enzimas envolvidas na gliconeogênese, principalmente a glicose-6-fosfatase e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), e com isso promove um aumento da produção hepática de glicose. Em tecidos periféricos,

principalmente no músculo esquelético, o cortisol inibe a captação e a utilização de glicose e com isso antagoniza a ação da insulina. No tecido adiposo, principalmente no visceral, exerce ações lipogênicas, mas também pode ter ações lipolíticas sítio específicas (NAVEGANTES; KETTELHUT. In: Rui Curi, 2017)

É sabido que os GCs exercem potentes efeitos catabólicos no metabolismo de proteínas do músculo esquelético e contribuem para a perda de massa observada em diferentes condições como o hipercortisolismo, sepse, acidose metabólica, e diabetes (BODINE; FURLOW, 2015). Os efeitos atróficos dos GCs na musculatura esquelética variam de acordo com o tipo de GC sintético usado, sexo, idade, espécie e, principalmente, com o tipo de fibra muscular. Por exemplo, foi demonstrado que o tratamento com cortisona em ratos levou a uma acentuada atrofia e aumento do catabolismo proteico do músculo plantar que, assim como o EDL, é um músculo composto principalmente por fibras do tipo IIb de metabolismo glicolítico. Por outro lado, o tratamento hormonal teve pouco efeito na área de secção transversa do soleus, um músculo tipicamente oxidativo e rico em fibras do tipo Ia (GOLDBERG, 1969; GOLDBERG; GOODMAN, 1969). Os mecanismos intracelulares relacionados aos efeitos atróficos diferenciais dos GCs em diferentes tipos de fibras musculares ainda não estão completamente elucidados, mas envolvem a redução da síntese e/ou aumento da degradação proteica (SCHAKMAN et al., 2013).

Os efeitos proteolíticos dos GCs são muito bem conhecidos e dependem da ativação enzimática e expressão gênica de diferentes componentes do sistema Ubiquitina (Ub)-Proteassoma (UPS), que é o principal sistema proteolítico presente nas fibras musculares (SCHAKMAN et al., 2013). A degradação de proteínas musculares pelo sistema proteolítico UPS depende, inicialmente, que os substratos alvos de degradação sejam ligados de forma covalente a várias moléculas de Ub formando os complexos poliubiquitinados. Este processo depende, por sua vez, da ação de três famílias de enzimas: a E1 ou enzima ativadora da Ub, a E2 ou enzima carreadora e a enzima E3 ou Ub-ligase, que é a enzima limitante, uma vez que tem a capacidade de reconhecer o substrato proteico que deve ligar-se à Ub (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Entre os diferentes tipos de Ub-ligases conhecidas, as que são específicas do músculo são a MuRF1 (*Muscle RING Finger 1*) e a atrogin-1 [também conhecida como MAFbx (*Muscle Atrophy F-box*)] (BODINE et al., 2001). Juntas, essas proteínas, assim como dezenas de outras, participam de um “programa atrófico” que precede a degradação proteica pelo proteassoma e a perda de massa

muscular. Há inúmeras evidências de que o cortisol, tanto em humanos como em roedores, leva à atrofia muscular por meio da ativação transcricional deste programa (BONALDO; SANDRI, 2013; CLARKE et al., 2007; SACHECK et al., 2004; SANDRI et al., 2004; SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008). Por outro lado, as ações deste hormônio no controle da autofagia são muito menos conhecidas.

A autofagia é um processo catabólico vital responsável pela formação de uma vesícula com membrana dupla, o autofagossomo, que engloba diferentes moléculas e as conduz à degradação pelas catepsinas presentes no interior dos lisossomos (KLIONSKY; EMR, 2000). Os principais alvos do sistema lisossomal/autofágico são os receptores de membrana, agregados proteicos, lipídios e organelas danificadas como, por exemplo, as mitocôndrias. Os genes relacionados à autofagia são conhecidos como *Atgs* (*autophagy-related genes*) que codificam proteínas chaves para este processo, como a LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) e a Gabarap (*γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*). A conjugação dessas proteínas a lipídios parece ser o evento decisivo para a formação do autofagossomo (TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2004) e por isso têm sido utilizadas como marcadores de autofagia em diferentes tipos celulares (KLIONSKY et al., 2016). Diferentes estudos em cultura de células musculares mostram que a privação de nutrientes e soro, uma situação que mimetiza o jejum, leva à formação do autofagossomo (ZHAO et al., 2007). Além disso, condições atroficas como o jejum, a denervação motora (secção do nervo isquiático) (MAMMUCARI et al., 2007; ZHAO et al., 2007) e o tratamento crônico com dexametasona (HAN et al., 2021) também aumentam a expressão de diferentes marcadores autofágicos em músculos esqueléticos de animais adultos. Embora se saiba que a ativação do fluxo autofágico é fundamental para a homeostase celular em resposta ao estresse metabólico, a modulação do sistema lisossomal/autofágico no tecido muscular em situações fisiológicas *in vivo* assim como seus fatores hormonais regulatórios ainda são muito pouco conhecidos.

Os mecanismos anti-anabólicos dos GCs envolvem a inibição direta da síntese proteica assim como a inibição do transporte de aminoácidos para dentro do músculo (KOSTYO; REDMOND, 1966). Grande parte dessas ações dos GCs depende da inativação da via da Akt, uma proteína chave na transdução de sinais biológicos que regulam os processos de síntese e degradação das proteínas musculares (NAKAO et al., 2009; ZHENG et al., 2010). Além de promover desfosforilação da Akt, sabe-se que os GCs inibem diretamente a fosforilação de FOXO e com isso promovem a ativação

deste fator transcricional e a consequente transcrição de diferentes genes relacionados à ativação do sistema Ub-proteasoma e autofagia (BRITTO et al., 2014). Sabe-se também que estes hormônios promovem inativação da via da mTOR (*mammalian target of rapamycin*), um intermediário clássico de ativação dos processos de síntese proteica. A mTOR é uma proteína de atividade serina/treonina quinase composta por dois complexos distintos, sendo um sensível à rapamicina (mTORC1) e outro não (mTORC2) (TCHEVKINA; KOMELKOV, 2012).

A via de sinalização da mTOR é regulada positivamente pela Akt, que sabidamente é fosforilada e ativada por hormônios anabólicos como a insulina e o IGF-1. Quando fosforilada e ativada por Akt, a mTORC1 pode fosforilar a p70S6 kinase (p70S6K) com consequente ativação da proteína ribossomal S6 (S6) dando início assim ao início da síntese proteica. A mTOR também pode fosforilar e inativar a 4E-BP1 (*eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein-1*). Isto resulta na liberação do fator de iniciação eIF4E (*eucaryotic translation initiation factor 4E*), que agora ativo pode se ligar ao eIF4G (*eucaryotic translation initiation factor 4G*) formando o complexo de iniciação eIF4F (*Eukaryotic initiation factor 4F*), dando início assim ao processo de tradução do RNAm (HARA et al., 1997; ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2010).

Ao contrário da insulina/IGF-1, já é bem demonstrado que os GCs defosforilam e inativam a Akt levando, conseqüentemente, à inativação do complexo mTORC1 e à redução da síntese proteica (SCHAKMAN et al., 2013). Além disso, sabe-se que os GCs podem estimular a expressão gênica de Redd1 (*Regulated in development and DNA damage response 1*), também conhecida como Ddit4 (*DNA Damage Inducible Transcript 4*) ou dig2 (*gene 2 induced by dexamethasone*). Redd1 é expressa em praticamente todos os tecidos do organismo e atua como um potente supressor da síntese proteica por meio da estabilização do complexo proteico *tuberous sclerosis 1* e 2 (TSC1-TSC2) e subsequente inibição da sinalização do complexo 1 da cascata da mTOR (mTORC1) (SOFER et al., 2005). Embora seu mecanismo de ação ainda seja pouco conhecido, sabe-se que diferentes condições adversas como o jejum, hipóxia, sepse e diabetes induzem ativação transcricional de Redd1, o que leva à inibição da maquinaria pró-sintética (DEYOUNG et al., 2008; GORDON et al., 2016). Os mecanismos e vias de sinalizações utilizados pelo cortisol nessas diferentes situações são bem conhecidos (HU et al., 2009), mas muito pouco se conhece sobre o papel

deste hormônio no controle do metabolismo de proteínas da musculatura esquelética em uma situação de demanda energética fisiológica como o frio.

1.2. Controle do metabolismo intermediário durante a exposição ao frio

Em resposta à queda de temperatura, os animais endotérmicos acionam diversos ajustes regulatórios com a finalidade de manter a temperatura corporal constante numa ampla faixa de variações da temperatura do ambiente. Um dos principais mecanismos termorreguladores utilizados, durante a exposição ao frio, é o de ganho de calor desencadeado pelo aumento da taxa metabólica basal. Além deste, sabe-se que a termogênese pode ocorrer pelo tremor da musculatura esquelética (termogênese dependente de tremor muscular) e pela ativação do tecido adiposo marrom, no processo denominado termogênese independente de tremor muscular (MASLOV; VYCHUZHANOVA, 2016; KETTELHUT; NAVEGANTES, In: Aires, 2018).

Os dois tipos facultativos de termogênese (dependente e independente do tremor) são regulados pelo Sistema Nervoso Central (SNC) e utilizam como fonte principal de energia, para a produção de calor, a oxidação dos ácidos graxos e glicose (KETTELHUT; NAVEGANTES, In: Aires, 2018). Os ácidos graxos são oriundos da hidrólise dos triacilgliceróis armazenados no próprio tecido (músculo e tecido adiposo marrom) e, principalmente, da hidrólise dos triacilgliceróis estocados no tecido adiposo branco e captados da circulação (KETTELHUT; NAVEGANTES, In: Aires, 2018). O estresse térmico reduz as concentrações plasmáticas de insulina e aumenta as concentrações plasmáticas de glucagon, cortisol e adrenalina, o que leva ao aumento da glicemia plasmática por meio da ativação da glicogenólise e da gliconeogênese hepática.

O nosso laboratório tem se dedicado ao estudo das alterações do metabolismo de proteínas musculares induzidas pelo estresse térmico e tem demonstrado que os efeitos catabólicos induzidos por este tipo de estresse variam de acordo com o tipo de fibra muscular do animal. Manfredi et al. (2013) verificaram que a exposição de ratos à temperatura de 4°C, durante 24 h, leva à hiperativação do sistema UPS, sendo os músculos brancos (EDL) muito mais afetados do que os vermelhos (soleus). Em seguida, observaram que a depleção plasmática de adrenalina nesses animais exacerba a degradação de proteínas em soleus, mas não em EDL (MANFREDI et al., 2017). Embora estes e outros estudos da literatura tenham demonstrado que o frio reduz a síntese proteica muscular, pouco se conhece sobre mecanismos moleculares

envolvidos neste efeito assim como possíveis diferenças de respostas entre os músculos brancos e vermelhos.

Considerando que o estresse térmico leva à estimulação do eixo HPA (FUKUHARA et al., 1996) e que Redd1 é regulada pelos GCs em diferentes situações catabólicas, aventou-se a possibilidade de que Redd1 seja uma proteína chave modulada pela corticosterona na supressão da síntese proteica e na ativação da autofagia em músculos esqueléticos de camundongos expostos agudamente ao frio.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Investigar o papel dos glicocorticoides na regulação da síntese proteica e autofagia, assim como nas vias de sinalizações relacionadas, em músculos esqueléticos de camundongos expostos agudamente ao frio.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar como a exposição aguda ao frio afeta a síntese de proteínas em diferentes tipos de músculos esqueléticos (oxidativos e glicolíticos) de camundongos.
- Comparar o conteúdo de Redd1 e de componentes da via da mTOR em diferentes tipos de músculos esqueléticos (oxidativos e glicolíticos) em resposta ao frio.
- Verificar o efeito da adrenalectomia na expressão de Redd1 e velocidade da síntese proteica na musculatura esquelética de animais mantidos em temperatura ambiente ou em baixa temperatura.
- Avaliar o efeito do frio e da adrenalectomia no fluxo autofágico e no conteúdo das Ub-ligases em músculos esqueléticos.
- Investigar o efeito do frio na via de sinalização da Akt/mTOR e Foxo em músculos esqueléticos normais ou adrenalectomizados.

