Mirella Ribeiro Bento

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

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

São Paulo
2017

Mirella Ribeiro Bento

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

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Versão Corrigida

São Paulo
2017

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo (a) autor (a)

Bento, Mirella Ribeiro

Efeito da suplementação de leucina sobre a via GSK3-β durante a atrofia muscular esquelética induzida por imobilização./ Mirella Ribeiro Bento; orientador (a) Anselmo Sigari Moriscot. -- São Paulo, 2017.

59 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Atrofia. 2. Músculo esquelético. 3. Leucina. 4. GSK3-β 5. β-Catenina . I. Moriscot, Anselmo Sigari, orientador . II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mirella Ribeiro Bento

Titulo da Dissertação/Tese: Efeito da suplementação de leucina sobre a via GSK3-β durante atrofia muscular esquelética induzida por imobilização

Orientador: Anselmo Sigari Moriscot

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Impacto da suplementação de leucina sobre a via gsk3-β/ nf-kappab durante a atrofia induzida por imobilização***", registrado sob o protocolo nº ***100/2015***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **7/10/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Anselmo Sigari Moriscot**
- Membros da Equipe: *Mirella Ribeiro Bento (Pós-graduanda), Flávia Aparecida Graça Zuanazzi (Pós-doutoranda), William José da Silva (Pós-graduando), André Cruz (estagiário)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Impact of leucine supplementation upon the gsk3-β/ nf-kappab pathway during immobilization induced atrophy***", protocol nº ***100/2015***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/7/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Anselmo Sigari Moriscot**
- Team members: Mirella Ribeiro Bento (Graduate Student), Flávia Aparecida Graça Zuanazzi (Postdoctoral Researcher), William José da Silva (Graduate Student), André Cruz (Trainee)

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Rattus Novergicus	Wistar	Macho/Male	260g	120

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS GERAIS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus.

Ao meu orientador, Anselmo Sigari Moriscot pelo apredizado, profissionalismo, confiança, paciência e respeito.

Aos meus pais, onde deposito todo carinho do mundo. Minha mãe Marlene Ribeiro, meu pai Waldir Bento e às minhas irmãs, Gabriela, Izabella e Rafaella. Muito obrigada pela paciência e incentivo, vindos de todos vocês. Obrigada por acreditarem em mim!

À minha amada e enorme família. Meu avô, todos os tios, tias e primos que contribuíram de alguma forma.

À minha tia, Mariom Carmo por todo incentivo aos estudos, desde sempre. Obrigada por ser minha inspiração.

À todos os amigos mais próximos, pela paciência, compreensão e incentivo.

Um agradecimento especial à Gabriela Ando. Obrigada por ser a melhor pessoa do mundo, melhor amiga e por ser meu melhor apoio, durante tanto tempo. Obrigada pelo incentivo de diversas formas, pela paciência, pelo companheirismo e por sempre crescer junto comigo.

Agradecimento mais que especial aos amigos de laboratório:Igor Baptista, por ser um “Amado Mestre” e ter ensinado tudo, com muita dedicação e paciência. Ao João Guilherme, por ser a pessoa mais gentil do mundo. Obrigado pela amizade, carinho, compreenção,ensinamentos e conselhos. À Flávia Graça e Andrea Ferian, pela amizade, conversas, por toda ajuda experimental e pelas risadas mais gostosas. Ao William, agradeço por toda dedicação, colaboração e por ter me acompanhado em toda trajetória, com muito carinho. Ao André Cruz, pela paciência e por todas as suas teorias. Vocês são muito especiais e realmente são minha fonte de inspiração!

Aos colegas e amigos de laboratório, Marianne, Marcos, Patricia, Wenddy e Paula. Agradeço por todos os momentos de aprendizagem, descontração e companhia de todos os dias. Muito obrigada, por fazerem o meu dia mais feliz.

Aos companheiros de departamento, Victória,Luciano, Denício, Diego, Bárbara, Thaís, Ismael e Jean, pelos momentos de descontração e diversão.

Ao Departamento de Anatomia, ao laboratório da professora Elen Myabara, e aos funcionários do ICB III.

AGRADECIMENTOS ÀS ENTIDADES DE FOMENTO

Agradeço pelo suporte financeiro, às agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa doEstado de São Paulo (FAPESP - 2015/04090-0);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 306915/2014-6).

“Opte por aquilo que faz o seu coração vibrar,
apesar de todas as consequências.”

Osho

RESUMO

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

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

Palavras-chave:Músculo esquelético. Atrofia. Imobilização. Leucina.GSK3-β. β-Catenina. NFkB.

ABSTRACT

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

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

Keywords: Skeletal muscle.Atrophy. Immobilization. Leucine. GSK3-β. β-Catenina. NFkB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo representando o Sarcômero.. 18

Figura 2 - Sistema Ubiquitina Proteassoma.. 19

Figura 3 - Expressão gênica de GSK3-β durante 1 e 3 dias. 32

Figura 4 - Expressão proteica de GSK3-β durante 1 dia.....33

Figura 5 - Expressão proteica de GSK3-β durante 3 dias. 34

Figura 6 - Expressão gênica de β-Catenina durante 1dia. 35

Figura 7 - Expressão gênica de C-Jun durante 1 e 3 dias. 36

Figura 8 - Imunofluorescência para localização celular de β-Catenina em 1 dia. 37

Figura 9 - Imunofluorescência para localização celular de β-Catenina em 3 dias.....39

Figura 10 - Imunofluorescência Confocal representativa para β-Catenina.....40

Figura 11 - Western Blot das frações citoplasmática e nuclear de β-Catenina 41

Figura 12 - Expressão proteica e análise densitométrica de NFkB e BCL-3 1 dia ..42

Figura 13 - Expressão proteica e análise densitométrica de NFkB e BCL-3 3 dias .43

Figura 14 - Imunofluorescência para localização celular de NFkB e BCL-3 durante 1 dia 44

Figura 15 - Imunofluorescência para localização celular de NFkB e BCL-3 durante 3 dias.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados para western blot 27

Tabela 2 -Lista de anticorpos secundários utilizados para western blot.....27

Tabela 3 - Lista de anticorpos utilizados para imunofluorescência 28

Tabela 4 - Lista de Primers utilizados para a técnica de PCR-RT.....30

Tabela 5 - Massa do músculo soleo.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Akt	Proteína quinase B
ANK	Ankirina
BCL	B Cell Leukemia-3
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CSA	Área de secção transversal
Ctrl	Animais do grupo controle
DAPI	4’,6-dianidino-2-fenilidol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido deoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
E1	Enzima ativadora de Ub
E2	Enzima carreadora de Ub
E3	Enzima ligante de Ub
ECL	Enhanced chemiluminescence
FoxO	Forkhead box class
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GSK3-β	Glycogen synthase kinase 3 beta
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IGF-1	Insulin growth factor-1
IKB	Inibidor de kappa quinase B
Im	Imobilizado
Im+Leu	Imobilizado e suplementado com leucina
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
Leu	Leucina
MAFbx/Atrogin-1	Muscle atrophy F box
MSTN	Miostatina
mTOR	Proteína alvo da rapamicina de mamíferos
MuRF-1	Muscle RING-Finger 1
NFkB	Nuclear factor kappa B
NLS	Seqüência sinal de localização nuclear

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinosito-3-quinase
RHD	Domínio de homologia
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico mensageiro
RT	Transcrição reversa
S6K1	Proteína quinase S6
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	Tris-Buffered Saline with Tween 20
TCF	Transcription factor
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Ub	Ubiquitina
UPS	Ubiquitin proteassome system
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1 O Tecido Muscular e o processo de atrofia 17

1.2 Suplementação de leucina na atrofia muscular esquelética 20

1.3 O papel de GSK3-β na regulação de β-Catenina e NFkB durante atrofia 21

2 OBJETIVO 24

3 MATERIAIS E MÉTODOS 25

3.1 Animais 25

3.2 Desenho Experimental 25

3.3 Isolamento de Proteínas e Western Blot 26

3.4 Imunofluorescência 27

3.5 Extração de RNA total e quantificação 28

3.6 RT-PCR- Reação em cadeia de polimerase em tempo real 29

3.7 Forma de Análise dos Resultados 30

4 RESULTADOS 31

4.1 Análise da massa do músculo Sóleo 31

4.2 Análise de expressão gênica e proteica de GSK3-β 31

4.3 β-Catenina durante a imobilização e suplementação com Leucina 34

4.3.1 Expressão Gênica de β-Catenina e um de seus genes alvos 35

4.3.2 Localização celular de β-Catenina 36

4.3.3 Expressão proteica citoplasmática e nuclear de β-Catenina 40

4.4 Expressão proteica de NFkB e BCL-3 41

4.5 Localização celular de NFkB e BCL-3 43

5 DISCUSSÃO 46

5.1 Papel da suplementação de leucina na via GSK3-β e Wnt/β-Catenina durante o processo de atrofia muscular por imobilização 46

5.2 Papel da suplementação de leucina na via NFkB(p50)/BCL-3 durante o processo de atrofia muscular por imobilização 49

6 CONCLUSÃO 51

REFERÊNCIAS.....52

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Tecido Muscular e o processo de atrofia

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

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

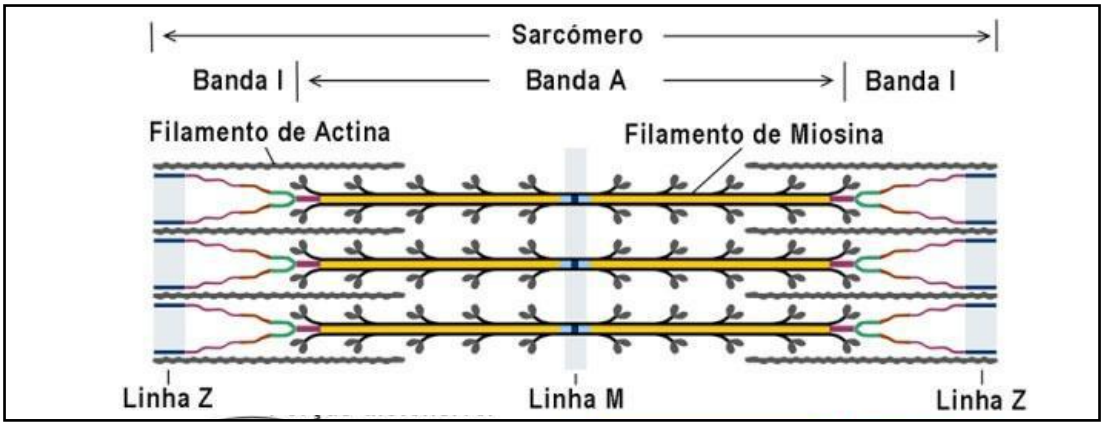

Figura 1 - Esquema ilustrativo representando o Sarcômero. Estão representadas as proteínas miofibrilares, Actina e Miosina; as divisões de bandas claras (I) e de bandas escuras (A), além de indicar as linhas M e Z. Adaptado de Castro-Ferreira 2011(4).

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

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

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

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

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

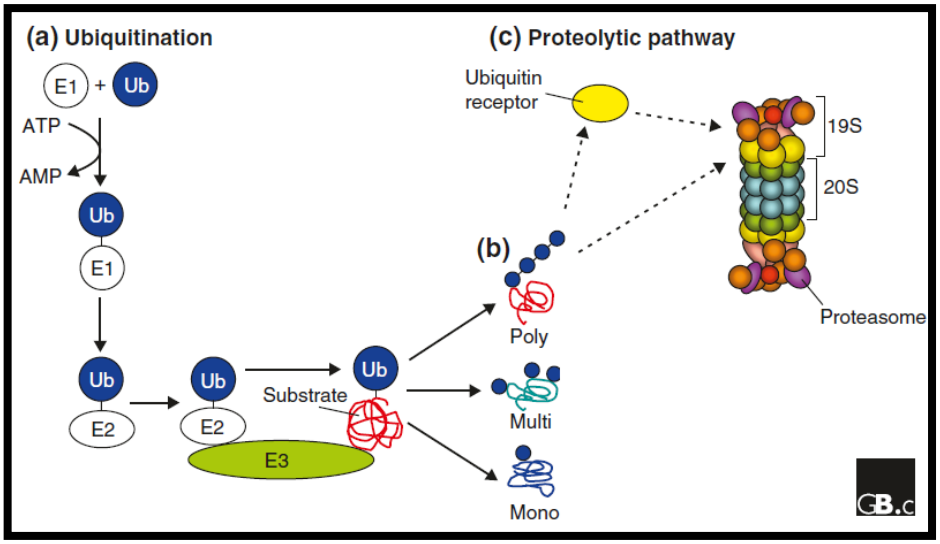

Figura 2 - Sistema Ubiquitina Proteassoma. (a) Ativação de Ub pela E1. Carregamento de Ub ativada pela E2 e ligação de Ub no substrato indicado para degradação pelo E3; resultando assim em (b) ligação de uma única molécula de Ub (Mono ubiquitinação); ligação de unidades múltiplas de UB sobre a mesma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

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

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

1.2 Suplementação de leucina na atrofia muscular esquelética

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

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

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

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

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

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

1.3 O papel de GSK3-β na regulação de β-Catenina e NFkB durante atrofia

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Este projeto tem como principal objetivo investigar mecanismos envolvidos na ação anti-atrófica de leucina, enfatizando os processos deflagrados pela via GSK3-β.

