



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DO RESVERATROL NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DESNERVADOS**

IVANILDO INÁCIO DA SILVA JÚNIOR

RECIFE-PE

2016

IVANILDO INÁCIO DA SILVA JÚNIOR

**EFEITO DO RESVERATROL NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DESNERVADOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira

Recife, 22 de fevereiro de 2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva Júnior, Ivanildo Inácio da

Efeito do resveratrol no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos desnevarados / Ivanildo Inácio da Silva Júnior. – Recife, 2016.

64 f.: il.

Orientador: Eduardo Carvalho Lira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2016.

Inclui referências e anexo

1. Sistema musculoesquelético 2. Atrofia muscular I. Lira, Eduardo Carvalho (orient.) II. Título.

611.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-449

IVANILDO INÁCIO DA SILVA JÚNIOR

**EFEITO DO RESVERATROL NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM
MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS DESNERVADOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado em: 22 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMIDORA

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE
Orientador

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes
Departamento de Anatomia – UFPE
Titular Externo 1

Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE
Titular Externo 2

Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE
Titular Interno 1

Profa. Dra. Cristina de Oliveira Silva
Cento Acadêmico de Vitória (CAV) – UFPE
Suplente Interno 1

Profa. Dra. Manuella Batista de Oliveira Hornsby
Departamento de Nutrição – UFPE
Suplente Externo 1

*Dedico esta dissertação a todos que
contribuíram para a sua realização,
especialmente aos meus pais e amigos da
ciência, pelo apoio indescritível e
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Sou grato ao meu orientador, o Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira, por acreditar na minha competência desde o começo, por me ensinar inúmeras técnicas e dedicar seu tempo em me indicar o caminho das pedras no âmbito científico. Sua capacidade didática e argumentativa serão referência em toda minha vida profissional. Acredito que houve um grande desenvolvimento profissional e pessoal durante o período que estive sob sua orientação, e sem dúvidas, sua competência foi imprescindível para tal. Não posso me esquecer das necessárias reprimendas, que por muitas vezes me levaram a reflexão e melhoria de desempenho no trabalho.

Agradeço aos alunos que colaboraram para a realização dos experimentos aqui descritos, em especial a Flávia Albuquerque e Amanda Albuquerque, que estiveram sempre ao meu lado quebrando a cabeça para padronizar as técnicas, assim como durante os longos dias de experimento. Nunca vou esquecer dos bons e maus momentos que passamos, e sem dúvida as histórias que ocorriam durante aquelas duas horas de espera entre as incubações ficarão registradas pra sempre em minha memória.

Tenho de agradecer ao HB-20 de Flávia Albuquerque, sem dúvida ele fez muita falta no período em que ela esteve no CsF. Brincadeiras à parte, tenho um grande apreço e carinho por esta menina, e torço para que ela alcance todos os seus objetivos.

Não posso esquecer do meu grande parceiro Humberto Barbosa, o ser humano que melhor define o termo “gente boa” e, sem dúvida, o cara mais “deboísta” que conheço. Os momentos de trabalho nunca eram silenciosos na sua presença (gostaria de lembrar que o processo de pipetagem é um trabalho silencioso e solitário), pois sempre havia uma boa história para contar, além disso, ele é craque em fazer “aquela piada de tio”. Por fim, sua força de vontade para superar seus limites o tempo todo é muito admirável.

Por toda a minha vida lembrarei de Jailson Nunes (nosso querido Jájá) como referência de competência e dedicação ao trabalho/estudo. Nossos almoços sempre foram regados a divertidas e produtivas conversas, das quais aprendi diversas lições de vida. Além disso, este senhor será um “dotô” de excelência, já o indico com antecedência. Sentirei falta das nossas longas discussões sobre medicina/fisiopatologia.

Uma outra referência é Dijannah Cota, ela é aquele tipo de pessoa que vai te conquistando aos poucos e depois torna-se imprescindível. Apesar de você não acreditar em

meus elogios, saiba que são verdadeiros. Você é uma pessoa de vasto conhecimento e competência no trabalho, sempre disponível a ajudar. Lhe agradeço por me ensinar diversos cálculos e aquele “pulo do gato” que por vezes me salvaram a vida.

Agradeço a Profa. Dra. Isis Kettelhut que aceitou meu estágio e me orientou em meus experimentos na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Sou extremamente grato por todos os ensinamentos, momentos de preocupação e discussões de resultado promovidas por cada aluno do Laboratório de Controle do Metabolismo, especialmente Silva Paula-Gomes e Dawit Gonçalves que me acompanharam em cada momento. Além disso, não posso esquecer do imprescindível auxílio promovido pela Neusa Zanon, provavelmente a principal responsável pelo sucesso dos experimentos realizados.