Materiais E Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57/Bl-6 com 6 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da USP.

Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos da FMRP-USP dispostos em racks ventiladas (n=3-5), com temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($\approx 55\%$) controlada, ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), livre acesso à água e ração balanceada (Nuvilab CR1 – Nuvital).

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, seguindo as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP, sob o protocolo nº 211/2016.

3.2. Delineamento experimental

Ao atingirem 8 semanas de idade, os animais foram submetidos à adrenalectomia (ADX) ou cirurgia fictícia (Sham). Após a recuperação completa da anestesia e constatação de um bom estado geral, os animais retornaram ao biotério, onde permaneceram durante 7 dias, até o dia do experimento.

No dia do experimento, os animais foram divididos em 4 grupos: TA Sham (Animais Sham mantidos em temperatura ambiente de $24 \pm 2^\circ\text{C}$); TA ADX (Animais adrenalectomizados mantidos em temperatura ambiente de $24 \pm 2^\circ\text{C}$); Frio Sham (Animais Sham expostos ao frio de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 h); e Frio ADX (Animais adrenalectomizados expostos ao frio de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 h). Os animais expostos ao frio foram mantidos, individualmente, em caixas apropriadas com água, às 8h da manhã, em câmara fria a 4°C , no Departamento de Fisiologia da FMRP-USP. Após 3h (11h da manhã), a glicemia foi coletada e, em seguida, foi realizada a eutanásia por decapitação sob anestesia para a coleta de sangue e remoção dos músculos soleus (oxidativo), EDL (glicolítico) e gastrocnêmio (misto), os quais foram identificados, imersos em nitrogênio líquido e, por fim, armazenados em freezer -80°C . Para evitar

diferença de consumo alimentar dos grupos, todos os animais foram mantidos em jejum, durante o período experimental.

Um grupo separado de animais foi tratado com rapamicina ou colchicina, para a avaliação da síntese proteica em músculos isolados (ver item 3.2.8) e do fluxo autofágico (ver item 3.2.9), respectivamente.

3.2.1. Adrenalectomia

Os animais foram anestesiados com a mistura de cloridrato de Xilazina e Ketamina (10 mg/kg e 85 mg/kg, respectivamente; i.p.), e duas incisões foram feitas paralelas à coluna vertebral, imediatamente abaixo da última costela. As glândulas adrenais foram pinçadas pela gordura peri-renal e seccionadas completamente com o auxílio de uma pequena lâmina. O grupo controle (Sham) foi submetido ao mesmo procedimento, com exceção da remoção das glândulas adrenais. Após este procedimento, foi administrado diclofenaco na dose de 20 mg/kg (i.p.), em dose única.

3.2.2. Determinação da glicemia e dosagens séricas de insulina e ácidos graxos livres

A glicemia foi mensurada em uma pequena gota de sangue retirada da cauda dos animais, utilizando-se para isso fitas de dosagem e glicosímetro da Accu-Check Active. Para as dosagens séricas, o sangue dos animais foi coletado em eppendorfs heparinizados e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma. A concentração de insulina foi determinada por kit comercial Rat/Mouse Insulin ELISA Kit – Millipore®. A concentração de ácidos graxos livres foi determinada pelo kit comercial NEFA - RANDOX®.

3.2.3. Determinação de corticosterona plasmática

As concentrações plasmáticas de corticosterona foram determinadas por radioimunoensaio. A corticosterona foi extraída por homogeneização de 25 µl de plasma com 1 ml de álcool etílico absoluto, e posteriormente secas em SpeedVac (Savant SVC-100H). As amostras foram ressuspensas em 2,5 ml de tampão esteroide (fosfato dibásico 0,02 M em gelatina 0,1%) e homogeneizadas. Em um novo tubo com 500 µl de amostra, acrescentou 100 µl de tampão esteroide contendo corticosterona³H (PerkinElmer NET-182) e 100 µl de solução tampão contendo

anticorpo anti-corticosterona (Sigma Aldrich, C8784-100TST), e as amostras ficaram 15 h em geladeira. Acrescentou 200 µl de solução tampão esteroide contendo carvão ativado 1% e dextram 0,1%, previamente deixada em agitação por 2 h em banho de gelo. As amostras ficaram em repouso por 15 minutos em geladeira e depois foram centrifugadas (2500 rpm, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi invertido em tubos de cintilação, acrescentado líquido de cintilação, homogeneizado e posteriormente lido em contador beta (PerkinElmer). A concentração de corticosterona das amostras foi determinada por uma curva padrão deste hormônio (Sigma Aldrich; C-46148).

3.2.4. Avaliação da síntese total de proteínas em músculos isolados

Os músculos soleus e EDL foram incubados com seus tendões fixos a suportes apropriados para manutenção dos seus comprimentos de repouso, em tampão Krebs Ringer Bicarbonato, contendo glicose e todos os vinte aminoácidos, em concentrações semelhantes às encontradas no plasma de ratos. Para a avaliação da incorporação de aminoácidos marcados em proteínas musculares foi utilizado a [U-¹⁴C]-Tirosina (0,1 mM, 0,05 µCi/ml). Após o período de incubação, os músculos foram homogeneizados com ácido tricloroacético (TCA) 5%, centrifugados e o precipitado lavado 3 vezes com 1 ml de TCA 5%. A dissolução do precipitado final foi obtida pela adição de 1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% em banho maria a 40°C por 2 horas. A seguir, foram acrescentados 10 ml de coquetel de cintilação, contendo Tolueno:PPO:POPOP:Triton X- 100, para contagem radioativa em espectrômetro de cintilação líquida BECKMAN LS 6800. Os cálculos para a determinação da síntese de proteínas utilizaram a atividade específica intracelular de cada músculo.

3.2.5. Velocidade de síntese proteica *in vivo* pelo método SUnSet

Para avaliar a síntese proteica *in vivo* foi utilizado o método *SUnSet* ou *Surface Sensing of Translation* (GOODMAN; HORNBERGER, 2013). Essa técnica baseia-se na detecção de peptídeos marcados com a puromicina em tecidos de animais previamente tratados com esse antibiótico. A puromicina tem similaridade estrutural com a molécula de RNA-transportador ligada ao aminoácido e por isso, incorpora-se às cadeias polipeptídicas crescentes, o que resulta na terminação da elongação destas e consequente liberação do peptídeo ligado à puromicina do ribossomo. Para a aplicação deste método, animais em temperatura ambiente e expostos ao frio foram

tratados com puromicina (Santa Cruz Biotechnology), na dose de 0,04 $\mu\text{mol/g}$ (i.p.), 30 minutos antes da eutanásia. A detecção das proteínas recém-sintetizadas (que incorporaram a puromicina) no músculo foi feita por *western blotting* utilizando um anticorpo anti-puromicina.

3.2.6. Western blotting

Amostras dos músculos esqueléticos foram homogeneizadas (TissueLyzerII; 30Hz; 2 min) em 6 volumes de tampão TRIS-HCL (50mM; pH 7,4; 4°C) contendo 150 mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de deoxicolato de sódio, 1% de SDS, inibidores de proteases (1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina e 1 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina), inibidores de fosfatases (10 mM ortovanadato de sódio, 10 mM pirofosfato de sódio e 100 mM fluoreto de sódio) e inibidores de deacetilases (1mM nicotinamida e 400 nM tricostatina A). O homogenato foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer -80°C. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry (WALKER; WATERBORG; MATTHEWS, 2003). Alíquotas contendo 10-100 μg de proteína foram adicionadas tampão de Laemmli (SDS 4%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, azul de bromofenol 2%, pH 6,8), aquecidas a 70°C por 10 minutos sob agitação e então submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE em sistema de mini gel vertical (BioRad) com tampão contendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,4), glicina 115 mM e SDS 0,1%, sob 100 Volts por 2 horas. As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose pelo sistema TransBlot SD Cell (BioRad) com tampão contendo Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 10% e metanol 0,2 M, pH 7,4, sob 400 mA por 30 minutos. A membrana de nitrocelulose foi incubada em solução de TBS-T (Tris-HCL 0,02 M, NaCl 0,16 M, Tween 20 0,1%, pH 7,4) com leite desnatado 10% por 1 hora. Após o bloqueio a membrana foi incubada em solução TBS-T (acrescida de albumina sérica bovina 2,5% e NaN_3 0,01%) contendo anticorpos primários para as proteínas de interesse, overnight a 4°C. As membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas posteriormente em solução de TBS-T com anticorpo secundário com peroxidase por 1 hora na temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas em TBS-T e expostas ao sistema de detecção de imagem ChemiDoc XRS+ (BioRad) após a adição do reagente de quimioluminescência (Tris-HCl 1 M, pH 8,5, luminol 250 mM, ácido cumárico 90 mM e H_2O_2 0,01%). A análise das bandas (densitometria) foi realizada no software ImageJ. A β -actina foi utilizada como controle interno do

conteúdo de proteínas totais. As formas fosforiladas foram corrigidas pelas formas totais das proteínas ou pela β -actina. Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (100%).

Tabela 1- Relação dos anticorpos utilizados para Western blot e suas concentrações.

Anticorpo (Ac)	Código	Diluição
<i>B - actina</i>	#81178	1/1000
<i>p-S6 (Ser 235/236)</i>	#2211	1/1000
<i>S6 Total</i>	#2217	1/1000
<i>Redd1</i>	#10638	1/1000
<i>p-4EBP1 (37/46)</i>	#2855	1/1000
<i>4EBP1</i>	#9644	1/1000
<i>LC3 B</i>	2775S	1/1000
<i>Puromicina</i>	eq 0001	1/500
<i>Akt</i>	#9272	1/500
<i>pAkt^{ser473}</i>	#9271	1/1000
<i>pAkt^{thr308}</i>	#9275	1/500
<i>Foxo01</i>	sc-11350	1/1000
<i>Atrogin</i>	sc 166806	1/1000
<i>MurF1</i>	sc 32920	1/1000

3.2.7. Expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

O ácido ribonucleico (RNA) foi extraído do músculo de camundongos por Trizol (Invitrogen), purificado (RNeasy; QIAGEN) e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop One/OneC; Thermo Fisher). Alíquota contendo um 1 μ g de RNA foi tratada com DNase, acrescentado Oligo dT (20 pmols; Invitrogen) e dNTPmix (10 mM; Promega) em água DEPC (água milli-Q tratada com dietil-pirocarbonato 0,01%

autoclavada). Para geração dos DNA complementar (DNAc), as amostras foram aquecidas a 65°C por 5 minutos, resfriadas, seguida de adição da enzima transcriptase reversa (Super Script IV; Invitrogen) e submetidas a um ciclo de 23°C (10 minutos), 55°C (10 minutos), 80°C (10 minutos) e resfriadas (termociclador C1000 Touch, BioRad). Para avaliar a expressão gênica, as amostras de DNAc foram submetidas a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) utilizando SYBR Green (Invitrogen) com Carboxi rodamina (ROX) como controle interno, acrescido dos primers (IDT) para detecção dos genes de interesse (tabela 2). Os genes de interesse foram amplificados e adquiridos no sistema ABI Prism 7500 (Perkin-Elmer) seguindo os seguintes parâmetros: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos) e 40 ciclos de 95-60°C (15 segundos/1 minuto). Os dados gerados foram analisados no software ABI Prism/7500 system SDS. O gene de Rpl32 (proteína ribossomal 32) foi utilizado como controle interno da expressão do gene de interesse. Os resultados obtidos foram comparados com os respectivos grupos controles, os quais foram considerados como 1 (100%).

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

Gene	Sequência de Prime
<i>Redd1</i>	Forward: CCAGAGAAGAGGGCCTTGA
	Reverse: CCATCCAGGTATGAGGAGTCTT
<i>Ic3b</i>	Forward: CGTCCTGGACAAGACCAAGT
	Reverse: ATTGCTGTCCCGAATGTCTC

3.2.8. Tratamento in vivo com rapamicina

Para investigar a participação da mTOR, um grupo de animais expostos ao frio foi tratado com rapamicina, um inibidor específico desta proteína. A rapamicina (LC

Laboratories, Woburn, MA, EUA) foi inicialmente dissolvida em álcool absoluto e armazenada em -20°C na concentração de 20mg/mL (i.p.). Imediatamente antes do tratamento, a solução de uso foi diluída para a concentração de 1 mg/mL em veículo contendo 5% de Tween 80, 5% de PEG 400 e 4% de etanol (CHEN et al., 2012). Os grupos experimentais expostos ao frio por 3 h receberam uma dose única de rapamicina na dose de 3 mg/kg (MAMMUCARI et al., 2007), imediatamente antes da entrada na câmara fria. Os animais controles receberam injeção (i.p.) de igual volume contendo apenas o veículo sem a droga. Após a eutanásia, os músculos esqueléticos foram retirados para a avaliação da síntese proteica em músculos isolados.