2.2 Específicos

- Analisar a expressão gênica e proteica de GSK3-β e β-Catenina, além do gene alvo de β-Catenina, C-Jun.
- Realizar a análise de localização celular de β-Catenina.
- Avaliar o conteúdo protéico da via NFkB/BCL-3 e sua localização celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais realizados nesse estudo estão todos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, processo 2015/100)

Ratos Wistar machos com 60 dias (~260g) provenientes do Centro de Bioterismo (FM, Rede USP de Biotérios) foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos. Estes animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas/12 horas, no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICBIII/USP), com ração e água “ad libitum”.

3.2 Desenho Experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada: animais controle (Ctrl), imobilizados (Im), somente suplementados com leucina (Leu) e imobilizados e suplementados com leucina (Im+Leu). Estes grupos foram submetidos a diferentes períodos de tratamento: 1 e 3 dias após imobilização e suplementação, a fim de verificar alterações moleculares (de caráter mais rápido) e morfológicas (de caráter mais lento).

Os ratos do grupo controle tiveram apenas a alimentação normal. Os animais imobilizados foram anestesiados (30 mg/kg corporal de Ketamina e 10mg/kg corporal de Xilazina) e tiveram sua pata posterior esquerda imobilizada com o músculo sóleo em posição encurtada, com o auxílio de gesso, durante todos os períodos, sendo sacrificados ao final de cada período. A dose de leucina (L-Leucine, Ajinomoto©, Tokyo, Japan) utilizada para os animais suplementados, foi de 2,7mg/kg corporal via gavage, durante todos os períodos de tratamento (32).

A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical e o músculo sóleo foi retirado, pesado, congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80 ºC para posteriores análises das expressões gênica e proteica. As amostras para

imunofluorescência foram crio preservadas com a utilização de Isopentano gelado, mantido em nitrogênio líquido com posterior estoque em freezer -80 ºC.

3.3 Isolamento de Proteínas e Western Blot

Para extração da proteína total, o tecido mantido congelado em nitrogênio liquido, foi triturado manualmente utilizando um Mortar e o triturado foi recolhido, homogeneizado com tampão RIPA 2,5x na proporção de 1g de tecido para 10 ml de tampão (100 mMKCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCL2, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 10% SDS e 0,1 ml de inibidor de proteinase Sigma (Sigma Aldrich©, St. Louis, USA) e centrifugado a 10.000 x rpm por 10 minutos a 4 °C, em seguida o sobrenadante foi recolhido e armazenado.

Para extração das frações citoplasmática e nuclear, o tecido foi triturado com o auxilio de um pistilo de vidro contendo tampão RIPA na proporção de 1 g de tecido para 10 ml de tampão (50 mM Tris-HCl, 150 mMNaCl, 0,5% deoxicolato de sódio, 1% Nonidet) com 0,1 ml de inibidor de proteinase Sigma(SigmaAldrich©, St. Louis, USA), centrifugado a 16.000x G por 5 minutos a 4 °C e em seguida o sobrenadante contendo a fração citoplasmática foi recolhido e armazenado. O pellet contendo os núcleos foram homogeneizados com tampão RIPA contendo DNAse e 1% SDS, centrifugado a 16.000 x G por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante contendo a fração nuclear foi recolhida e armazenada.

As proteínas foram quantificadas através do método de Bradford (BioRad). Prepara-se o gel de eletroforese (gel de separação) e o stacking gel (gel de empilhamento) na concentração desejada, de acordo com o tamanho da proteína estudada (entre 10 e 15%) e aplica-se de 10-60 µg de proteína diluída em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer). Após eletroforese das proteínas e transferência para membrana de nitrocelulose, cora-se com Ponceau Vermelho (BioRad) para normalização do gel. Anteriormente à incubação com anticorpo primário, é realizado um pré-bloqueio utilizando leite ou BSA (para proteínas fosforiladas), durante o período de 1h.

Após incubação (“overnight” a 4 °C) com anticorpo primário e lavagem, foi realizada a incubação com solução de anticorpo secundário, durante 1hora.Terminada a incubação, lava-se com tampão salina Tris com 0,1% de Tween

20 (TBS-T) (0,5 M NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 7,4) 2 x por 5 minutos. Foi realizada a detecção enzimática por quimiluminescência, onde as membranas foram mergulhadas em uma solução contendo Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Milipore #WBLUF500). As membranas foram fotografadas utilizando o equipamento Fusion FX (Vilber Lourmat Byosystems) epara a realização da densitometria das bandas, foi utilizado o VisionCapt, software do próprio equipamento no qual as imagens foram adquiridas (n=4).

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários utilizados para western blot

Anticorpo	Diluição	Referência
GSK3-β	5% leite – TBS-T (1:1000)	Cell Signaling #9315
GSK3-β phospho (Ser9)	5% BSA – TBS-T (1:1000)	Cell Signaling # 9336
β-Catenina	5% leite – TBS-T (1:1000)	Cell Signaling #2009s
GAPDH	5% leite – TBS-T (1:3000)	Cell Signaling # 2118s
NF-kappaB p50	5% BSA – TBS-T (1:1000)	Santa Cruz sc-1190
Bcl-3	5% BSA – TBS-T (1:1000)	Santa Cruz sc-185

Tabela 2 -Lista de anticorpos secundários utilizados para western blot

Anticorpo	Diluição	Referência
Polyclonal Goat Anti-Rabbit	5% BSA – TBS-T (1:3000)	Jackson Immuno Research 111-035-000
Polyclonal Donkey Anti-Goat	5% BSA – TBS-T (1:3000)	Jackson Immuno Research705-035-003

3.4 Imunofluorescência

Os músculos sóleos foram seccionados transversalmente em uma espessura de 10 µm, utilizando o Crisotato Leica (Leica Biosystems, Nussloch, Germany #CM1850UV). Para a imunomarcação, esses tecidos foram fixados em lâminas com Paraformaldeído 4% (PFA 4%) por 10 minutos. As lâminas foram lavadas com tampão de fosfato salino + 0,1% tween 20 (PBS-T) 3 vezes por 3 minutos cada uma e em seguida bloqueadas/permeabilizadas com 1% de albumina de soro bovino (BSA) + PBS-T (PBST+1% BSA) por 1 hora em temperatura ambiente.

Posteriormente as lâminas foram incubadas com uma solução contendo o anticorpo primário (1:200) em uma solução PBS-T+1% BSA, dentro de uma câmara úmida, overnight (4°C). No dia seguinte as lâminas foram lavadas PBS-T 3 vezes por 5 minutos cada uma e incubadas com uma solução de PBS-T+BSA 1% contendo anticorpo secundário em uma câmara escura durante 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS-T (3 x por 5 minutos) e em seguida foram montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield com 4',6-diamidino-2-fenilidol (DAPI) e lamínulas. Para contagem do total de núcleos e núcleos positivos para β-Catenina, foram selecionados 2 campos de cada amostra experimental, utilizando o software imageJ (https://imagej.nih.gov/ij/) (n=4).

Tabela 3 -Lista de anticorpos utilizados para imunofluorescência

Anticorpo	Diluição	Referência
Primário: β-Catenina	PBST+1% BSA (1:200)	Cell Signaling #2009s
Primário:NF-kappaB p50	PBST+1% BSA (1:100)	Santa Cruz sc-1190
Primário: Bcl-3	PBST+1% BSA (1:100)	Santa Cruz sc-185
Secundário: Goat anti-Rabbit	PBST+1% BSA (1:250)	Cy3 111-165-144 Jackson Imuno Research
Secundário: Donkey anti-Goat	PBST+1% BSA (1:250)	Alexa Flúor 488705-545-147 Jackson Imuno Research

3.5 Extração de RNA total e quantificação

As amostras de músculo Sóleo (~25mg) foram homogeneizadas com Polytron e o RNA total foi isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen©, Carlsbad, USA) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram dissolvidas em TE (Tris-EDTA) e as suas concentrações determinadas através de espectrometria (NanoDrop 1000 Thermo Fisher). A pureza do RNA foi confirmada através do cálculo da razão de absorbância a 260 nm e 280 nm e a integridade do RNA foi verificada com o gel desnaturante de agarose 1% corado com brometo de etídio, e detecção do rRNA (RNA ribossomal) 28S e 18S.

3.6 qRT-PCR- Reação em cadeia de polimerase em tempo real

Todos os primers foram desenhados utilizando o software Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) e estão descritos na Tabela 4. Para síntese de cDNA (DNA complementar), 1 µg de RNA total foi utilizado na reação de transcrição reversa, contendo OligodT (500 ug/ml), 10 nM de dNTP Mix, 5 x FirstStrand Buffer, 0,1 M de DTT e 200 U de transcriptase reversa (MMLV Reverse Trancriptase-Promega). A reação foi realizada conforme as recomendações do fabricante: 70 °C por 10 minutos, 42 °C por 60 minutos e 95 °C por 10 minutos. A PCR Real-Time para os genes analisados foi realizada com cDNA diluído em mix contendo Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied), água e respectivos iniciadores Forward e Reverse (Tabela 4). As condições de ciclagem utilizadas foram 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos e a amplificação ocorreu em 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 60 segundos.

O Ct, limiar de ciclagem em que pode ser notado um aumento na fluorescência, indica a quantidade de DNA complementar (cDNA) presente nas amostras, e conseqüentemente os níveis de RNA mensageiro (RNAm) que estavam presentes na reação. A expressão gênica foi medida através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrito por K. Livak no Manual do Usuário do Biosystem Sequence Detctor Bulletin 2, onde $\Delta\Delta Ct$ = [Ct amostra – Ct controle interno da mesma amostra] – [Ct controle – Ct do controle interno com a mesma amostra controle. A fórmula é baseada na suposição que a taxa com que o Ct mude versus a taxa que a cópia alvo mude, seja idêntica para o gene de interesse e o controle interno Ciclofilina A (n=5).

Tabela 4 -Lista de Primers utilizados para a técnica de PCR-RT

Primers	Forward	Reverse	Número de acesso
GSK3-β	TTCAACTTTACCACTCAAGAACTGTC	AGCATTAGTATCTGAGGCTGCTG	NM_032080.1
β-Catenina	CCGAGGACTCAATACCATTCC	AAGCCGTTTCTTGTAGTCCTG	NM_053357.2
C-Jun	CCGGCTAGAGGAAAAAGTGA	TGAGTTGGCACCCACTGTTA	NM_021835
Ciclofilina A	GCCGATGACGAGCCCTTG	TGCCGCCAGTGCCATTAT	NM_017101.1

3.7 Forma de Análise dos Resultados

Para a análise dos resultados foi utilizado o software GraphPad Prism5, o qual permite a realização de múltiplos testes estatísticos, como por exemplo o teste t para comparações entre dois grupos de amostras, usado para análise entre os grupos Ctrl e Im (Figura 8B) e One-Way Anova para análise multicomparativa, seguida do pós-teste de Tukey, $p<0.05$ Vs. Ctrl ou Im.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da massa do músculo Sóleo

Tabela 5 - Efeito da imobilização e suplementação com leucina sobre a massa do músculo Sóleo. Peso do músculo/peso corporal (mg/g).