Preciso agradecer a Profa. Dra. Dayane Gomes que através dos mais diferentes causos nos ensina e dá soluções que foram importantes durante o processo de confecção deste trabalho. Tenho de agradecer também aos seus filhos científicos (alunos orientados por ela), que inclui Sheila Costa, Flávio Monteiro, Diego Oliveira e Joaquim Vieira.

Contudo, preciso agradecer as “meninas da neuro”, que incluem a doidinha e sorridente (Ricielle Lopes), a pesquisadora nível internacional (Alinny Issac), a linda e fofa (Giselle Machado) e o intencionalmente chato/engraçado (Emerson Alexandre).

Não posso esquecer da Heloisa Mirelle e Mariana Séfora, pelas quais tenho muito carinho e desejo boas “ondas de depressão”.

Agradeço ao colega Jairo Teixeira, um exemplo de dedicação a ciência. Em paralelo, não esquecerei os almoços cheios de “resenha” organizados pelo “cara dos peixes” (Luciano Clemente).

Agradeço a zueira, pois, “the zoeira never ends”. Por falar nisso, agradeço a Alicia Soares pelas nutritivas refeições na Subway, afinal, porque não?

Infelizmente não conseguirei lembrar e agradecer devidamente a todos os diversos amigos e companheiros que compartilharam e contribuíram para meu engrandecimento pessoal e profissional durante este período, por isso, desde já pelo desculpas.

Palavra alguma seria suficiente para agradecer aos meus pais, que são as pessoas diretamente responsáveis por cada uma de minhas conquistas e que em nenhum momento mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Além disso, são a minha referência base em qualquer caminho que sigo.

Agradeço aos animais que cederam a vida durante os experimentos e sem os quais não haveria resultado algum

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE (FACEPE), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro dedicado a presente pesquisa, sem a qual a mesma não se realizaria.

“Se pude enxergar mais longe, foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”.

(Isaac Newton)

RESUMO

O intenso catabolismo proteico na musculatura esquelética está diretamente relacionado ao aumento da morbimortalidade em situações clinicamente importante, como a sepse, diabetes, câncer e desuso. Embora se saiba que a degradação excessiva de proteínas musculares represente o principal mecanismo para o desenvolvimento da atrofia muscular, infelizmente, ainda não há alternativas terapêuticas eficazes para prevenir ou atenuá-la. Neste contexto, estudos mostraram que o resveratrol reduz a proteólise, contudo o mecanismo de ação deste fenol ainda não está completamente esclarecido. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do resveratrol sobre o metabolismo de proteínas no músculo esquelético de ratos sham e desnervados, assim como investigar o mecanismo de ação deste polifenol. A desnervação motora bilateral (DEN) foi induzida por secção do nervo isquiático em ratos Wistar machos (± 80 g). 3 (três) dias após a cirurgia, a síntese e degradação proteica foi estimada no músculo *extensor digitorum longus* (EDL) incubado na presença e ausência do resveratrol (100 μ M). A presença da tirosina liberada pelo músculo no meio de incubação foi usada como marcador do metabolismo proteico, assim como foi realizada a análise da expressão gênica e proteica por *RT-PCR* e *Western Blot*, respectivamente. A desnervação motora aumentou a proteólise total (62%) em músculo EDL, que foi acompanhado pelo aumento da atividade do sistema ubiquitina-proteassoma (UbP, 270%) e dependente de Ca^{2+} (41%). O resveratrol reduziu a proteólise total em músculos sham (39%) e DEN (28%), em parte por reduzir a hiperatividade de UbP (36%) e dependente de Ca^{2+} (28%). Contudo, a ação antiproteolítica do resveratrol foi eliminada quando PKA foi inibida farmacologicamente com H-89. O resveratrol reduziu a expressão gênica de Atrogin1 em músculo sham e desnervam, enquanto que reduziu MuRF1 apenas em músculo sham. Além disso, o resveratrol reduziu fosforilação de ERK1/2, Akt, FoxO1, por outro lado, aumentou a fosforilação da proteína S6, AMPK e CREB. Esses dados indicam que o resveratrol exerce ações antiproteolíticas sobre a musculatura esquelética em condições normais e atroficas, além disso, seu mecanismo de ação depende da ativação de PKA e envolvem a modulação de ERK, AMPK e S6K.

Palavras-chaves: Resveratrol. Desnervação. Atrofia. Proteólise.