3.2.9. Análise *in vivo* do fluxo autofágico

Para a análise *in vivo* do fluxo autofágico, os grupos experimentais expostos ao frio foram tratados com colchicina (Sigma-Aldrich), na dose de 0,4 mg/kg/dia, ou veículo. A colchicina é uma droga capaz de bloquear a maturação do autofagossomo e, conseqüentemente, aumenta o conteúdo proteico da LC3II (Ju et al., 2010). Inicialmente, a colchicina foi dissolvida em água e armazenada em -20°C na concentração de 4mg/mL. Imediatamente antes do tratamento (i.p.), a colchicina foi diluída em água para a concentração de 0,5mg/mL. Os animais receberam aplicação de três doses da droga: I) no dia anterior à entrada na câmara fria, II) 1 h antes da entrada na câmara fria e III) antes da eutanásia, respectivamente. Os animais controles receberam injeção (i.p.) de igual volume contendo água. Após a eutanásia, os músculos esqueléticos foram retirados e as proteínas totais extraídas para a quantificação da LC3 pela técnica de *Western Blotting*. O acúmulo da LC3II no tratamento com colchicina reflete o fluxo autofágico conforme determinado nas diretrizes para a investigação da autofagia (Klionsky et al., 2016). Desta forma, o fluxo autofágico foi determinado pela subtração dos valores densitométricos da LC3II entre animais tratados e não tratados com a colchicina.

3.3. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como Médias \pm EPM (Erro Padrão da Média). Para a análise estatística dos resultados entre os grupos controles e experimentais foi utilizado ANOVA *two-way* ($p < 0,05$) seguido pelo pós-teste de Tukey. Quando

necessário, o teste “t” de Student (pareado ou não pareado) foi utilizado para a comparação entre as médias.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros bioquímicos e hormonais em camundongos expostos ao frio

Inicialmente, procedeu-se a validação e caracterização metabólica do modelo de estresse térmico agudo e da adrenalectomia e verificou-se que a exposição ao frio (4°C), durante 3 h, aumentou a concentração plasmática de corticosterona, em aproximadamente 2 vezes, enquanto a adrenalectomia aboliu esse efeito (Figura 1A), validando assim o modelo experimental. A adrenalectomia em animais mantidos em temperatura ambiente não interferiu com a corticosterona plasmática.

Para investigar o efeito do estresse térmico no metabolismo lipídico foi realizada a dosagem das concentrações plasmáticas dos ácidos graxos livres (AGL) de animais Sham e ADX submetidos ao frio (figura 1B). Observou-se que a exposição ao frio aumentou (~50%) a concentração dos AGLs em ambos os grupos (Sham e ADX) de forma semelhante. A fim de verificar possíveis alterações do metabolismo de carboidratos, quantificou-se as concentrações plasmáticas da insulina e glicose. Tanto a insulinemia como a glicemia não foram alteradas pela exposição ao frio ou pela adrenalectomia (figura 1C e D).

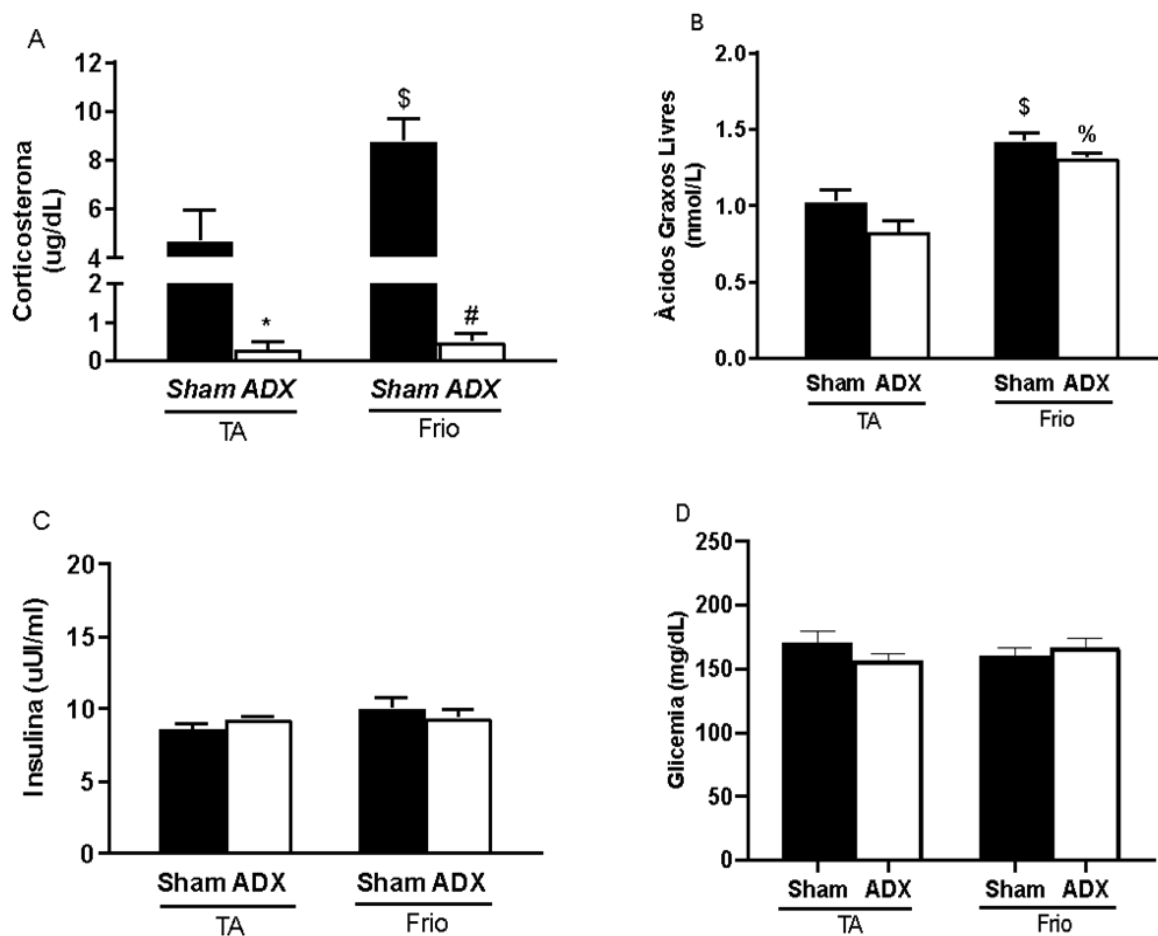


Figura 1- Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3h, na concentração plasmática de corticosterona (A); ácidos graxos livres (B) insulina (C) e glicose (D) em camundongos Sham ou adrenalectomizados (ADX). Os valores são expressos como Média \pm SEM (n=3-4). * vs TA Sham; \$ vs TA Sham; # vs Frio Sham; % vs TA ADX. TA: Temperatura Ambiente

4.2. Efeito do frio na síntese proteica em diferentes tipos de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio

Com o objetivo de investigar as diferenças de respostas dependentes do tipo de fibra muscular na síntese proteica de animais normais expostos ao frio, foram utilizados os músculos soleus e EDL, músculos ricos em fibras oxidativas e glicolíticas, respectivamente.

Para a avaliação da síntese de proteínas, foram utilizados dois métodos distintos: as técnicas de incorporação de [U-¹⁴C]-Tirosina marcada em proteínas totais de músculos isolados (*in vitro*) e a incorporação de puromicina em proteínas totais de músculos esqueléticos (*in vivo*).

Observou-se, por ambos os métodos, que a exposição ao frio, durante 3h, reduziu (~50%) a velocidade da síntese proteica em músculos EDL de camundongos quando comparados aos animais mantidos em temperatura ambiente. Por outro lado, a síntese de proteínas em músculos soleus não foi alterada pela exposição ao frio (figura 2A e B). Não foram encontradas diferenças da síntese de proteínas de músculos soleus e EDL de animais mantidos em temperatura ambiente.

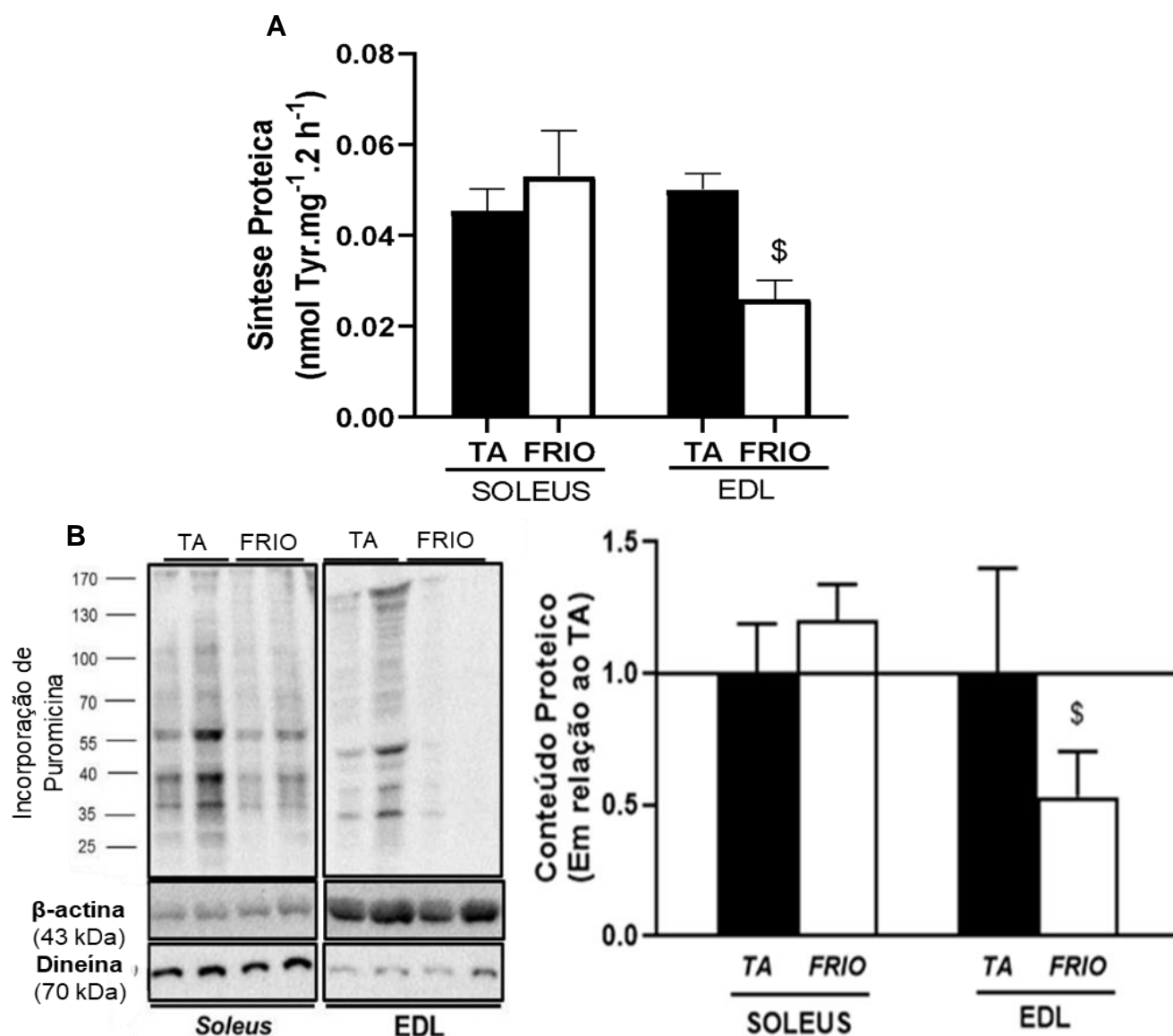


Figura 2- Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3h, na síntese proteica de músculos soleus e EDL de camundongos normais, estimada por meio da incorporação de ¹⁴C-Tirosina em proteínas totas de músculos isolados (A) e pela incorporação de puromicina em proteínas musculares *in vivo* (B). Os valores são expressos como média ± EPM de 3-5 animais por grupo. \$ p ≤ 0.05 vs TA. TA: Temperatura Ambiente.