Peso do músculo/ peso corporal (mg/g)								
	Controle 1D	**Leucina 1D**	**Imob 1D**	**Im+Leu 1D**	**Controle 3D**	**Leucina 3D**	**Imob 3D**	**Im+Leu 3D**
n1	0,33	0,30	0,27	0,28	0,31	0,25	0,31	0,25
n2	0,32	0,28	0,26	0,25	0,31	0,30	0,27	0,26
n3	0,33	0,30	0,25	0,24	0,29	0,26	0,25	0,26
n4	0,31	0,26	0,29	0,25	0,28	0,24	0,27	0,28
n5	0,28	0,29	0,26	0,25	0,31	0,28	0,25	0,27
Média	0,31	0,29	0,27	0,25	0,30	0,27	0,27	0,26
Desvio Padrão	0,017	0,015	0,012	0,015	0,012	0,024	0,023	0,011

A tabela acima mostra o peso dos músculos utilizados nos experimentos durante tratamento com suplementação de leucina de 1 e 3 dias. Não foi observada nenhuma alteração significativa da massa do músculo sóleo entre os grupos experimentais. Esta ausência de significância estatística pode ser explicada devido ao fato da atrofia muscular só adquirir um caráter visível, após o sétimo dia de tratamento (32).

4.2 Análise de expressão gênica e proteica de GSK3-β

Inicialmente investigamos o nível de expressão gênica de GSK3-β, bem como seu grau de ativação em nosso modelo de imobilização e/ou suplementação com leucina durante 1 e 3 dias. Durante a análiseda expressão gênica de GSK3-β 1 e 3 dias (Figuras 3A e 3B, respectivamente), seus níveis de expressão permaneceram constantes em todos os grupos de tratamento em comparação ao grupo controle.

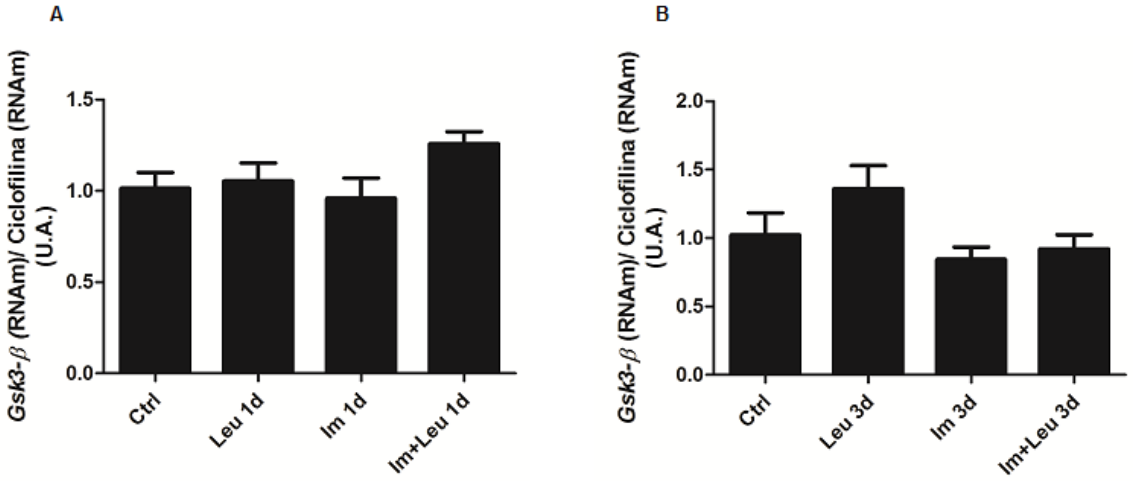

Figura 3 – Gráfico representando a expressão gênica de GSK3-β durante 1 dia (A) e durante 3 dias (B) de tratamento de imobilização e suplementação com leucina. A Ciclofilina foi utilizada como controle endógeno (n=5).

Posteriormente analisamos os níveis de expressão de GSK3-β em sua forma ativa (não fosforilada) e inativa (fosforilada). A análise por Western Blot para GSK3-β em 1 dia de imobilização mostra que, em relação ao controle, a proteína fosforilada apresenta uma diminuição de sua expressão. Por outro lado, os níveis de GSK3-β fosforilado em animais imobilizados e suplementados com leucina se mostraram semelhantes aos do grupo controle (Figura 4A e 4B).

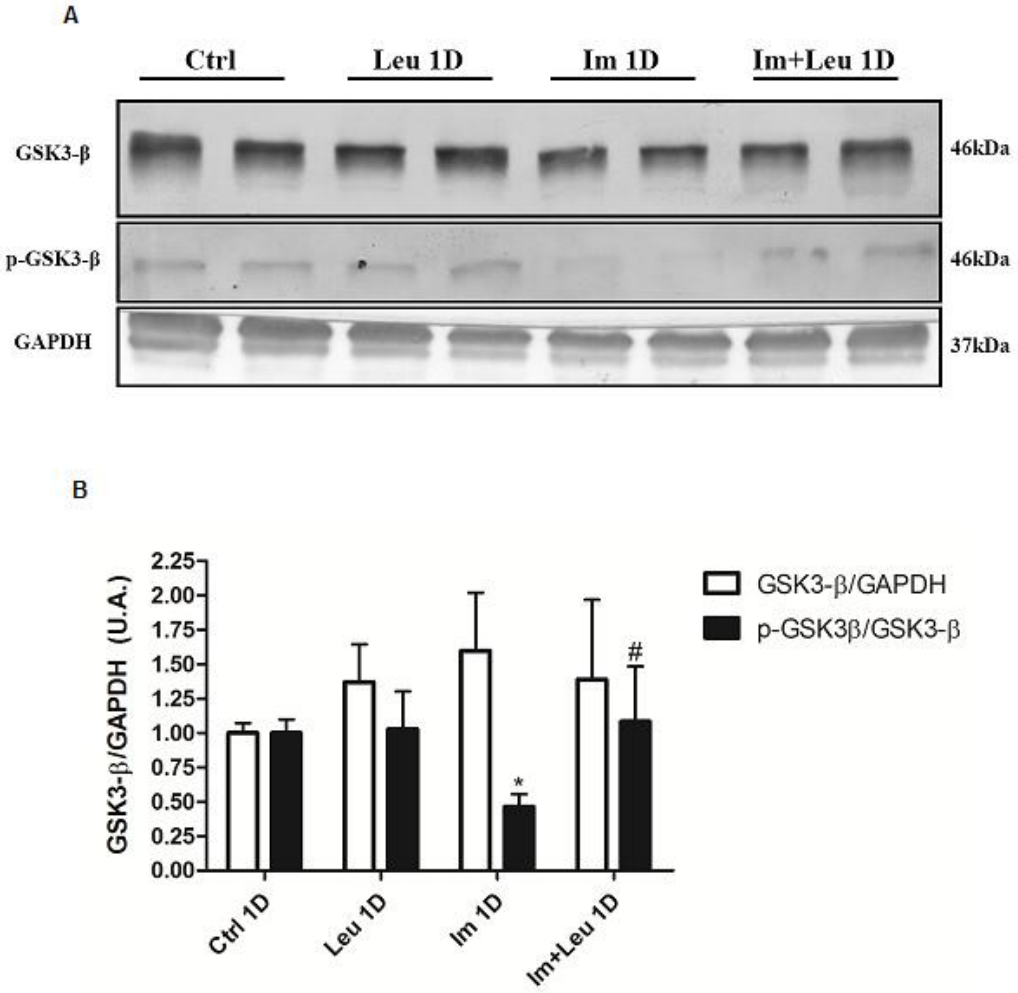

Figura 4 - Expressão proteica de GSK3-β fosforilada e total, para os grupos tratados com imobilização e/ou suplementação de leucina em 1 dia (A). GAPDH foi utilizado como controle interno. Gráfico representando análise densitométrica de GSK3-β total e fosforilada (B) que foram dadas em unidades arbitrarias (u.a.). *p<0.05 Vs. Controle; #p<0.05 Vs. Im. (n=4).

Durante a análise em 3 dias de tratamento, não observamos modulações significativas na expressão proteica de GSK3-β (Figura 5A e 5B), além disso seu conteúdo total permanece constante em todos os dias e grupos experimentais, mostrando que somente sua atividade é modulada durante o tratamento. Estes resultados sugerem que a atividade de GSK3-β é um fator importante durante o processo de atrofia muscular induzida pela imobilização e que a suplementação com leucina pode, em parte, reprimir esta atividade. Uma vez que GSK3-β em sua forma ativa é capaz de fosforilar β-Catenina, levando-a para degradação no complexo 26S do proteassoma, decidimos então explorar elementos que possam estar sendo modulados com a repressão de GSK3-β durante a suplementação de leucina.

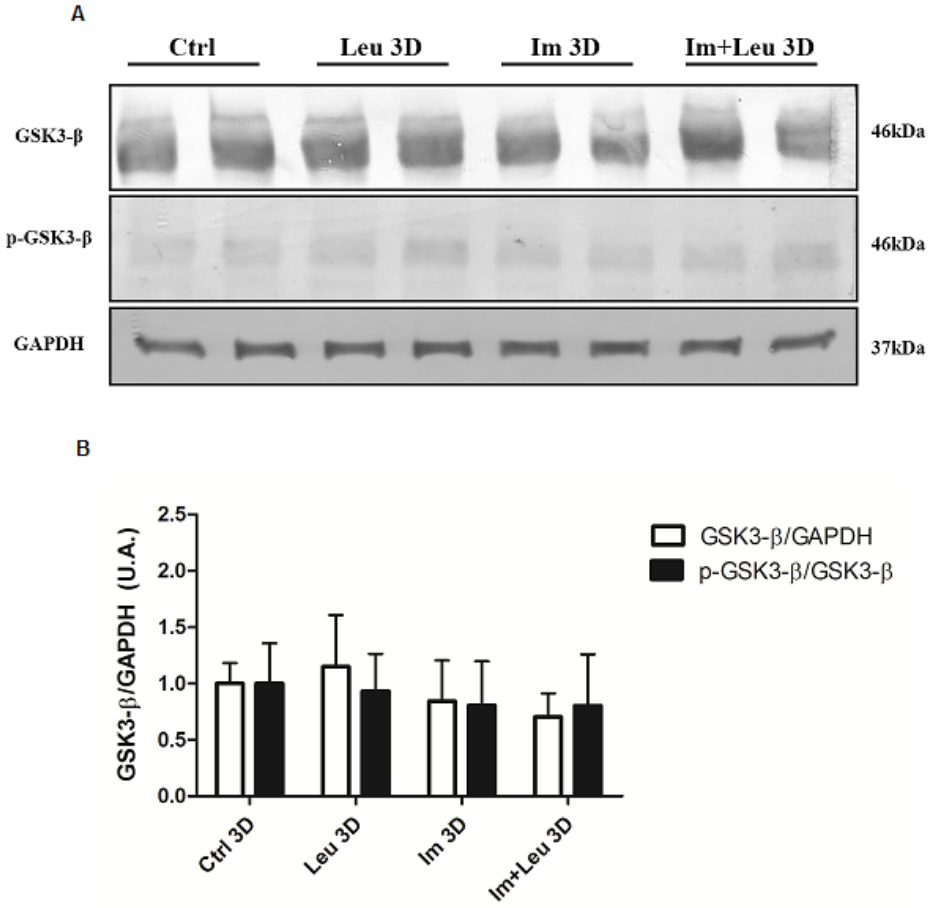

Figura 5 - Expressão proteica de GSK3-β fosforilada e total, para os grupos tratados com imobilização e/ou suplementação de leucina durante 3 dias (A). GAPDH foi utilizado como controle interno. A análise densitométrica de GSK3-β total e fosforilada (B) foram dadas em unidades arbitrarias (u.a.). (n=4).

4.3β-Catenina durante a imobilização e suplementação com Leucina

Como descrito na literatura, β-Catenina, além de participar na formação e ancoragem da E-Caderina na adesão célula-célula, também tem um papel chave no desenvolvimento embrionário e homeostase através da via Wnt/β-Catenina, atuando como um importante fator de transcrição durante estes processos, decorrente de sua migração para o núcleo e ativação de genes alvo. Por outro lado, GSK3-β quando está em sua forma ativa (não-fosforilada) pode fosforilar β-

Catenina no citoplasma, levando esta à ubiquitinação e subseqüente degradação no sistema ubiquitina proteassoma (64).