4.3. Efeito do frio no conteúdo de Redd1 em diferentes tipos de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio

Para investigar o mecanismo molecular envolvido na inibição da síntese proteica induzida pelo frio e nas respostas diferenciais entre músculos glicolíticos e oxidativos, avaliou-se o conteúdo da proteína Redd1 em soleus e EDL de camundongos normais expostos à baixa temperatura.

Foi observado que músculos EDL de animais expostos ao frio apresentaram um expressivo aumento (~7x) no conteúdo proteico de Redd1 quando comparados aos músculos de animais mantidos em temperatura ambiente. Ao contrário do EDL, não se observou qualquer alteração do conteúdo desta proteína em músculos soleus de animais expostos ao frio. Não houve diferença no conteúdo de Redd1 entre soleus e EDL de animais mantidos em temperatura ambiente (figura 3).

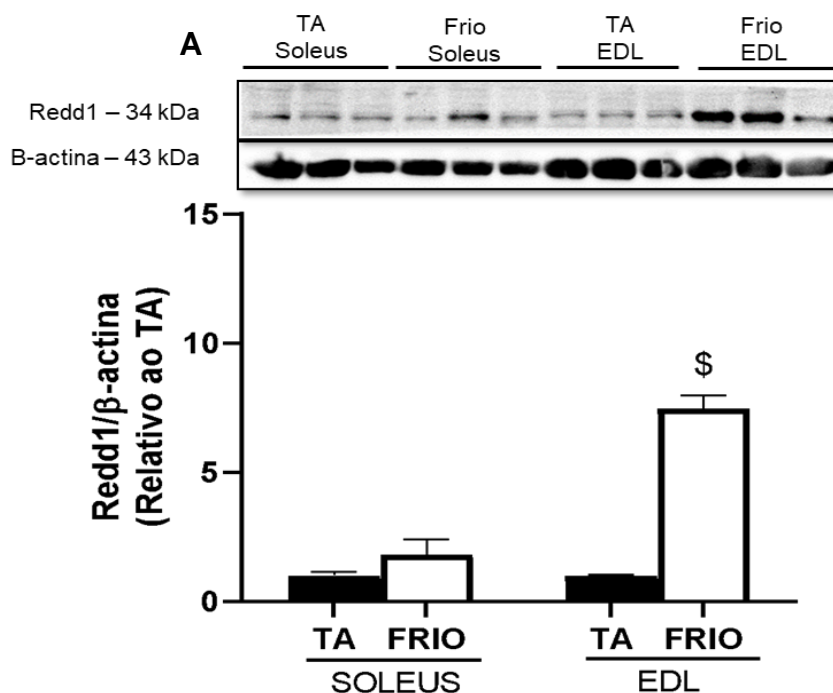


Figura 3- Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3h, no conteúdo proteico de Redd1 (A) normalizado pela β-actina em músculos soleus e EDL de camundongos normais. Os valores são expressos como médias ± EPM de 3-5 animais por grupo. \$ p ≤ 0.05 vs TA. TA: Temperatura Ambiente.

4.4. Efeito do frio na via da mTOR em diferentes tipos de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio

Considerando que Redd1 suprime a via da mTOR, o próximo objetivo foi investigar o efeito da exposição aguda ao frio em proteínas *downstream* do complexo alvo mecanicista da rapamicina 1 (mTORC1).

Inicialmente, foi mensurado o estado de fosforilação da S6 (Ser^{235/236}), uma proteína fosforilada (e ativada) diretamente pela p-70. Observou-se que a fosforilação da S6 foi reduzida (~75%), tanto em soleus como em EDL do grupo exposto ao frio quando comparado a seus respectivos controles na temperatura ambiente (figura 4).

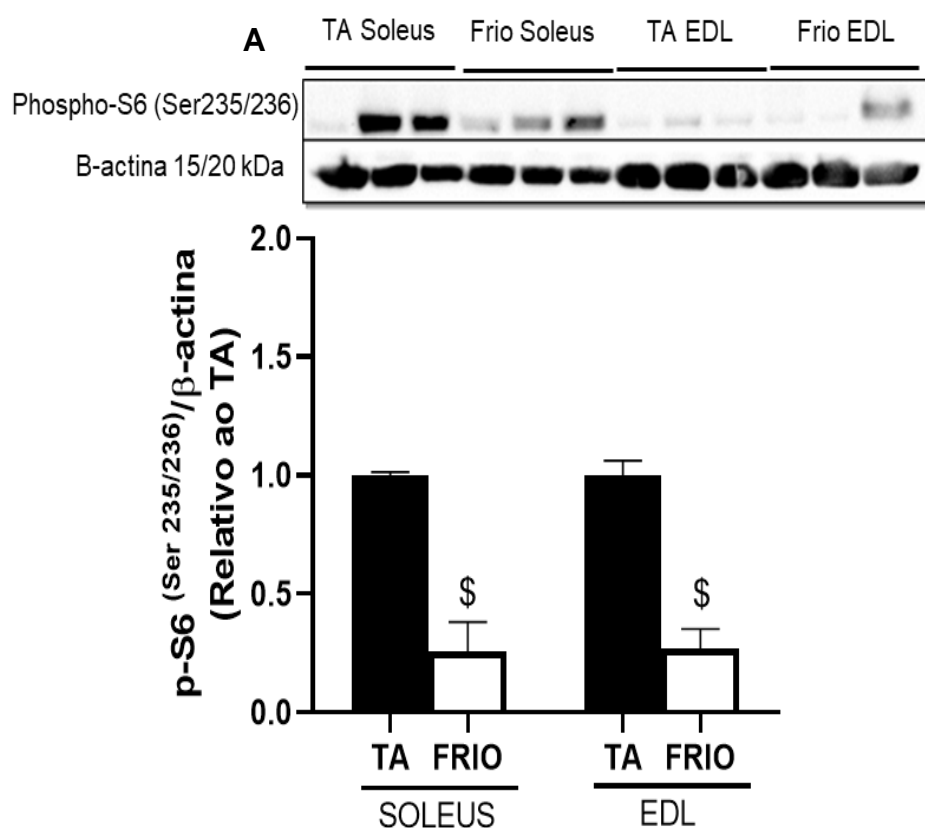


Figura 4 - Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3h, no estado de fosforilação de S6 normalizada pela β -actina em músculos soleus e EDL de camundongos normais. Os valores expressos como média \pm EPM de 3-5 animais por grupo. \$ $p \leq 0.05$ vs TA. TA: Temperatura Ambiente

Avaliou-se também o conteúdo proteico e o estado de fosforilação da proteína 4E-BP1 (Thr36/45). Os resultados mostram que a exposição aguda ao frio reduziu o estado de fosforilação da 4E-BP1 em músculos soleus, mas não houve diferença significativa em músculos EDL de animais expostos ao frio em relação aos controles (figura 5).

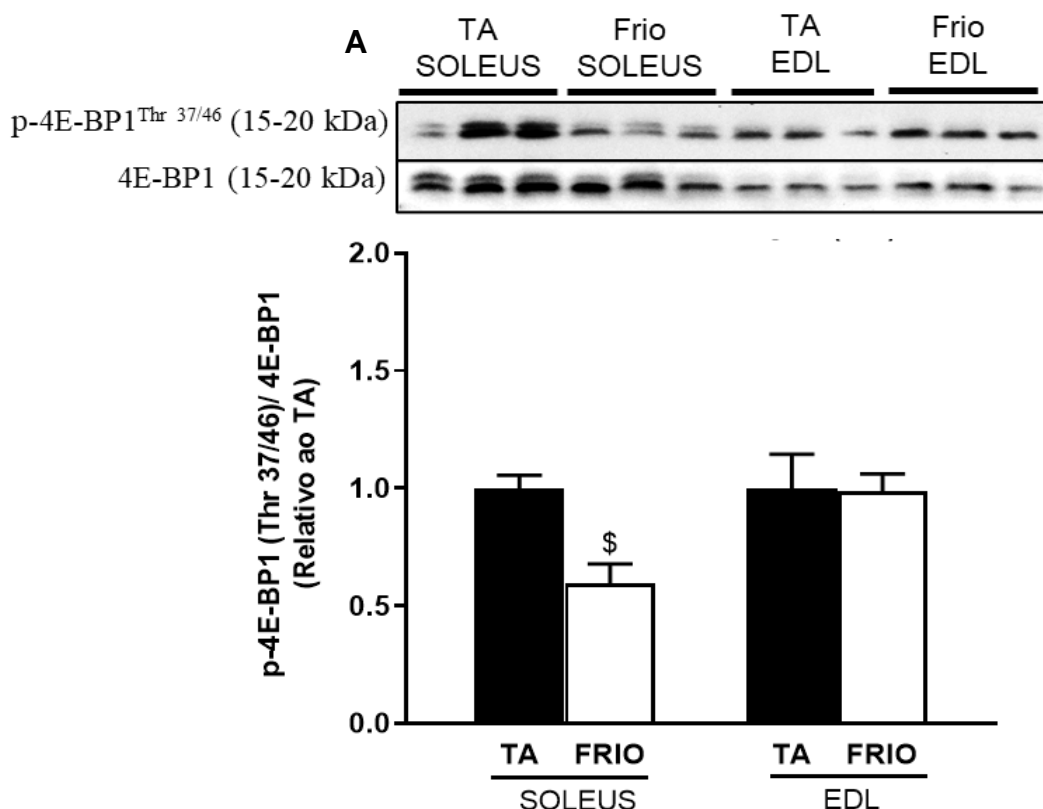


Figura 5 - Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3h, no estado de fosforilação de 4E-BP1 normalizada pelo conteúdo total da proteína em músculos soleus e EDL de camundongos normais. Os valores são expressos como médias \pm EPM de 3-5 animais por grupo. \$ $p \leq 0.05$ vs TA. TA: Temperatura Ambiente

4.5. Papel dos glicocorticoides na síntese de proteínas e na expressão de Redd1 em músculos glicolíticos e mistos de camundongos expostos ao frio.

Após verificar que os músculos glicolíticos (EDL) são mais responsivos às alterações induzidas pelo frio na síntese de proteínas e em proteínas regulatórias chaves desta via, investigou-se o efeito do estresse térmico na síntese proteica em músculos EDL e gastrocnêmico (misto) de animais sham e adrenalectomizados. Utilizando dois métodos de investigação distintos (incorporação de [U-14C]-Tirosina

marcada em proteínas totais de músculos isolados e o método *SunSet*), verificou-se que a adrenalectomia preveniu completamente a redução da síntese proteica em músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio, o que indica a participação dos GCs. (corticosterona) como mediadores dessa resposta metabólica (figura 6).