4.3.1 Expressão Gênica de β-Catenina e um de seus genes alvos

Nosso próximo passo foi explorar a expressão gênica de β-Catenina em nosso modelo de imobilização e suplementação de leucina. Inicialmente não observamos modulações significativas na expressão gênica de β-Catenina, durante a imobilização e/ou suplementação com leucina após 1 dia (Figura 6A) e 3 dias (Figura 6B).

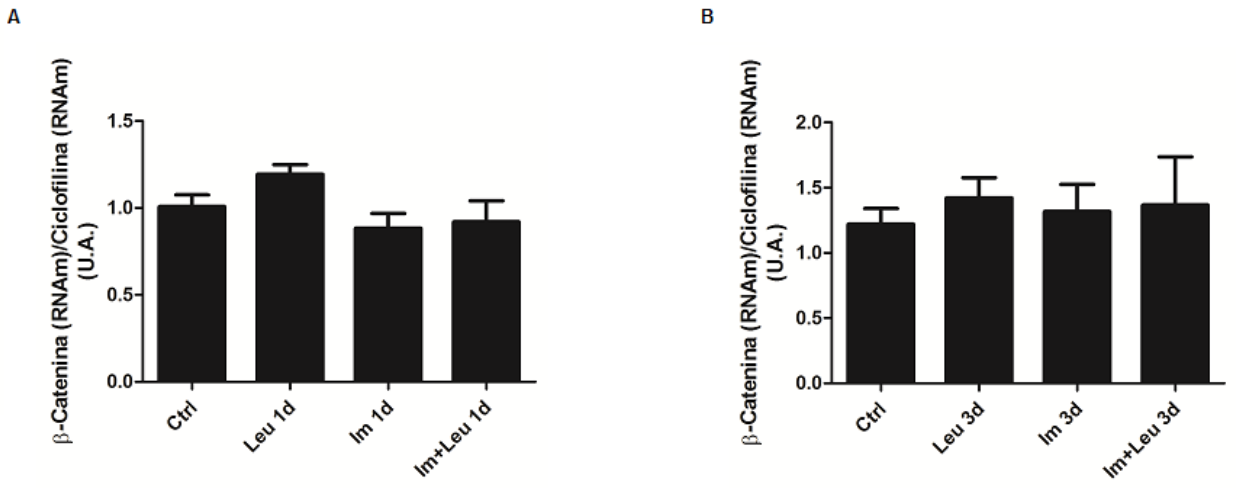

Figura 6 – Gráfico representando a expressão gênica de β-Catenina durante 1dia (A) e 3 dias (B) de imobilização e/ou suplementação com leucina. Ciclofilina A foi utilizada como controle endógeno (n=5).

Nosso próximo passo foi verificar se a suplementação com leucina havia algum impacto na sinalização nuclear de β-Catenina e para tanto, utilizamos a expressão gênica de C-Jun, pois trata-se de um gene alvo bem conhecido (65). De fato, detectamos um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão gênica de C-jun apenas com o tratamento com leucina por 1 dia (Figura 7A). Enquanto a imobilização *per se* não afeta a expressão gênica de C-jun, o tratamento com leucina em animais imobilizados causa também um aumento de aproximadamente 2 vezes na expressão deste gene (Figura 7A). A despeito de pequenas diferenças

na magnitude das respostas, encontramos o mesmo perfil de expressão de C-jun com 3 dias de tratamento com leucina (Figura 7B).

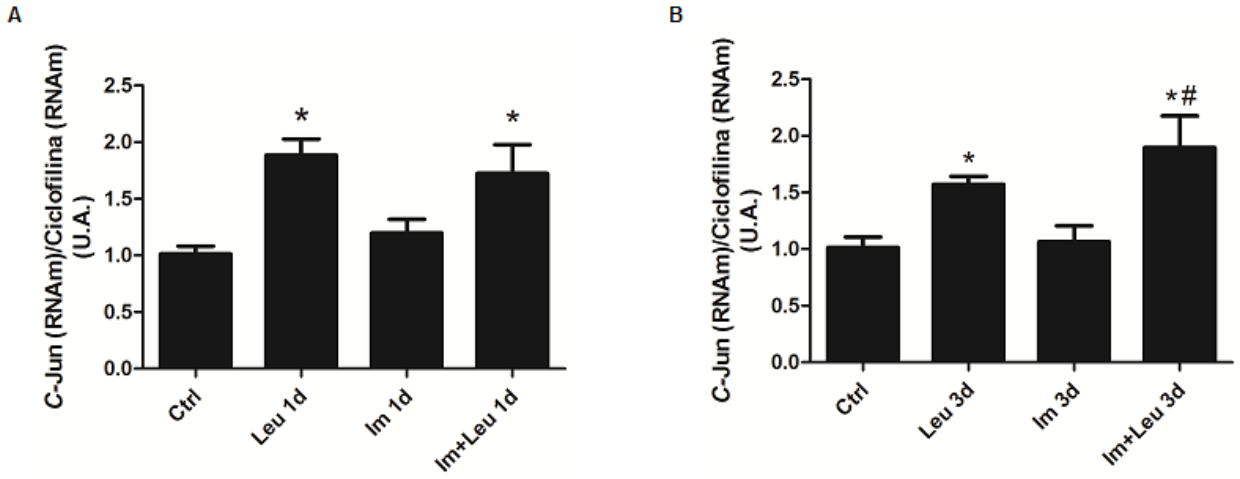

Figura 7 –Gráfico representando a expressão gênica de C-Jun durante 1dia (A) e 3 dias (B) de imobilização e/ou suplementação com leucina. Ciclofilina A foi utilizada como controle endógeno. *P<0.05 Vs. Ctrl; #p<0.05Vs. Im. (n=5).

4.3.2 Localização celular de β-Catenina

Nosso próximo passo foi analisar a localização celular de β-Catenina durante a imobilização e suplementação com leucina. Nestes experimentos observamos uma forte co-localização nuclear e perinuclear de β-Catenina nos animais apenas suplementados com leucina e também observamos essa co-localização nos grupos imobilizados e suplementados com leucina, após 1 e 3 dias de tratamento (Figuras 8 e 9, setas brancas, respectivamente). Interessantemente, comparados aos animais controle, observamos uma redução na imunomarcação de β-Catenina, nos animais apenas imobilizados por 1 e 3 dias (Figura 8 e 9).

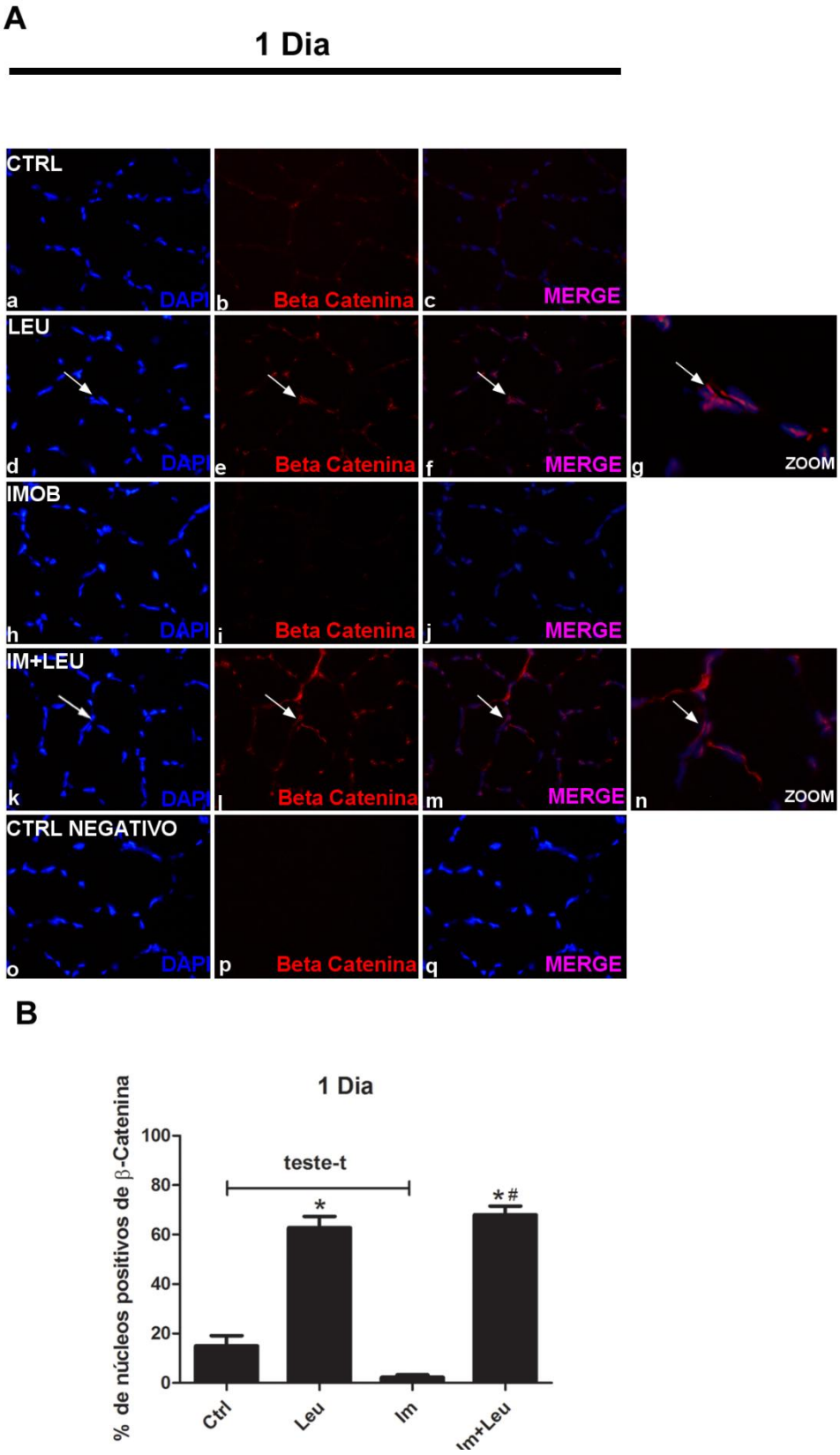

Figura 8 - (A) Demonstração do ensaio de Imunofluorescência realizado para a determinação de localização celular de β-Catenina (vermelho) durante imobilização e/ou suplementação com leucina em 1 dia. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul) e as setas brancas indicam co-localização nuclear de β-Catenina, que pode ser melhor observada através do zoom digital nos grupos Leu (g) e Im+Leu (n). O controle negativo é representado na porção inferior da imagem (o, p e q). (B) Gráfico

representativo da contagem do total de núcleos e do total de núcleos positivos para β-Catenina. Para realização das contagens foram selecionados 2 campos de cada amostra experimental. *p<0.05 Vs. Controle; #p<0.05 Vs. Im, n=4.

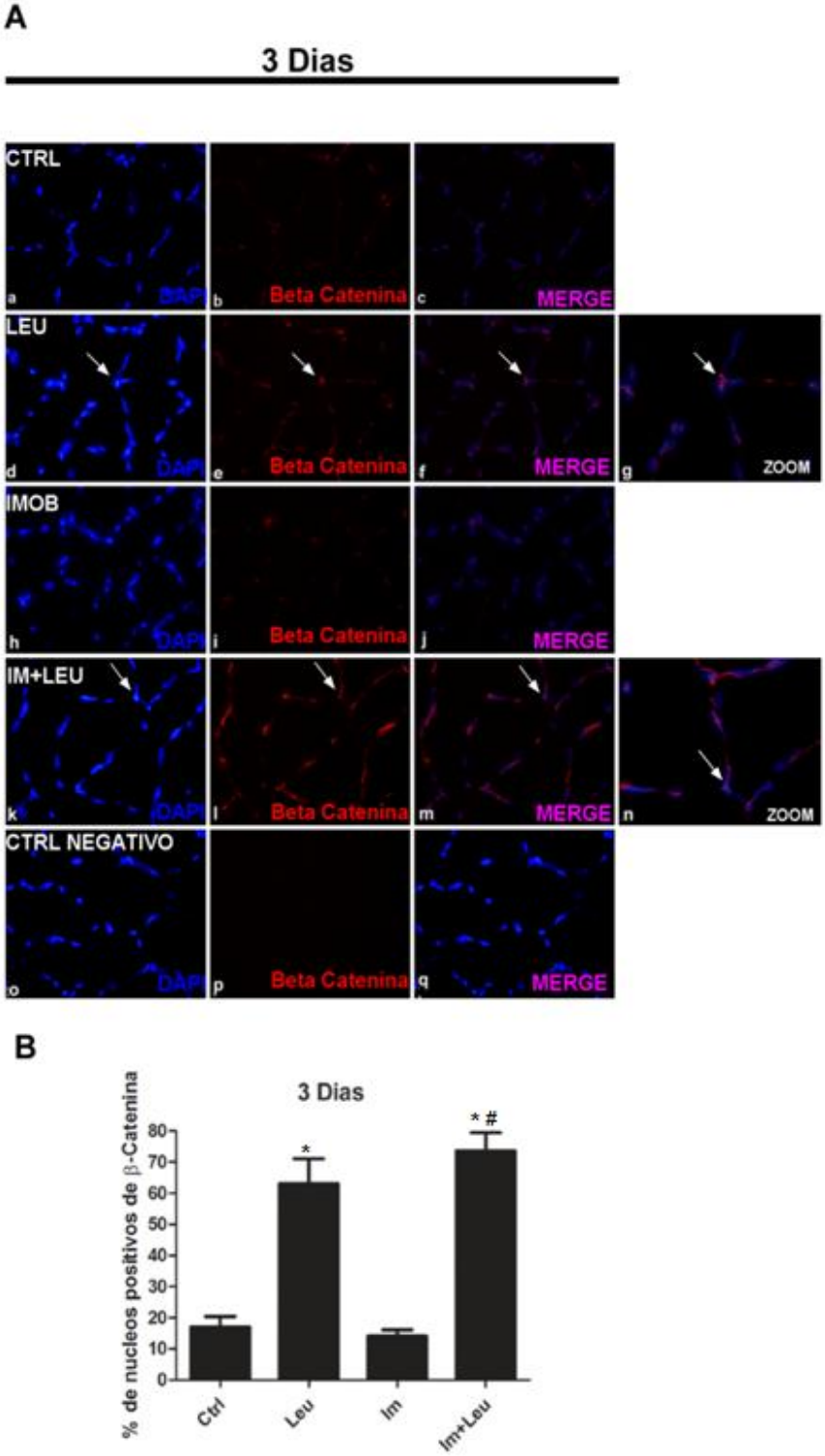

Figura 9– (A) Demonstração do ensaio de Imunofluorescência realizado para a determinação de localização celular de β-Catenina (vermelho) durante imobilização e/ou suplementação com leucina em 3 dias. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul) e as setas brancas indicam co-localização nuclear de β-Catenina, que pode ser melhor observada através do zoom digital nos grupos Leu (g) e Im+Leu (n). O controle negativo é representado na porção inferior da imagem (o, p e q). (B) Gráfico representativo da contagem do total de núcleos e do total de núcleos positivos para β-Catenina. Para realização das contagens foram selecionados 2 campos de cada amostra experimental. *$p<0.05$ Vs. Controle; #$p<0.05$ Vs. Im, n=4.

A fim de melhor caracterizar a marcação nuclear de β-Catenina, decidimos usar um microscópio Confocal, para os grupos experimentais estudados (Figura 10). Em uma análise de trama 3D, a localização nuclear é mostrada como pontos brancos (Figura 10A). Além disso, a projeção ortogonal de uma área restrita mostra co-localização de DAPI e β-Catenina em um núcleo particular, tanto no eixo XZ como YZ (Figura10B).

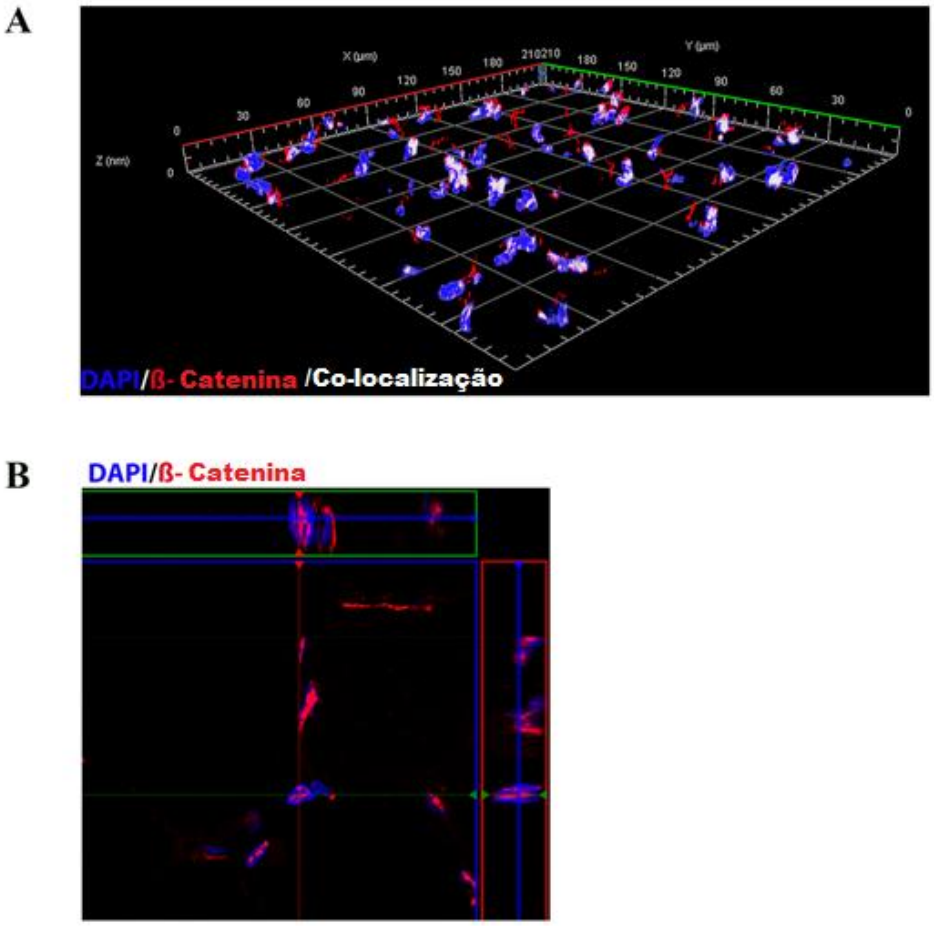

Figura 10 – (A) Imagem correspondente ao ensaio de imunofluorescência realizada no microscópio Confocal que representa β-Catenina (vermelho), mostrando também a co-localização dos núcleos de β-Catenina (manchas brancas) na imagem 3D . (B) Projeções ortogonais representativas que verificam a presença de β-Catenina dentro dos núcleos. A coloração DAPI (azul) foi utilizada para identificação de núcleos.

4.3.3 Expressão proteica citoplasmática e nuclear de β-Catenina

Em seguida realizamos Western Blots de fração de proteína citoplasmática e nuclear, a fim de avaliar o conteúdo proteico de β-Catenina nestes compartimentos. Nestes experimentos, após 1 dia de tratamento no compartimento nuclear, observamos modulações significativas entre o grupo suplementado e imobilizado com leucina, em relação ao grupo apenas imobilizado (Figura 11 A e B). Em contrapartida, no compartimento citoplasmático, notamos uma redução no grupo apenas imobilizado, em relação ao grupo controle (Figura 11 A e C), porém a análise realizada em razão núcleo/citoplasma, não apresentou modulações significativas

(Figura 11 D). Contudo, esses resultados sugerem uma redução de β-Catenina citoplasmática, durante 1 dia de imobilização e um aumento de β-Catenina nuclear durante a imobilização e suplementação com leucina, o que provavelmente pode estar ligado com o papel anti-atrófico desse aminoácido. No entanto, serão necessários novos experimentos, principalmente após 3 dias de tratamento, para avaliarmos a localização celular de β-Catenina através desta técnica.

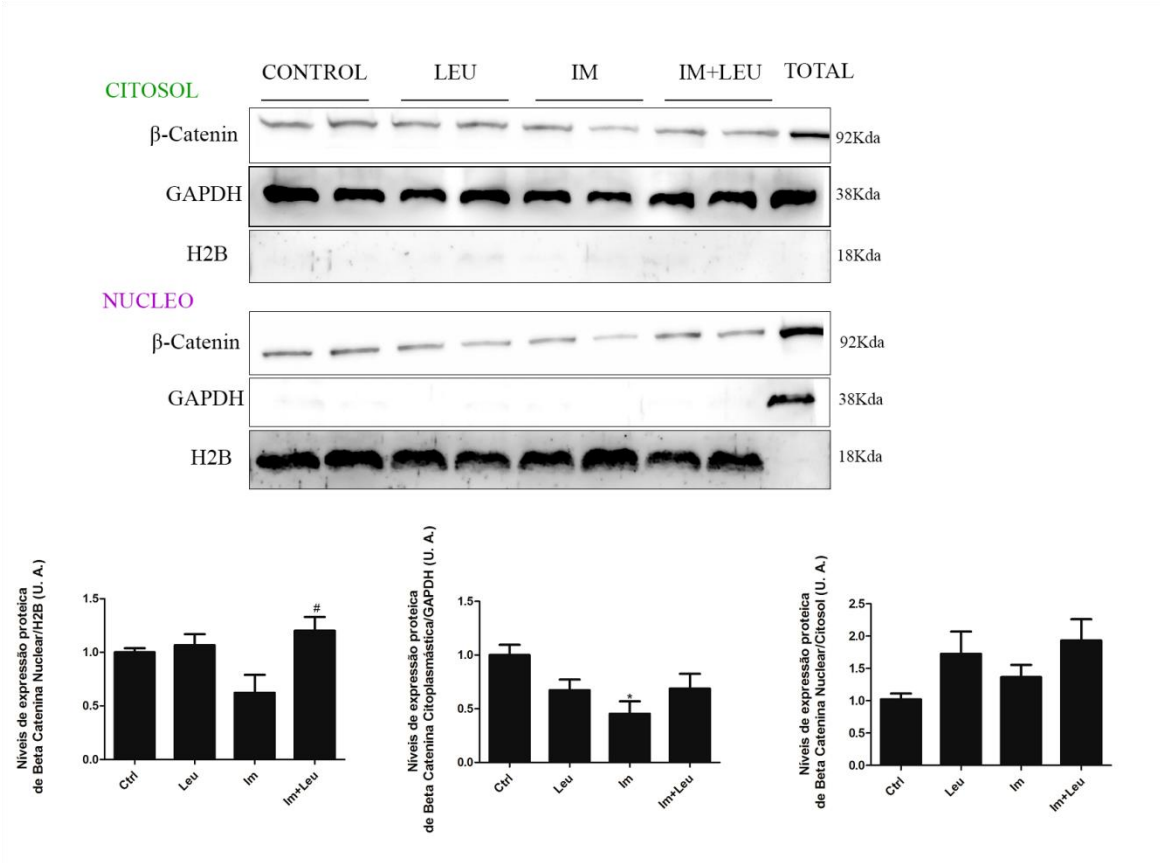

Figura 11 -(A) Imagem representando o ensaio de Western Blot realizado com o extrato proteico das frações citoplasmática e nuclear para analise da expressão de β-Catenina após 1 dia de imobilização e/ou suplementação com leucina. GAPDH e H2B foram utilizados como controles endógenos de cada fração citoplasmática e nuclear, respectivamente. As densitometrias (B-D) são dadas em unidades arbitrarias (U.A.) *p<0.05 Vs. Controle; #p<0.05 Vs. Im. (n=5).