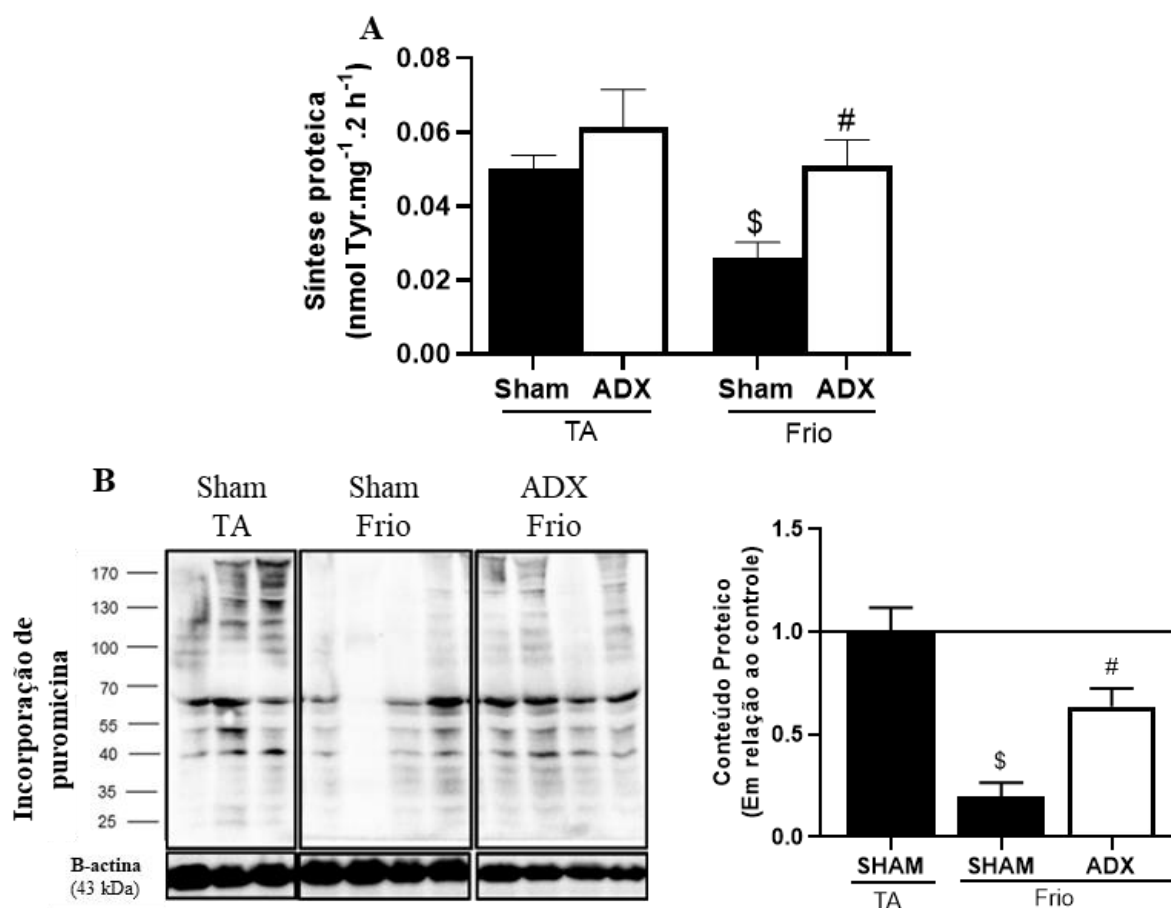


Figura 6- Efeito da adrenalectomia (ADX) na síntese proteica de músculos esqueléticos de camundongos expostos ao frio (4°C), durante 3h. A velocidade de síntese de proteínas foi estimada por meio da incorporação de ¹⁴C-Tirosina em proteínas totais de músculos EDL isolados (A) e pela incorporação de puromicina em músculos gastrocnêmio (B). Os valores são expressos como média ± EPM de 3-5 animais por grupo. \$ p ≤ 0.05 vs ta sham; # p ≤ 0.05 vs frio sham. Ta: temperatura ambiente

O próximo objetivo foi avaliar a expressão gênica e o conteúdo proteico de Redd1 em animais Sham e adrenalectomizados. Em total concordância com os resultados da síntese proteica, verificou-se que a adrenalectomia preveniu completamente o aumento da expressão gênica (~10x) e do conteúdo proteico de Redd1 (~7x) induzido pelo estresse térmico em músculos EDL de camundongos (figura 7A e B). A síntese basal de proteínas (figura 6A), assim como o conteúdo proteico (figura 7B) de Redd1 não foram afetados pela adrenalectomia em músculos de animais mantidos em temperatura ambiente.

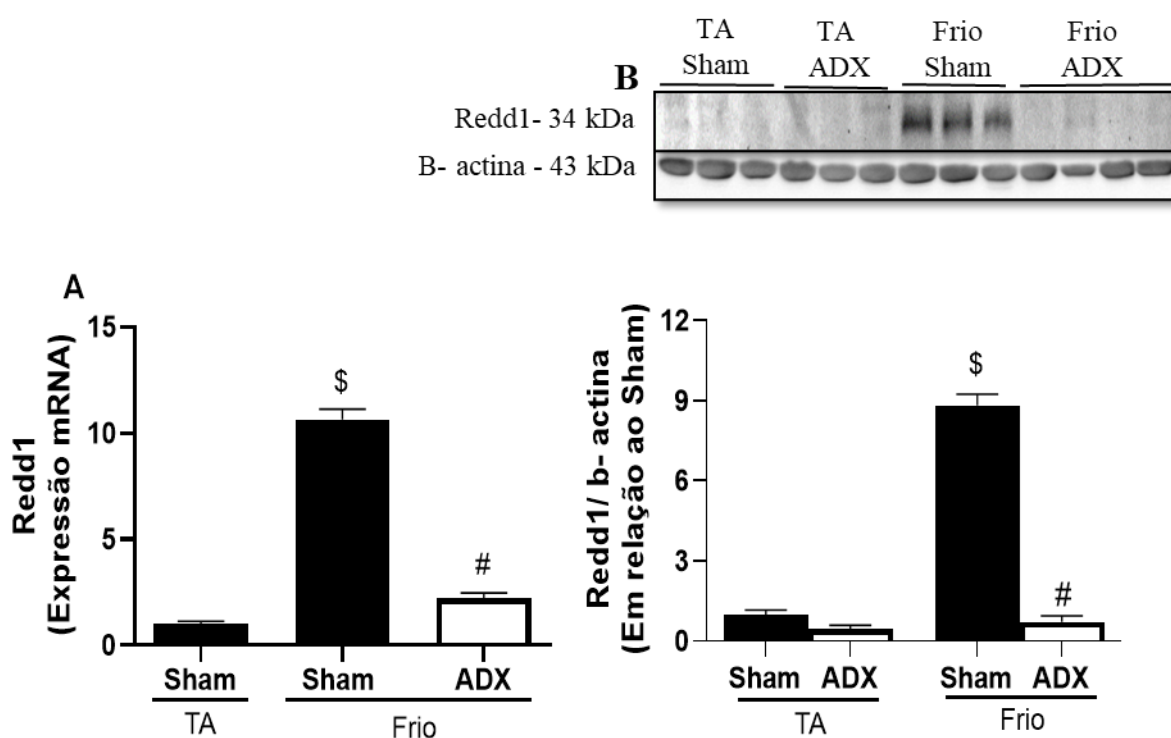


Figura 7- Efeito da adrenalectomia (ADX) na expressão gênica (A) e conteúdo proteico (B) de Redd1 normalizado pela b-actina em músculos EDL de camundongos expostos ao frio (4°C), durante 3 h. Os valores são expressos como Média \pm SEM (n=3-4). \$ vs TA Sham; # vs Frio Sham. TA: Temperatura Ambiente

4.6. Participação da via mTORC1 na redução da síntese de proteínas induzida pelo frio

Para avaliar a participação da via mTORC1 na redução da síntese de proteínas induzida pelo frio, os animais sham e adrenalectomizados foram previamente tratados com rapamicina, um inibidor seletivo de mTORC1. Após 3 h de exposição ao frio, os animais foram sacrificados e os músculos EDL foram incubados *in vitro* para a

avaliação da velocidade de síntese de proteínas pela incorporação de C^{14} -Tirosina. A Figura 8 mostra que o padrão de resposta dos grupos não tratados com rapamicina foi semelhante ao descrito anteriormente (figura 6), ou seja, animais expostos ao frio apresentam uma redução de ~40-50% da síntese de proteínas, sendo esse efeito abolido em músculos de animais adrenalectomizados. Interessante observar que este efeito da adrenalectomia foi completamente prevenido nos músculos de animais previamente tratados com rapamicina e expostos ao frio (figura 8) indicando que a hipersecreção de corticosterona induzida pelo estresse térmico leva à redução da síntese proteica muscular por meio da inibição da via de sinalização de mTORC1.

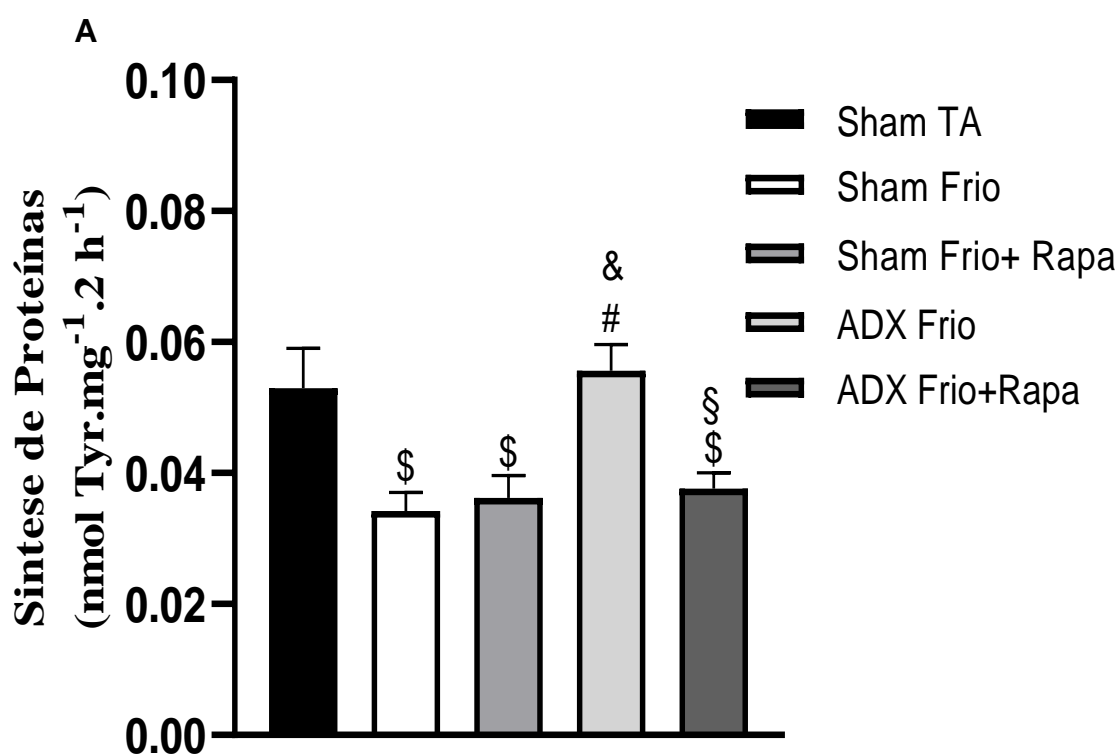


Figura 8- Efeito do tratamento com rapamicina na síntese proteica de músculos EDL de camundongos sham e adrenalectomizados (ADX) expostos ao frio (4°C), durante 3h. A velocidade de síntese de proteínas foi estimada por meio da incorporação de ^{14}C -Tirosina em proteínas totais de músculos isolados. Os animais receberam 1 única injeção de rapamicina (1,5 mg/Kg, i.p.), 30 minutos antes da exposição ao frio. Os valores são expressos como média \pm EPM de 5 animais por grupo. \$ $p \leq 0.05$ vs controle; # $p \leq 0.05$ vs frio, & $p \leq 0.05$ vs frio + rapa, § $p \leq 0.05$ vs frio adx + rapa. Rapa: Rapamicina, TA: Temperatura Ambiente.

4.7. Regulação do fluxo autofágico em músculos de camundongos expostos agudamente ao frio

Sabendo-se que a via de sinalização de mTORC1 inibe a autofagia, o próximo objetivo foi avaliar o processo autofágico em músculos *gastrocnêmio* de camundongos sham e adrenalectomizados expostos ao frio, durante 3 h. Para isso, avaliou-se a expressão gênica da *lc3b*, um marcador autofágico responsável pelo alongamento do autofagossomo. O *RNAm* de *lc3b* foi aumentado (~3x) nos músculos dos animais do grupo sham expostos ao frio, mas este efeito não foi observado no grupo submetido previamente à remoção cirúrgica das adrenais (figura 9).