4.4 Expressão proteica de NFkB e BCL-3

Interessantemente, alguns autores têm descrito que β-Catenina pode interagir fisicamente com NFkB no citoplasma e inibir sua translocação para o núcleo, podendo assim,modular a ativação de NFkB através de GSK3-β,

desempenhando um importante papel em vários tipos de cânceres e agindo como um fator anti-inflamatório (42-44).A partir destes dados literários e dos resultados obtidos até este ponto, decidimos analisar a expressão proteica de NFkB (subunidade p50) e BCL-3 em nossos grupos experimentais. Como pode ser observado nas Figuras12 e 13, nestes experimentos utilizamos extrato total de proteínas e não constatamos modulações significativas na expressão proteica de NFkB e de BCL-3 em nenhum dos grupos experimentais e nos tempos de tratamento (1 e 3dias), o que também pode ser evidenciado através das densitometrias.

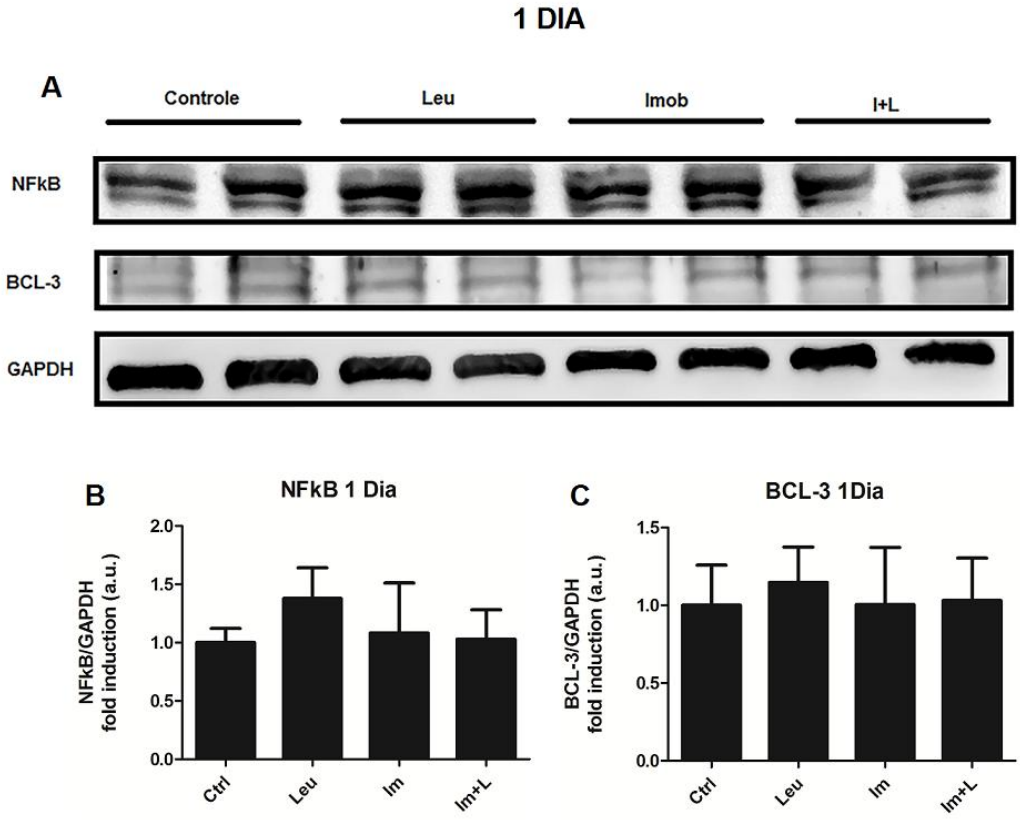

Figura 12 – Representação da análise da expressão proteica e densitométrica de NFkB (A e B) e de BCL-3 (A e C) para os grupos estudados em 1 dia de imobilização e/ou suplementação de leucina. GAPDH foi utilizado como controle interno. As densitometrias são dadas em unidades arbitrarias (a.u.). (n=5).

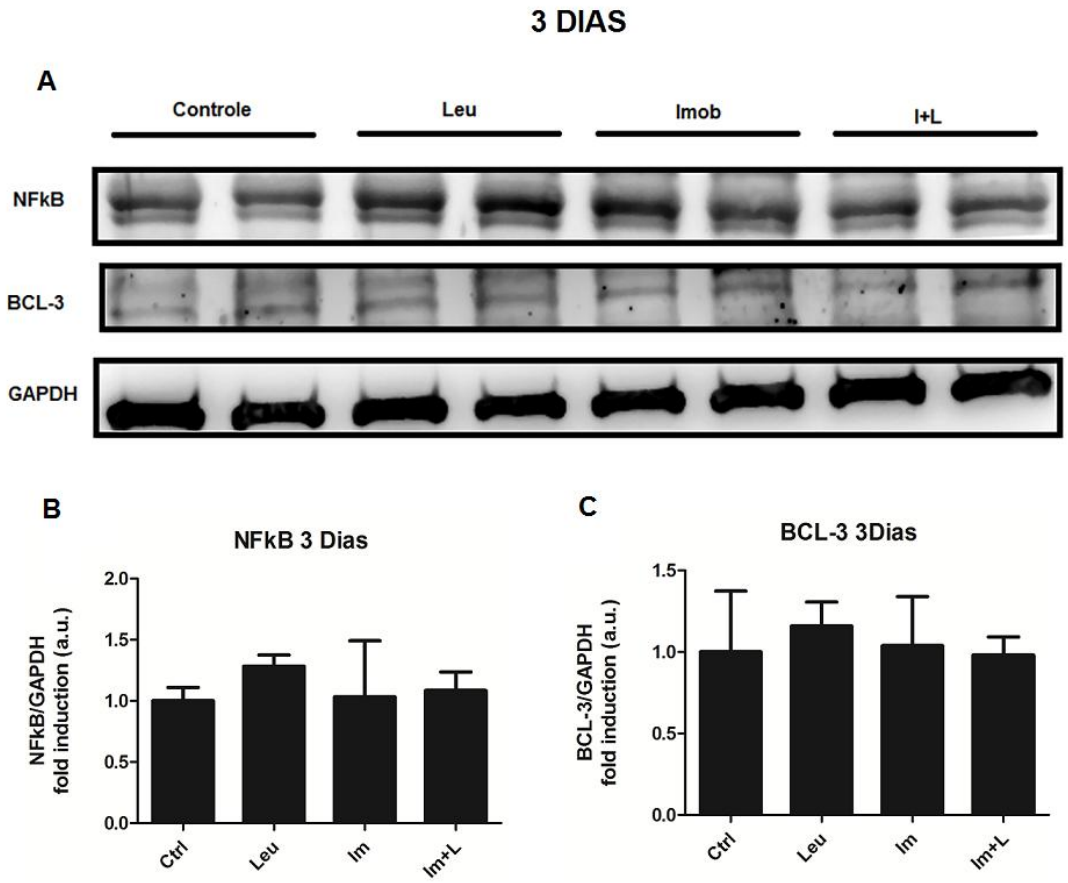

Figura 13 - Representação da análise da expressão proteica e densitométrica de NFkB (A e B) e de BCL-3 (A e C) para os grupos estudados em 3 dias de imobilização e suplementação de leucina. GAPDH foi utilizado como controle interno. As densitometrias são dadas em unidades arbitrarias (a.u.). (n=5).

4.5 Localização celular de NFkB e BCL-3

NFkB e BCL-3, são fatores que tem sua principal atividade no núcleo, podendo estar presentes também no citoplasma, desta forma, nós avaliamos a localização celular destes fatores em nossos grupos experimentais, e para isso usamos a técnica de imunofluorescência, em um experimento de dupla-marcação, como mostram as Figuras 14 e 15. Os resultados mostraram que a localização celular não foi alterada entre os grupos em 1 e 3 dias de imobilização/suplementação de leucina, da mesma forma que não obtivemos modulações na expressão proteica dessas proteínas.

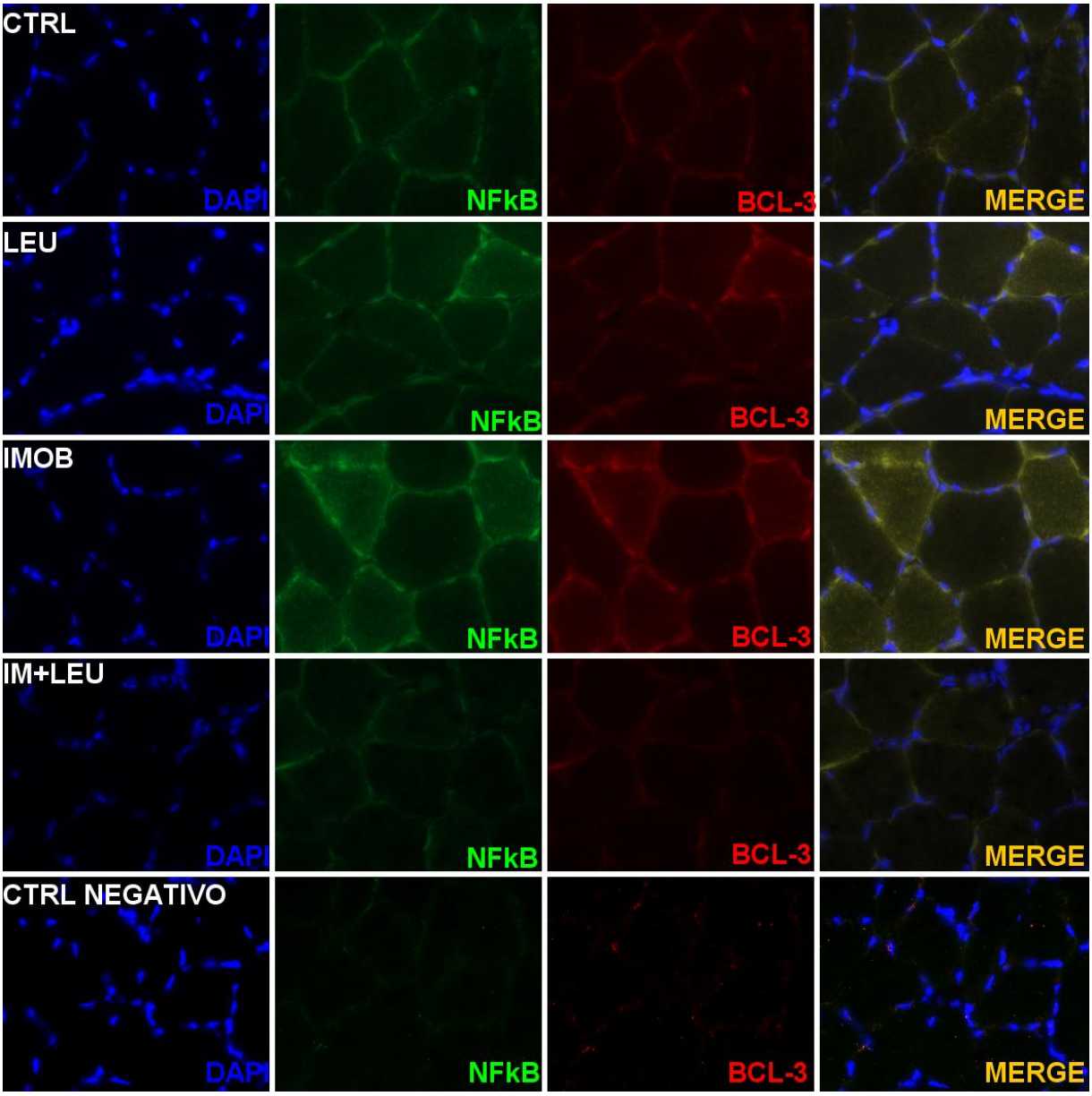

Figura 14 – Representação do ensaio de imunofluorescência para determinação da localização celular de NFkB (verde) e BCL-3 (vermelho) durante imobilização e/ou suplementação com leucina no período de 1 dia. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