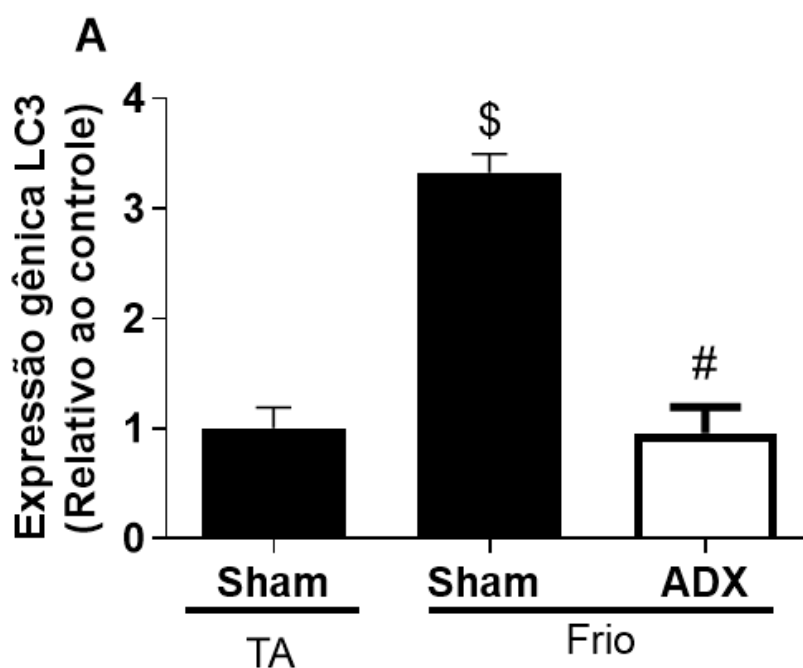


Figura 9- Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3 h, na expressão gênica de *lc3b* em músculos gastrocnêmio de camundongos sham e adrenalectomizados (ADX). Os valores são expressos como média ± EPM de 3-5 animais por grupo. \$ p ≤ 0.05 vs Sham; # p ≤ 0.05 vs frio Sham. TA: Temperatura Ambiente.

Para confirmar que a autofagia realmente estava alterada em nosso modelo experimental, foi necessário realizar a determinação do fluxo autofágico. Sendo assim, animais sham e adrenalectomizados expostos ao frio foram previamente tratados com colchicina, uma droga capaz de bloquear a maturação do autofagossomo e, conseqüentemente, aumentar o conteúdo proteico da LC3II (JU et al., 2010). Este

aumento reflete o fluxo autofágico conforme determinado nas diretrizes para investigação da autofagia (KLIONSKY et al., 2016).

Verificou-se que a exposição ao frio de animais tratados com colchicina, em relação aos animais tratados com veículo, levou ao maior acúmulo muscular de LC3II (Figura 10) e que este efeito foi completamente abolido pela adrenalectomia, indicando que os glicocorticoides participam da ativação do fluxo autofágico muscular de camundongos expostos agudamente a baixas temperaturas.

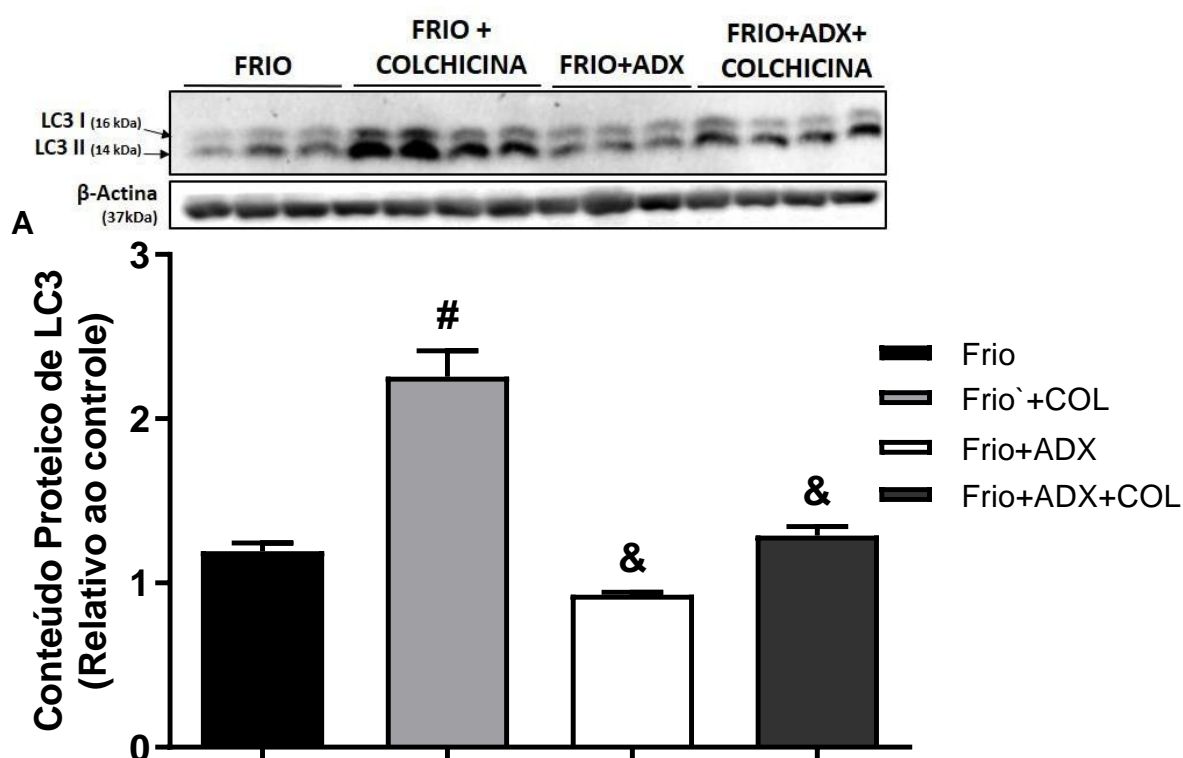


Figura 10- Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3h, no fluxo autofágico em músculos gastrocnêmico de camundongos sham e adrenalectomizados (ADX). Os animais foram tratados com colchicina (COL), na dose de 0,4 mg/kg/dia. Os valores são expressos como média \pm EPM de 3-5 animais por grupo. # $p \leq 0.05$ vs frio; & $p \leq 0.05$ vs frio colchicina.

4.8. Regulação da via Akt/FOXO em camundongos expostos ao frio agudo

Tendo em vista que a corticosterona plasmática está maior nos animais expostos ao frio e sabendo-se que os glicocorticoides, além de promover defosforilação da Akt, também inibem a fosforilação de FOXO e com isso promovem a ativação deste fator transcricional e a consequente transcrição de diferentes genes relacionados à atrofia, o próximo objetivo foi avaliar o estado de fosforilação de proteínas envolvidas na via Akt/FOXO e o conteúdo das Ub-ligases em músculos EDL de animais sham e adrenalectomizados (ADX) expostos ao frio. Observou-se uma redução do estado de fosforilação da Akt^{Ser473} e Akt^{Thr308} em músculos EDL de camundongos sham expostos ao frio, sendo apenas a redução da p-Akt^{Thr308} prevenida pela adrenalectomia no grupo exposto ao frio. O estado de fosforilação de FOXO, bem como o conteúdo proteico de Atrogin e Murf1 não foram alterados pelo estresse térmico e nem pela adrenalectomia.

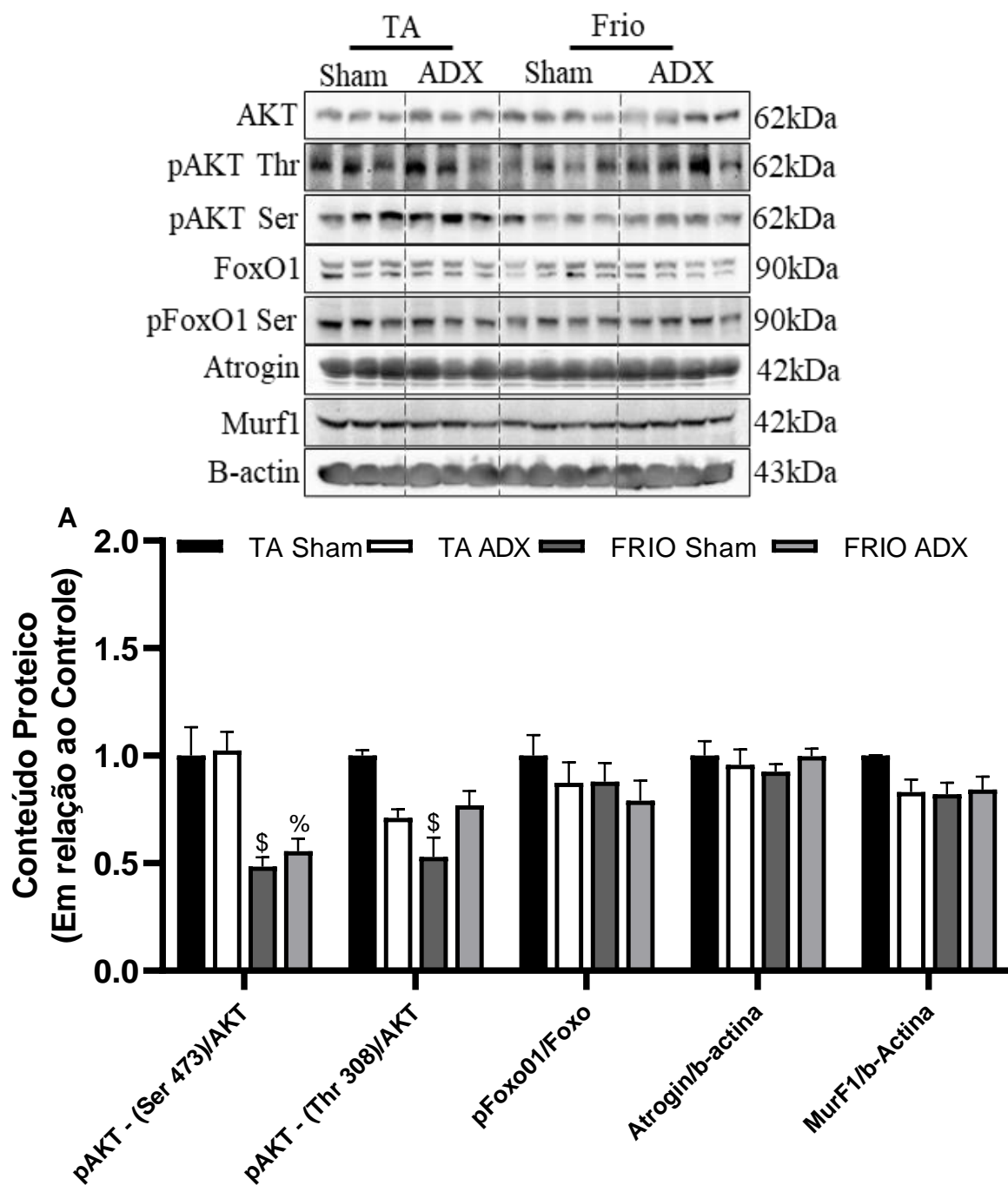


Figura 11- Efeito da exposição ao frio (4°C), durante 3h, no estado de fosforilação e/ou conteúdo de diferentes proteínas da via Akt/FOXO e Ub-ligases em músculos EDL de camundongos sham e adrenalectomizados (ADX). Os valores são expressos como média \pm EPM de 3-5 animais por grupo. \$ vs TA Sham; % vs TA ADX. TA: Temperatura Ambiente.

Em conjunto, esses dados mostram que a corticosterona secretada, durante as três primeiras horas de exposição ao frio, inibe a síntese proteica e aumenta o fluxo autofágico, principalmente, em músculos glicolíticos de camundongos, sendo estes efeitos provavelmente mediados pela indução de Redd1 e supressão da via Akt/mTOR.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel fisiológico dos glicocorticoides na regulação da síntese proteica e autofagia em músculos esqueléticos de camundongos expostos agudamente ao frio. Para isso, camundongos foram adrenalectomizados e expostos em um ambiente com baixa temperatura por um período de 3h.