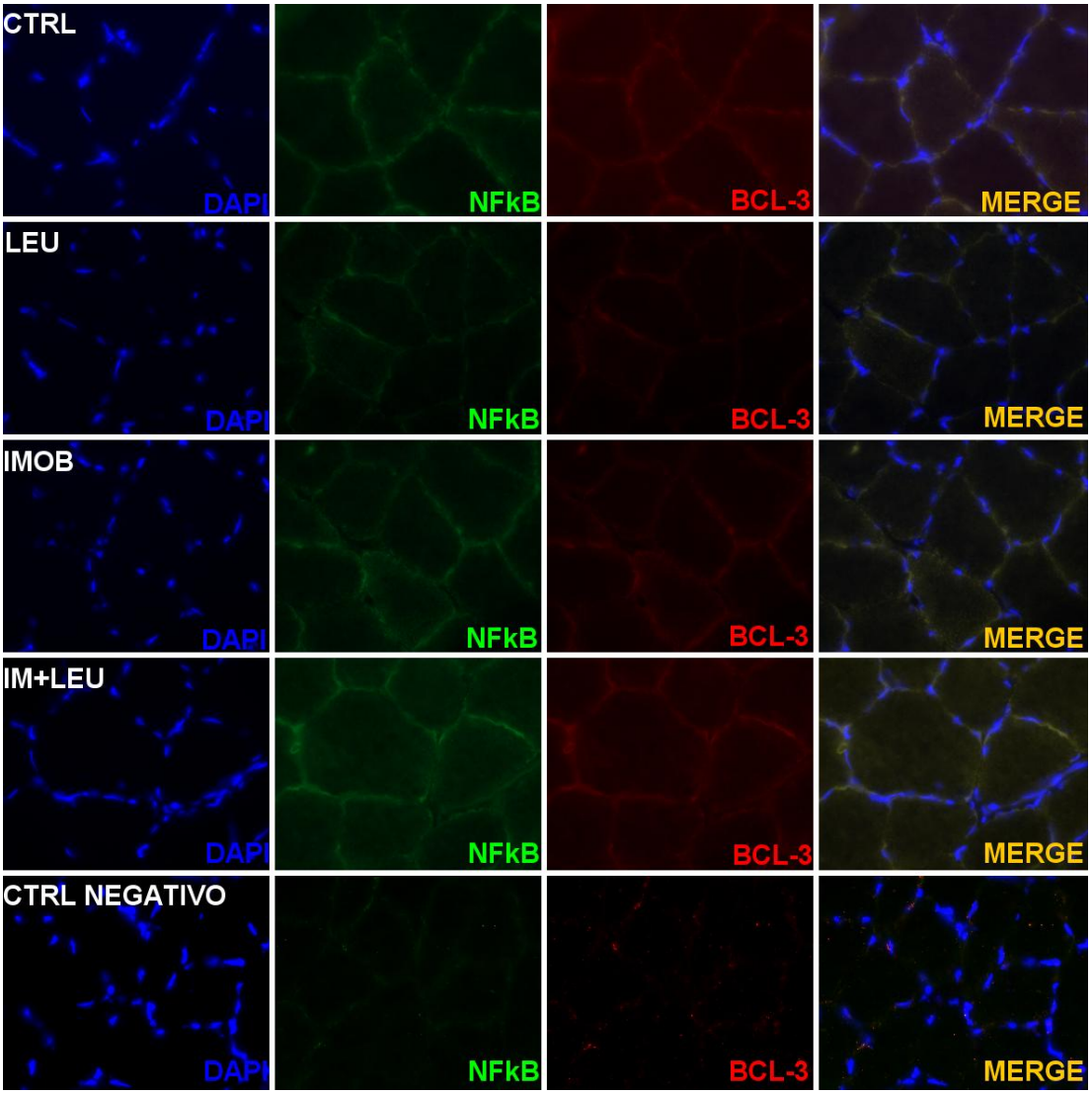

Figura 15 - Representação do ensaio de imunofluorescência para determinação da localização celular de NFkB (verde) e BCL-3 (vermelho) durante imobilização e/ou suplementação com leucina no período de 3 dias. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

5 DISCUSSÃO

A literatura tem mostrado a importância da manutenção da massa muscular (1, 2). Utilizando um modelo atrófico já estabelecido (32, 66), buscamos investigar mecanismos envolvidos na ação anti-atrófica de leucina, enfatizando os processos deflagrados pela via GSK-3β. Nesse sentido, inicialmente não encontramos diferença na massa dos músculos utilizados em nossos experimentos durante tratamento com suplementação de leucina em 1 e 3dias (Tabela 5). Isso pode ser explicado devido ao fato de que em roedores, as alterações morfométricas do tecido são tipicamente visíveis cerca de 7 dias após o início da atrofia (31).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstram que o efeito protetor de leucina sobre a massa muscular, se dá após 7 dias de imobilização em ratos, porém, a maioria dos mecanismos celulares/moleculares desencadeantes do processo atrófico, como a expressão dos atrogenes, ocorre nos primeiros dias de imobilização (32). Desta forma, em nosso estudo, nós abordamos o efeito da leucina em curtos períodos de tempo, a fim de identificar com mais facilidade mecanismos iniciais responsáveis pelo efeito anti-atrófico deste aminoácido no músculo esquelético.

5.1 Papel da suplementação de leucina na via GSK3-β e Wnt/β-Catenina durante o processo de atrofia muscular por imobilização

Nossos resultados demonstram que a suplementação de leucina pode impedir a ativação de GSK-3β durante a imobilização e promover a translocação nuclear de β-Catenina.

GSK3-β é uma proteína chave capaz de regular múltiplos processos celulares, incluindo síntese de glicogênio, síntese proteica e transcrição de genes. A função primária da GSK3-β no músculo esquelético é regular o metabolismo do glicogênio por meio da desativação da síntese de glicogênio. Consequentemente, GSK3-β tem sido fortemente associada ao programa atrófico no músculo esquelético através do envolvimento da transcrição de Atrogin-1 (9). Em nossas primeiras análises observamos que a forma inativa de GSK3-β (fosforilada) é

reduzida nos animais apenas imobilizados com 1 dia, e que esta redução foi atenuada com a suplementação de leucina, indicando assim que este aminoácido pode agir direta ou indiretamente somente na atividade de GSK3-β, uma vez que não observamos alterações na expressão gênica (Figura 3) ou da fração proteica total (Figura 4), sugerindo que o estado de fosforilação é de fato o principal regulador da ação de GSK3-β no contexto atrófico. Essa regulação que a via de GSK3-β sofre na suplementação de leucina, já foi vista em outro modelo de atrofia. Em 2008, Schakmane colaboradores (41) observaram que durante a atrofia muscular induzida por glicocorticóides, os níveis de expressão proteica de GSK3-β fosforilada foram reduzidos, assim como, os níveis proteicos de β-Catenina. Também já foi visto que a incubação de mioblastos com leucina durante 3 minutos foi capaz de inativar GSK3-β (67). Em outro contexto, Coeffier e colaboradores (68) demonstraram que durante a suplementação enteral de leucina em humanos, têm-se uma diminuição da atividade do proteassoma na mucosa duodenal, além do aumento da proliferação celular através da via PI3K/AKT/GSK3-β/β-Catenina. Em alguns outros estudos, a inibição de GSK3-β pôde ter efeito benéfico ou conservador, como na lesão por isquemia/reperfusão (69) e na colite (70).Por outro lado, o tratamento com 3 dias de imobilização, nem GSK3-β é modulado nem a leucina é capaz de regular a função GSK3-β (Figuras 3 e 5), somando estes dados com os dados encontrados na literatura, a atividade e a modulação de GSK3-β por leucina, ocorre somente em um curto período de tempo.

Estes resultados nos estimularam a explorar elementos que podem estar sendo modulados com a repressão de GSK3-β durante a suplementação de leucina, desta forma, analisamos β-Catenina.

Já é bem conhecido que GSK3-β pode inibir a via Wnt/β-Catenina, ao promover a fosforilação e degradação de β-Catenina, e quando GSK3-β está em sua forma fosforilada, β-Catenina se acumula no citoplasma e transloca-se para o núcleo, ativando seus genes alvos (33, 35, 71), porém não existem estudos descrevendo os efeitos da leucina sob a via Wnt/β-Catenina, especialmente envolvendo a suplementação deste aminoácido. Em nossos resultados, vimos que tanto a suplementação de leucina, quanto durante atrofia, não modulam a expressão gênica de β-Catenina (Figura 6), no entanto, mostramos que um gene alvo clássico de β-Catenina, C-Jun, foi induzido com a suplementação de leucina durante 1 e 3 dias de tratamento (Figura 7), desta forma indicando que este

aminoácido pode modular e ativar β-Catenina com impacto no núcleo, o que pode ser visto através da abordagem de marcação nuclear realizada com microscópio confocal, que confirma que a β-Catenina é concentrada no núcleo de uma maneira dependente de leucina. Recentemente foi visto que C-Jun participa do complexo de ligação que é capaz de aumentar a estabilidade de β-Catenina no núcleo (65), o que pode estar diretamente relacionado com a translocação nuclear de β-Catenina, visto tanto através da Imunofluorescência, nos animais suplementados com leucina com 1 e 3 dias de tratamento (Figuras 8 e 9, setas brancas, respectivamente), quanto na expressão proteica dos compartimentos citoplasmático e nuclear de β-Catenina (Figura 11 A, B e C).

Embora não seja claro neste ponto, o mecanismo pelo qual se dá o aumento da localização nuclear de β-Catenina conduzida por leucina, é possível que a diminuição da atividade de GSK3-β por leucina ocasione a instabilidade entre a ligação de β-Catenina/E-Cadherina, liberando β-Catenina da membrana para sinalização nuclear. De fato, um trabalho anterior mostrou que GSK3-β pode fosforilar resíduos de serina no domínio citoplasmático de Caderina (Ser684, Ser686 e Ser692), criando estabilidade adicional muito forte para a interação E-Caderina/β-Catenina (72-74). Outra possibilidade que pode interferir na estabilidade de β-Catenina/E-Cadherina depende da atividade de certas metaloproteases, como ADAM10. ADAM10 é capaz de reduzir a estabilidade das adesões celulares, aumentando a disponibilidade de β-Catenina para a sinalização nuclear (75, 76). A ligação entre GSK3-β e β-Catenina em outros modelos envolvendo remodelação da massa muscular esquelética foi abordada e emite resultados discutíveis. Usando um modelo de sobrecarga, Armstrong e colaboradores mostraram um forte aumento no GSK3-β total e um aumento inesperado dos níveis de β-Catenina. Os autores sugerem que os níveis aumentados de β-Catenina podem ser ativados por um mecanismo independente de GSK3-β em modelos de hipertrofia do músculo esquelético (77).

Outro interessante papel de β-Catenina é agir como um inibidor da NFkB no citoplasma, um mecanismo que é pouco conhecido durante o processo de atrofia muscular (42). Em nosso trabalho, nós formulamos a hipótese de um novo mecanismo de controle de β-Catenina, através da suplementação de leucina, e este efeito pode estar envolvido com a inibição de NFkB, durante a imobilização ou

mesmo agir em condições de normalidade, como se faz supor que a leucina por si só também tem um efeito modulatório em β-Catenina.

5.2 Papel da suplementação de leucina na via NFkB (p50) /BCL-3 durante o processo de atrofia muscular por imobilização

Sabe-se que GSK3-β pode fosforilar o p105, que após o processamento para p50 constitui uma subunidade de NFkB (60). Portanto, GSK3-β participa na estabilização do NFkB, um fator conhecido por ativar o programa atrófico (56).

A maioria dos trabalhos com NFkB, envolvem a ativação de sua via canônica formada pelo heterodímero p65-p50 (47-49). Contudo, recentes achados vêm apontando para a importância da via não-canônica em diversos processos celulares, especialmente durante a atrofia muscular em modelos de desuso (45, 55, 61). Estes trabalhos sugerem uma via alternativa para indução do atrogene MuRF-1 durante o processo de atrofia, em que sua transcrição envolve a translocação do homodímero de p50 e co-ativação deste complexo através BCL-3 (55), este último, desempenhando um papel duplo, inibindo a translocação de p50 para o núcleo (52), e em seguida participando de sua ativação, quando este se encontra no núcleo, um processo importante, uma vez que a deleção destes fatores pode atenuar o processo atrófico (56).

Em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, destacamos a capacidade anti-atrófica da suplementação com leucina em animais imobilizados em que este aminoácido pôde atenuar a perda de massa muscular e ainda reprimir a transcrição dos atrogenes (32). Para compreender o mecanismo pelo qual leucina faz estes efeitos, neste trabalho sugerimos que parte deste efeito, pode estar na repressão da via GSK-3β/β-Catenina, e que essa repressão pode ocorrer através da subseqüente diminuição da via NFkB (p50)/BCL-3.

Já foi visto na literatura, que no câncer de Cólon, a inibição de GSK3-β através de LiCl, foi capaz de alterar a atividade de NFkB por meio de β-Catenina (78). Duan e colaboradores mostraram que durante a inflamação bacteriana induzida, a estabilização de β-Catenina, através GSK3-β foi capaz de reprimir a ativação de NFkB (79). Em nosso trabalho, decidimos abordar se a expressão

proteica de NFkB e BCL-3, bem como sua localização celular, são alteradas pela imobilização e suplementação com leucina, uma vez que, tanto a imobilização, quanto a suplementação com leucina, foram capazes de regular a localização celular de β-Catenina. Nossos resultados não mostraram alterações significativas na expressão proteica de NFkB e BCL-3 (Figuras12 e 13), nem na localização celular entre todos os grupos abordados (Figuras 14 e 15) em 1 e 3 dias de tratamento, sugerindo que o NFkB e BCL-3 não estão diretamente envolvidos em mecanismos iniciais que ocorram durante a atrofia muscular esquelética conduzida pela imobilização, além disso, a técnica de imunofluorescência, para análise da localização celular de NFkB e BCL-3 no músculo esquelético, ainda não é claramente descrita na literatura. Wu e colaboradores, demonstraram que a atividade do promotor de NFkB é necessária para a ativação de MuRF1, durante a atrofia muscular, em modelo de suspensão de cauda, apontando um severo aumento de NFkB após 5 dias de imobilização (45). Em trabalho publicado em 2002, pesquisadores induziram a atrofia em músculos sóleo de ratos, através de suspensão de cauda durante 7 dias, e mostraram que esse modelo atrófico envolve a atividade da via NFkB/BCL-3 (55). Por outro lado, em outro modelo experimental, onde foi utilizado um modelo de inflamação pulmonar aguda, a fim de investigar se a degradação de proteínas pela via UPS e a ativação da via NFkB são necessários para atrofia do músculo diafragma, mostrou a ativação via NFkB e um aumento da via de degradação, resultando em atrofia do músculo diafragma nos tempos de 1 e 2 dias após inflamação induzida do pulmão (80). Em nosso modelo experimental, não observamos a modulação da expressão proteica de NFkB nos tempos estudados. Diante dessas evidências, deve-se destacar que o NFkB provavelmente está envolvido na atrofia dependente da imobilização em pontos de tempo mais longos, assim sugerimos que os estudos em tempos de 1 e 3 dias, ainda não tenham ativado a via NFkB/BCL-3.

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

1. Lieber RL. Skeletal Muscle - Structure, Function and Plasticity. Second ed. Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins; 2002.

2. Junqueira LCC, J. Histologia Básica. Tenth ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2004.

3. Gartner LP, Hiatt JL. Color atlas of histology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990.

4. Castro-Ferreira R, Fontes-Carvalho R, Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF. The role of titin in the modulation of cardiac function and its pathophysiological implications. Arq Bras Cardiol. 2011 Apr;96(4):332-9.

5. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. Med Hypotheses. 2007;69(2):310-21.

6. Hall JEG, A. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

7. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Leger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. Pflugers Arch. 2011 Mar;461(3):325-35.

8. Fareed MU, et al. Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogin-1/MAFbx and MuRF1 expression. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006 Jun;290(6):R1589-97.

9. Verhees KJ, et al. Glycogen synthase kinase-3beta is required for the induction of skeletal muscle atrophy. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 Nov;301(5):C995-C1007.

10. Goll DE, Dayton WR, Singh I, Robson RM. Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. J Biol Chem. 1991 May 5;266(13):8501-10.

11. Bodine SC, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.

---

*De acordo com:
International Comittee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniforms requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Availabel from http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

12. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 4;98(25):14440-5.

13. Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005 Jun;288(6):R1423-31.

14. Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. Biochem J. 1986 Feb 15;234(1):237-40.

15. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. 1998;67:425-79.

16. Kaiser P, Huang L. Global approaches to understanding ubiquitination. Genome Biol. 2005;6(10):233.

17. Crossland H, Constantin-Teodosiu D, Gardiner SM, Constantin D, Greenhaff PL. A potential role for Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle. J Physiol. 2008 Nov 15;586(Pt 22):5589-600.

18. Yamazaki Y, et al. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. Biochem J. 2010 Apr 1;427(1):171-8.

19. Zheng B, Ohkawa S, Li H, Roberts-Wilson TK, Price SR. FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. FASEB J. 2010 Aug;24(8):2660-9.

20. Machida S, Booth FW. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. Medicine and science in sports and exercise. 2004 Jan;36(1):52-9.

21. Vanitallie TB. Frailty in the elderly: contributions of sarcopenia and visceral protein depletion. Metabolism: clinical and experimental. 2003 Oct;52(10 Suppl 2):22-6.

22. Tom A, Nair KS. Assessment of branched-chain amino Acid status and potential for biomarkers. The Journal of nutrition. 2006 Jan;136(1 Suppl):324S-30S.

23. Shimomura Y, et al. Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. The Journal of nutrition. 2006 Jan;136(1 Suppl):250S-3S.

24. Moberg M, et al. Activation of mTORC1 by leucine is potentiated by branched-chain amino acids and even more so by essential amino acids following resistance exercise. Am J Physiol Cell Physiol. 2016 Jun 1;310(11):C874-84.

25. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. J Nutr. 2005 Mar;135(3):376-82.

26. Bolster DR, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. J Nutr. 2004 Jul;134(7):1704-10.

27. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. J Nutr. 2000 Feb;130(2):139-45.

28. Koopman R, et al. Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men. Am J Clin Nutr. 2006 Sep;84(3):623-32.

29. Rieu I, et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. J Physiol. 2006 Aug 15;575(Pt 1):305-15.

30. Tipton KD, Elliott TA, Ferrando AA, Aarsland AA, Wolfe RR. Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. Appl Physiol Nutr Metab. 2009 Apr;34(2):151-61.

31. Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. Amino Acids. 2009 Oct;37(4):609-16.

32. Baptista IL, et al. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. Muscle & nerve. 2010 Jun;41(6):800-8.

33. Aschenbach WG, et al. Regulation of dishevelled and beta-catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced GSK-3beta signaling pathway. American journal of physiology. 2006 Jul;291(1):E152-8.

34. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.

35. Li C, et al. Sensitization of glioma cells to tamoxifen-induced apoptosis by Pl3-kinase inhibitor through the GSK-3beta/beta-catenin signaling pathway. PLoS One. 2011;6(10):e27053.

36. Kockeritz L, Doble B, Patel S, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3--an overview of an over-achieving protein kinase. Curr Drug Targets. 2006 Nov;7(11):1377-88.

37. Ridgeway AG, Petropoulos H, Wilton S, Skerjanc IS. Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin. J Biol Chem. 2000 Oct 20;275(42):32398-405.

38. Leal ML, et al. Effect of different resistance-training regimens on the WNT-signaling pathway. Eur J Appl Physiol. 2011 Oct;111(10):2535-45.

39. Sakamoto K, Arnolds DE, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 25;319(2):419-25.

40. Tanaka S, Terada K, Nohno T. Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells. J Mol Signal. 2011 Oct 05;6:12.

41. Schakman O, et al. Role of Akt/GSK-3beta/beta-catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. Endocrinology. 2008 Aug;149(8):3900-8.

42. Deng J, et al. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. Cancer Cell. 2002 Oct;2(4):323-34.

43. Umar S, Sarkar S, Wang Y, Singh P. Functional cross-talk between beta-catenin and NFkappaB signaling pathways in colonic crypts of mice in response to progastrin. J Biol Chem. 2009 Aug 14;284(33):22274-84.

44. Liu K, et al. Defective CFTR- beta-catenin interaction promotes NF-kappaB nuclear translocation and intestinal inflammation in cystic fibrosis. Oncotarget. 2016 Aug 31.

45. Wu CL, Cornwell EW, Jackman RW, Kandarian SC. NF-kappaB but not FoxO sites in the MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. Am J Physiol Cell Physiol. 2014 Apr 15;306(8):C762-7.

46. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998;16:225-60.

47. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol. 1996;14:649-83.

48. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009 Dec;1(6):a001651.

49. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. Cell. 1996 Oct 4;87(1):13-20.

50. Siebenlist U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. Biochim Biophys Acta. 1997 Feb 22;1332(1):R7-13.

51. Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. Molecular cell. 2002 Mar;9(3):625-36.

52. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. Mol Cancer. 2013;12:86.

53. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. Science. 1988 Oct 28;242(4878):540-6.

54. Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. Cell Res. 2011 Jan;21(1):71-85.

55. Hunter RB, et al. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. FASEB J. 2002 Apr;16(6):529-38.

56. Hunter RB, Kandarian SC. Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. J Clin Invest. 2004 Nov;114(10):1504-11.

57. Wulczyn FG, Naumann M, Scheidereit C. Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B. Nature. 1992 Aug 13;358(6387):597-9.

58. Herrington FD, Nibbs RJ. Regulation of the Adaptive Immune Response by the IkappaB Family Protein Bcl-3. Cells. 2016;5(2).

59. Viatour P, et al. GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. Molecular cell. 2004 Oct 8;16(1):35-45.

60. Demarchi F, Bertoli C, Sandy P, Schneider C. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates NF-kappa B1/p105 stability. J Biol Chem. 2003 Oct 10;278(41):39583-90.

61. Jackman RW, Cornwell EW, Wu CL, Kandarian SC. Nuclear factor-kappaB signalling and transcriptional regulation in skeletal muscle atrophy. Exp Physiol. 2013 Jan;98(1):19-24.

62. Jackman RW, Wu CL, Kandarian SC. The ChIP-seq-defined networks of Bcl-3 gene binding support its required role in skeletal muscle atrophy. PLoS One. 2012;7(12):e51478.

63. Lee D, Goldberg AL. Muscle Wasting in Fasting Requires Activation of NF-kappaB and Inhibition of AKT/Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) by the Protein Acetylase, GCN5. J Biol Chem. 2015 Dec 18;290(51):30269-79.

64. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. EMBO J. 2012 Jun 13;31(12):2714-36.

65. Gan XQ, et al. Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. J Cell Biol. 2008 Mar 24;180(6):1087-100.

66. Baptista IL, Silvestre JG, Silva WJ, Labeit S, Moriscot AS. FoxO3a suppression and VPS34 activity are essential to anti-atrophic effects of leucine in skeletal muscle. Cell Tissue Res. 2017 Apr 24.

67. Peyrollier K, Hajduch E, Blair AS, Hyde R, Hundal HS. L-leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of system A amino acid transport. Biochem J. 2000 Sep 1;350 Pt 2:361-8.

68. Coeffier M, et al. Influence of leucine on protein metabolism, phosphokinase expression, and cell proliferation in human duodenum1,3. Am J Clin Nutr. 2011 Jun;93(6):1255-62.

69. Cuzzocrea S, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. Br J Pharmacol. 2006 Nov;149(6):687-702.

70. Whittle BJ, et al. Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. Br J Pharmacol. 2006 Mar;147(5):575-82.

71. Zheng H, et al. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates Snail and beta-catenin expression during Fas-induced epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. Eur J Cancer. 2013 Aug;49(12):2734-46.

72. Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. Cell. 2001 May 04;105(3):391-402.

73. Choi HJ, Huber AH, Weis WI. Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. J Biol Chem. 2006 Jan 13;281(2):1027-38.

74. Sampietro J, et al. Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/Tcf4 complex. Molecular cell. 2006 Oct 20;24(2):293-300.

75. Maretzky T, et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 28;102(26):9182-7.

76. Reiss K, et al. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. EMBO J. 2005 Feb 23;24(4):742-52.

77. Armstrong DD, Esser KA. Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Oct;289(4):C853-9.

78. Deng J, et al. Crossregulation of NF-kappaB by the APC/GSK-3beta/beta-catenin pathway. Mol Carcinog. 2004 Mar;39(3):139-46.

79. Duan Y, et al. beta-Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation. Lab Invest. 2007 Jun;87(6):613-24.

80. Haegens A, et al. NF-kappaB activation and polyubiquitin conjugation are required for pulmonary inflammation-induced diaphragm atrophy. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012 Jan 01;302(1):L103-10.