Inicialmente, foi avaliado o perfil hormonal e metabólico de animais normais submetidos ao estresse térmico agudo. Os resultados demonstraram que a exposição ao frio foi suficiente para provocar um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de corticosterona, um efeito que foi completamente abolido pela remoção cirúrgica das adrenais. Esse achado mostra que as primeiras horas de exposição ao frio ativam o eixo HPA em camundongos e está em conformidade com a literatura. Resultados similares foram relatados em ratos por Manfredi et al. (2013) e em estudos realizados em camundongos, como descrito por Morgan (2022) e Delfino (2018), que identificaram um aumento semelhante na corticosterona plasmática, após 3 h de exposição ao frio. Os GCs são hormônios do estresse que desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase da glicose em mamíferos e, provavelmente, foram mais secretados pela adrenal em resposta ao frio para atuar de forma integrada com os hormônios tireoidianos e o sistema nervoso simpático no sentido de aumentar a disponibilidade de glicose por meio da ativação da glicogenólise e gliconeogênese hepática, duas vias metabólicas que estão ativadas pelo estresse térmico, como já demonstrado em estudos anteriores de nosso laboratório (DELFINO., 2018; MORGAN., 2022). Esses efeitos são críticos para a adaptação metabólica durante a exposição a baixas temperaturas, uma situação crítica na qual a glicose plasmática precisa ser mantida, uma vez que constitui o principal substrato energético para o SNC (KUO et al., 2015) e para tecidos produtores de calor como o músculo esquelético e o tecido adiposo marrom. Há inúmeras evidências da literatura que mostram que a captação de glicose muscular é extremamente aumentada pelo frio (HAMAN, 2006; VALLERAND; JACOBS, 1992; VALLERAND; PÉRUSSE; BUKOWIECKI, 1987). Portanto, o aumento da produção e utilização desse carboidrato poderia explicar porque não se observou alteração da glicemia em nosso estudo. O aumento dos AGLs plasmáticos verificado em nosso modelo experimental não foi acompanhado por alterações da insulinemia, o que também foi relatado por Gross & Migliorini (1977) em

ratos expostos ao frio por 2 h e, provavelmente, resultou da ativação da lipólise pelo sistema nervoso simpático. É bem estabelecido que, durante a exposição ao frio, os animais endotérmicos utilizam os AGLs provenientes da hidrólise de triglicerídeos do tecido adiposo como um dos principais substratos energéticos para a produção de calor (KETTELHUT; NAVEGANTES, In: Aires 2018).

Uma vez conhecido alguns parâmetros hormonais e metabólicos em camundongos normais expostos ao frio, tornou-se interessante investigar qual seria o efeito deste estresse na velocidade da síntese proteica em diferentes tipos de músculos esqueléticos. Utilizando duas diferentes metodologias, demonstrou-se que a exposição a baixas temperaturas reduziu rapidamente a síntese de proteínas musculares e que os músculos EDL são muito mais responsivos a esse efeito catabólico quando comparados ao soleus. Esta resposta diferencial na síntese proteica pode ser atribuída às diferenças anatômicas, bioquímicas e fisiológicas entre os dois tipos de músculos, uma vez que são constituídos por diferentes tipos de fibra. O EDL contém basicamente fibras do tipo IIb (glicolíticas ou brancas) e grandes quantidades de fosfocreatina e de enzimas que participam da glicólise e da glicogenólise (KROOK; WALLBERG-HENRIKSSON; ZIERATH, 2004). Por outro lado, o soleus apresenta maior percentagem de fibras do tipo I (oxidativas ou vermelhas), maior número de mitocôndrias, irrigação sanguínea mais densa e maior conteúdo de mioglobina. Além disso, as fibras glicolíticas, mais presentes em músculos que executam movimentos de força como o EDL, apresentam contrações até 5 vezes mais vigorosas quando comparadas às oxidativas, mais frequentes em músculos posturais como o soleus. Ao contrário do EDL, verificou-se no presente trabalho que a síntese proteica em músculos soleus não foi inibida pelo frio. Embora se saiba muito pouco sobre a regulação diferencial da síntese proteica em diferentes tipos de músculos de animais submetidos ao estresse, é bem conhecido que a magnitude de resposta à ação estimulatória dos GCs na atividade do sistema proteolítico Ub-proteassoma, em roedores (BODINE et al., 2001) e humanos (LANGEN et al., 2013), é muito maior em músculos glicolíticos do que em músculos oxidativos. Além disso, o tratamento com GCs sintéticos aumenta, principalmente, em músculos glicolíticos a expressão transcricional de um conjunto de genes relacionados à atrofia, como a atrogin-1, MuRF1 e miostatina (SCHAKMAN; GILSON; THISSEN, 2008). Uma possível explicação para este fato é que haja uma expressão diferencial do receptor de GCs entre os variados tipos de fibras. De forma consistente com esta

hipótese, há evidências de que os músculos ricos em fibras do tipo II (glicolíticas) expressam GR em maior quantidade quando comparados a músculos ricos em fibras do tipo I (oxidativas) (SANDRI et al., 2006; SHIMIZU et al., 2011).

Os resultados mostram que a adrenalectomia preveniu completamente a redução da síntese proteica induzida pelo estresse térmico, o que demonstra claramente que os hormônios secretados pela adrenal e, mais provavelmente, a corticosterona, sejam os mediadores principais deste efeito anti-anabólico. Embora a técnica da adrenalectomia também remova a porção medular da glândula responsável pela secreção das catecolaminas, experimentos anteriores de nosso laboratório mostram que a remoção cirúrgica exclusiva desta estrutura pela técnica da demedulação não abole o efeito inibitório causado pelo frio na síntese proteica muscular (MANFREDI et al., 2017). Nesses experimentos, observou-se que este efeito inibitório do frio na síntese é até mesmo exacerbado pela demedulação, o que sugere que a adrenalina, ao contrário, da corticosterona, exerça um efeito anabólico na síntese proteica muscular, como já demonstrado em estudos anteriores da literatura (GONÇALVES et al., 2019; NAVEGANTES et al., 2004).

O efeito inibitório dos GCs na síntese proteica decorre de diferentes mecanismos. É bem estabelecido que estes hormônios inibem o transporte de aminoácidos para o interior das células musculares (KOSTYO; REDMOND, 1966), o que pode inibir a síntese proteica. Além disso, há evidências experimentais de que a corticosterona, em roedores, tem a capacidade de modular, de maneira direta ou indireta, diversos fatores de transcrição e proteínas de sinalização, dentre as quais se destaca a Redd1 (GORDON et al., 2016). Estudos demonstram que Redd1 é ativada em diversas situações de estresse com a função principal de suprimir a via biossintética das proteínas que sabidamente requer um grande gasto energético (FAVIER et al., 2010; SOFER et al., 2005). Neste trabalho, constatou-se, pela primeira vez na literatura, que a exposição aguda ao frio leva ao aumento da expressão gênica e do conteúdo proteico de Redd1 exclusivamente em músculos glicolíticos de camundongos. Verificou-se que essa ativação está diretamente relacionada às concentrações de corticosterona, visto que a mesma foi praticamente abolida em músculos EDL de animais submetidos à adrenalectomia. Efeitos semelhantes foram observados por outros autores que utilizaram GCs sintéticos. Wang et al. (2006) demonstraram que o conteúdo de Redd1 aumenta (70x) em músculos de ratos, após 4h da administração sistêmica de dexametasona. Britto et al. (2014) descreveram que

o tratamento com dexametasona por 7 dias reduziu (12%) a massa do músculo glicolítico tibialis anterior, um efeito que foi abolido em camundongos Redd1-KO. Em nosso modelo experimental, não houve alteração da massa muscular devido provavelmente ao curto período de estresse. Entretanto, o tempo de 3 h de exposição ao frio já foi suficiente para aumentar de forma bastante expressiva tanto o gene como o conteúdo de Redd1 e inibir a síntese proteica muscular. Portanto, estes eventos parecem preceder a perda de massa muscular já bastante demonstrada em animais (MCALLISTER; THOMPSON; SAMUELS, 2000; SAMUELS; THOMPSON; CHRISTOPHERSON, 1996) e humanos (CASTELLANI; YOUNG, 2016) expostos, por longos períodos, a baixas temperaturas. Manfredi. et al. (2017) investigaram os mecanismos intracelulares envolvidos nesta atrofia e demonstraram que, além da redução do anabolismo proteico, ocorre expressão dos atrogenes e ativação dos sistemas proteolíticos Ub-proteassoma e dependente de Cálcio em diferentes músculos esqueléticos de ratos, após 24h de exposição ao frio (MANFREDI et al., 2017). Nosso trabalho avança na descrição desses mecanismos e sugere que a redução da síntese proteica é uma alteração metabólica que precede não apenas a perda de massa mas também a ativação da proteólise, uma vez que o conteúdo das Ub-ligases não foi alterado nas primeiras 3 h de exposição ao frio em camundongos.

Considerando que os GCs modulam Redd1 em músculos glicolíticos de animais expostos ao frio e que essa proteína atua como um potente supressor da síntese proteica por meio da estabilização do complexo TSC1-TSC2 com subsequente inibição da sinalização do complexo mTORC1, tornou-se interessante investigar a via da mTOR. Os alvos mTORC1 mais bem conhecidos e estudados são a p70S6K1 e 4EBP1, ambas as proteínas envolvidas no processo de iniciação da tradução (FINGAR; BLENIS, 2004). Verificou-se que o estado de fosforilação de S6 (Ser^{235/236}), um alvo *downstream* da p70S6K1, estava menos ativa em EDL de animais expostos ao frio, enquanto que p-4EBP1 (Thr^{36/45}) não foi alterada. A inativação desta via de sinalização foi provavelmente resultante do aumento expressivo do conteúdo de Redd1 e da inibição da Akt nesses músculos, cujo estado de fosforilação dos resíduos de Ser⁴⁸⁶ e Thr³⁰⁸ foram reduzidos, durante a exposição ao frio. Uma vez que a insulina é um hormônio chave na fosforilação de ambos os resíduos da Akt, mas que sua concentração plasmática não foi aparentemente alterada pelo frio, pode-se especular que a defosforilação da Akt fo decorrente de um estado de resistência muscular à insulina induzida pelo estresse térmico. Embora a velocidade da síntese

proteica não tenha sido alterada pelo estresse térmico em soleus, verificou-se uma redução do estado de fosforilação tanto de p-S6 como de p-4EBP1. Considerando que Redd1 também não foi modulada neste músculo é possível sugerir que esta proteína seja absolutamente necessária para mediar o efeito inibitório da corticosterona na síntese proteica de músculos esqueléticos de camundongos expostos agudamente ao frio. A importância da via mTORC1 neste efeito anti-anabólico dos GCs foi comprovada no presente trabalho por meio do tratamento *in vivo* dos animais com rapamicina, um inibidor clássico de mTORC1. Nestes experimentos, foi possível constatar que a rapamicina impediu que a adrenalectomia revertesse a inibição da síntese proteica induzida pelo frio, sugerindo que a corticosterona secretada em resposta ao estresse térmico agudo inibe a síntese proteica em músculos EDL por meio da inativação da via da mTORC1. Outros tipos de estresse também podem inibir a síntese proteica muscular. O jejum, por exemplo, é uma situação já muito bem caracterizada por mudanças profundas no metabolismo energético, incluindo perda progressiva de proteínas corporais devido à inibição da síntese e da via mTOR. Vendelbo et al. (2014), evidenciaram, em humanos, que o jejum de 72 h reduziu a fosforilação da mTOR em aproximadamente 50%, juntamente com a redução da fosforilação de S6 e 4EBP1.

Além de estimular a síntese proteica, a via mTOR também exerce um papel essencial na regulação inibitória da autofagia, que se dá por meio da redução da atividade da proteína p-ULK1 (Ser⁷⁵⁷), uma proteína essencial para a formação do autofagossomo. Tendo em vista que a via mTOR estava inibida em músculos EDL de camundongos expostos ao frio, aventou-se a possibilidade de que o sistema autofágico/lisossomal estivesse mais ativo nesta situação catabólica. Para testar essa hipótese, analisou-se a expressão gênica da *lc3b*, um gene que codifica a proteína LC3 que sabidamente está envolvida na formação do autofagossomo e é um marcador indireto de autofagia. Nossos dados mostram que o estresse térmico aumentou (3x) o RNAm de *lc3b* em músculos gastrocnêmio de camundongos e este efeito foi abolido pela adrenalectomia. Em seguida, para confirmar que o fluxo autofágico estava realmente aumentado, os animais foram tratados com colchicina, uma droga que impede a polimerização dos microtúbulos e, portanto, impede que os autofagossomos se fundam ao lisossoma sendo assim degradados. Verificou-se que o fluxo autofágico, indicado pelo acúmulo de LC3, foi bastante aumentado em músculos de animais expostos ao frio, sendo este efeito atenuado em animais

submetidos previamente à adrenalectomia. Portanto, o conjunto desses resultados indica que a corticosterona e, provavelmente, outros fatores hormonais, participam da ativação da autofagia muscular em uma situação de exposição aguda ao frio. Além dos GCs, sabe-se que os hormônios tireoidianos são secretados em resposta ao frio e exercem grande relevância fisiológica nos ajustes necessários para a manutenção da temperatura como, por exemplo, o aumento do consumo de oxigênio e da produção de calor pelo músculo e pelo tecido adiposo marrom. Além disso, são hormônios que estimulam a autofagia muscular. Lesmana et al. (2016) investigaram o fluxo autofágico em camundongos tratados com T_3 por 10 dias e observaram um aumento tempo-dependente da proteína LC3B-II em diferentes tipos de músculos esqueléticos. Embora nosso estudo não permita concluir que a redução da atividade da mTOR seja a responsável pela ativação autofágica nos músculos expostos ao frio, uma possibilidade alternativa é que este processo catabólico tenha sido ativado diretamente por Redd1 independentemente da inibição do complexo mTORC1. Foi descrito que Redd1 liga-se à proteína de interação da tioredoxina (*TXNIP*) e com isso inibe as tioredoxinas TRX1/2, proteína que sabidamente agem como supressoras das espécies reativas de oxigênio (*ROS*). Portanto, quando as proteínas TRX1/2 são inibidas por Redd1, os níveis celulares de ROS aumentam levando à ativação do fluxo autofágico (QIAO et al., 2015).

Conclusões e perspectivas

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em conclusão, o presente trabalho sugere que a corticosterona secretada pelas glândulas adrenais, em condições de exposição aguda (3 h) a baixas temperaturas, ativa Redd1 e leva à inibição da via mTORC1 com conseqüente redução da síntese proteica, principalmente em músculos glicolíticos (EDL) de camundongos. Em paralelo, ocorre aumento da autofagia muscular, um processo catabólico que disponibiliza substratos energéticos para este tecido, em situações de grande demanda energética.

Futuros estudos deverão esclarecer o significado funcional desses efeitos metabólicos dos glicocorticoides, em resposta ao frio. É possível que, além de contribuir para a perda de massa muscular, em longo prazo, a combinação desses efeitos na musculatura esquelética seja de grande importância para a produção de calor pelo músculo (termogênese do tremor), uma vez que redireciona a energia química, que seria utilizada em processos biossintéticos, para a realização de trabalho. Além disso, a menor velocidade da síntese proteica pode contribuir para o maior fluxo de aminoácidos do músculo para o fígado, o que favorece a produção de glicose “de novo” pelo tecido hepático. Estudos em andamento, no nosso laboratório, mostram que a ativação da gliconeogênese hepática, em ambientes frios, é essencial para a manutenção da temperatura e para a sobrevivência do indivíduo, uma vez que garante a oferta de glicose como substrato energético para diferentes tecidos periféricos.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 1994.

ANDREWS, R. C.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science**, v. 96, n. 5, p. 513–523, 1 maio 1999.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704–1708, 23 nov. 2001.

BODINE, S. C.; FURLOW, J. D. Glucocorticoids and Skeletal Muscle. Em: WANG, J.-C.; HARRIS, C. (Eds.). **Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 145–176.

BONALDO, P.; SANDRI, M. **Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy**. **DMM Disease Models and Mechanisms**The Company of Biologists Ltd, , 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://dmm.biologists.org/content/6/1/25>>.

BRAUN, T. P.; MARKS, D. L. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. FEB, 3 fev. 2015.

BRITTO, F. A. et al. REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 11, p. E983–E993, 2014.

CASTELLANI, J. W.; YOUNG, A. J. Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 196, p. 63–74, 1 abr. 2016.

CHEN, L. et al. Rapamycin has paradoxical effects on S6 phosphorylation in rats with and without seizures. **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 2026–33, 2012.

CLARKE, B. A. et al. The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 376–385, 7 nov. 2007.

DELFINO, H. B. P. **Regulação simpática de genes e enzimas chaves da neoglicogênese em fígado de roedores expostos ao frio**. Ribeirão Preto; 2018.

DEYOUNG, M. P. et al. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. **Genes & Development**, v. 22, n. 2, p. 239, 1 jan. 2008.

FAVIER, F. B. et al. Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 6, p. 1659–1666, 2010.

FINGAR, D. C.; BLENIS, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. **Oncogene 2004 23:18**, v. 23, n. 18, p. 3151–3171, 19 abr. 2004.

FUKUHARA, K. et al. Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 7, p. 533–541, 1 jul. 1996.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 2, p. 373–428, 2002.

GOLDBERG, A. L. Protein Turnover in Skeletal Muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 12, p. 3223–3229, 25 jun. 1969.

GOLDBERG, A. L.; GOODMAN, H. M. Relationship between cortisone and muscle work in determining muscle size. **The Journal of physiology**, v. 200, n. 3, p. 667–75, fev. 1969.

GONÇALVES, D. A. et al. Insulin/IGF1 signalling mediates the effects of β 2-adrenergic agonist on muscle proteostasis and growth. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 2, p. 455–475, 1 abr. 2019.

GORDON, B. S. et al. Emerging role for regulated in development and DNA damage 1 (REDD1) in the regulation of skeletal muscle metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 311, n. 1, p. E157, 7 jul. 2016.

GROSS, J. L.; MIGLIORINI, R. H. Further evidence for a central regulation of free fatty acid mobilization in the rat. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 232, n. 2, p. E165, 1 fev. 1977.

HAMAN, F. Shivering in the cold: from mechanisms of fuel selection to survival. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 5, p. 1702–1708, maio 2006.

HAN, Z. et al. Role of SIRT2 in regulating the dexamethasone-activated autophagy pathway in skeletal muscle atrophy. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 99, n. 5, p. 562–569, 2021.

HARA, K. et al. Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 42, p. 26457–26463, 17 out. 1997.

HU, Z. et al. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. v. 119, n. 10, p. 3059–3069, 2009.

JU, J.-S. et al. Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 929–35, 2010.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 9, p. 518–530, 2013.

KETTELHUT, I.C; NAVEGANTES, L.C.C. Controle Hormonal e Neural do Metabolismo Energético. In: **Fisiologia**, Margarida de Mello Aires, 5ª edição, 2018, Guanabara Koogan-RJ

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1, 21 jan. 2016.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5497, p. 1717, 12 dez. 2000.

KOSTYO, J. L.; REDMOND, A. F. Role of Protein Synthesis in the Inhibitory Action of Adrenal Steroid Hormones on Amino Acid Transport by Muscle. **Endocrinology**, v. 79, n. 3, p. 531–540, 1 set. 1966.

KROOK, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ZIERATH, J. R. **Sending the signal: Molecular mechanisms regulating glucose uptake**. Medicine and Science in Sports and Exercise. **Anais...** jul. 2004.

KUO, T. et al. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. Em: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l: s.n.]. v. 872p. 99–126.

LANGEN, R. C. J. et al. Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 10, p. 2245–2256, 1 out. 2013.

LESMANA, R. et al. Thyroid Hormone Stimulation of Autophagy Is Essential for Mitochondrial Biogenesis and Activity in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v. 157, n. 1, p. 23–38, 1 jan. 2016.

MAMMUCARI, C. et al. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 458–471, 5 dez. 2007.

MANFREDI, L. H. et al. Effect of short-term cold exposure on skeletal muscle protein breakdown in rats. **J Appl Physiol**, v. 115, p. 1496–1505, 2013.

MANFREDI, L. H. et al. Adrenodemedullation activates the Ca²⁺-dependent proteolysis in soleus muscles from rats exposed to cold. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 2, p. 317–326, 1 fev. 2017.

MASLOV, L. N.; VYCHUZHANOVA, E. A. The Role of the Sympathoadrenal System in Adaptation to Cold. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 46, n. 5, p. 589–600, 1 jun. 2016.

MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, J. R.; SAMUELS, S. E. Skeletal and cardiac muscle protein turnover during cold acclimation in young rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 3 47-3, 2000.

MEIJSING, S. H. Mechanisms of glucocorticoid-regulated gene transcription. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 872, p. 59–81, 2015.

MORGAN, H. J. N. **Participação de CREB/CRTC-2 na ativação do programa gênico da neoglicogênese hepática induzida pela inervação noradrenérgica, durante o estresse térmico, em camundongos.** Ribeirão Preto : 2021.

NADER, G. A.; MCLOUGHLIN, T. J.; ESSER, K. A. mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: Increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 289, n. 6 58-6, p. 1457–1465, 2005.

NAKAO, R. et al. Ubiquitin Ligase Cbl-b Is a Negative Regulator for Insulin-Like Growth Factor 1 Signaling during Muscle Atrophy Caused by Unloading. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 17, p. 4798–4811, set. 2009.

NAVEGANTES, L. C. C. et al. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 286, n. 4, p. E642-7, abr. 2004.

NAVEGANTES, L.C.C. KETTELHUT, I.C. Hormônios Adrenais. In: **Fisiologia Básica**, Rui Curi e Joaquim Procopio (Org.), 2ª ed. 2017, Guanabara Koogan-RJ.

QIAO, S. et al. A REDD1/TXNIP pro-oxidant complex regulates ATG4B activity to control stress-induced autophagy and sustain exercise capacity. **Nature Communications**, v. 6, 28 abr. 2015.

RANABIR, S.; REETU, K. Stress and hormones. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 18, 2011.

RUGINSK, S. G. et al. Glucocorticoid-Mediated Regulation of Circadian Rhythms: Interface with Energy Homeostasis and Reproduction. Em: **Corticosteroids**. [s.l.] InTech, 2018. p. 13.

SACHECK, J. M. et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 287, n. 4 50-4, out. 2004.

SAMUELS, S. E.; THOMPSON, J. R.; CHRISTOPHERSON, R. J. Skeletal and cardiac muscle protein turnover during short-term cold exposure and rewarming in young rats. **The American journal of physiology**, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1231-9, 1 jun. 1996.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399–412, 30 abr. 2004.

SANDRI, M. et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 44, p. 16260–16265, 31 out. 2006.

SARTORI, R.; ROMANELLO, V.; SANDRI, M. **Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. Nature Communications** Nature Research, , 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-020-20123-1>>. Acesso em: 19 jan. 2021

SCHAKMAN, O. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 10, p. 2163–72, out. 2013.

SCHAKMAN, O.; GILSON, H.; THISSEN, J. P. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. **Journal of Endocrinology**, v. 197, n. 1, p. 1–10, 1 abr. 2008.

SHIMIZU, N. et al. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 170–182, 2 fev. 2011.

SOFER, A. et al. Regulation of mTOR and Cell Growth in Response to Energy Stress by REDD1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 14, p. 5834, jul. 2005.

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

TCHEVKINA, E.; KOMELKOV, A. Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways. Em: **Protein Phosphorylation in Human Health**. [s.l.] InTech, 2012.

VAINSHTEIN, A.; SANDRI, M. Signaling pathways that control muscle mass. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 1–32, 2020.

VALLERAND, A.; JACOBS, I. Energy Metabolism During Cold Exposure. **International Journal of Sports Medicine**, v. 13, n. S 1, p. S191–S193, 14 out. 1992.

VALLERAND, A. L.; PÉRUSSE, F.; BUKOWIECKI, L. J. Cold exposure potentiates the effect of insulin on in vivo glucose uptake. **The American journal of physiology**, v. 253, n. 2 Pt 1, p. E179-86, ago. 1987.

VEGIOPOULOS, A.; HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, n. 1–2, p. 43–61, 15 set. 2007.

VENDELBO, M. H. et al. Fasting Increases Human Skeletal Muscle Net Phenylalanine Release and This Is Associated with Decreased mTOR Signaling. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 14 jul. 2014.

WALKER, J. M.; WATERBORG, J. H.; MATTHEWS, H. R. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: **Basic Protein and Peptide Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2003. p. 1–4.

WANG, H. et al. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39128–39134, 22 dez. 2006.

ZHAO, J. et al. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 472–483, 5 dez. 2007.

ZHENG, B. et al. FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 8, p. 2660–9, 6 ago. 2010.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2010 12:1, v. 12, n. 1, p. 21–35, 15 dez. 2010.