ABSTRACT

The intense protein catabolism in skeletal muscle is directly related to morbidity and mortality increased in clinically important situations, such as sepsis, diabetes, cancer and disuse. Although it is known that excessive degradation of muscle protein represents the major mechanism for the development of muscular atrophy, unfortunately, there are still no effective alternative treatments to prevent or attenuate it. In this context, studies have shown that resveratrol reduces proteolysis, however the mechanism of action of this phenol is still not fully understood. This study aimed to evaluate the effect of resveratrol on the protein metabolism in skeletal muscle of sham and denervated rats, as well as investigate the mechanism of action of this polyphenol. Bilateral motor denervation (DEN) was induced by sciatic nerve section in rats Wistar (± 80 g). After 3 days, the protein synthesis and degradation was estimated in incubation of EDL muscle under resveratrol (100 μ M) presence and absence. The presence of released tyrosine by the muscle in the medium incubation was used as marker protein metabolism and mRNA and protein expression analysis was performed by RT-PCR and Western Blot, respectively. The motor denervation increased total proteolysis (62%) in EDL muscle, which was accompanied by increased activity of the ubiquitin-proteasome system (UBP, 270%) and Ca^{2+} (41%). Resveratrol reduced total sham proteolysis in muscle (39%) and DEN (28%), in part by reducing the hyperactivity UBP (36%) and Ca^{2+} (28%). However, antiproteolítica action of resveratrol was eliminated when PKA was inhibited pharmacologically. Resveratrol reduced the gene expression Atrogin1 in muscle sham and denervated, while reduced MuRF1 only sham muscle. Furthermore, this fitolexina reduced phosphorylation of ERK1/2, Akt, FoxO1, on the other hand, phosphorylation increased of the S6 protein, AMPK and CREB. These data indicate that resveratrol exerts antiproteolytic actions on skeletal muscle in normal and atrophic conditions, moreover, its mechanism of action depends on the activation of PKA and involve modulation of ERK, AMPK and S6K.

Key-words: Resveratrol. Denervation. Atrophy. Proteolysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MACROAUTOFAGIA, PRINCIPAL PROCESSO PELO QUAL MACROMOLÉCULAS CELULARES E ORGANELAS SÃO ENTREGUES AO LISOSSOMA PARA DEGRADAÇÃO.....	19
FIGURA 2 – AÇÃO DAS CALPAÍNAS NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.	21
FIGURA 3 – A ESTRUTURA DO PROTEASSOMA 26S.....	22
FIGURA 4 – AS TRÊS ETAPAS BIOQUÍMICAS DA UBIQUITINAÇÃO, ESTE PROCESSO SE REPETE ATÉ HAVER UMA CAUDA DE UBIQUITINA LIGADA AO SUBSTRATO A SER DEGRADADO.....	22
FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO TRANS- E CIS-RESVERATROL.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1 - Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E

AC - Adenilato ciclase

Akt - Proteína quinase B (ou PKB)

ANOVA – Análise de variância

AMPK - Proteína quinase dependente de AMP

Atg - Genes relacionados à autofagia

ATP - Trifosfato de adenosina

BCAA - Aminoácidos de cadeia ramificada

BSA - Albumina de soro bovino

CaMK II – Proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina

cAMP - Adenosina monofosfato cíclica

CREB - Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc

DMD - Distrofia muscular de Duchenne

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTT - Ditioneitol

E1 - Ativadora de ubiquitina

E2 - Carreadora de ubiquitina

E3 - Ubiquitina ligase

ECL - Quimioluminescência reforçada

EDL - Extensor longo dos dedos, do latim *extensor digitorum longus*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELA - Esclerose lateral amiotrófica

EPA - Ácido eicopentaenóico

Epac1 - Fator de troca 1 ativado diretamente pelo cAMP

EPG - Epicatequina galato

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

FoxO - Fator de transcrição da família forkhead BOX O

GABARAP - Proteína associada ao receptor GABAA

GATE-16 - *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*

H-89 - Inibidor de PKA

IKK - Quinase I-kB

kDa - Kilodaltons

LC3 - Proteína de cadeia leve associada ao microtúbulo

MAFBx - *Muscle atrophy Fbox*

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

mdx - Distrofia muscular com mutação no cromossomo X

mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

MuRF1 - *Muscle ring finger 1*

NF-kB - Fator nuclear kappa B

p70S6K - *p70 ribosomal protein S6 kinase*

PDE - Fosfodiesterase

PGC-1 α - Coativador gama-1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

pH - Potencial hidrogeniônico

PI3K - Fosfatidilinositol 3 quinase

PIF - Fator indutor de proteólise

PKA - Proteína quinase A

RIPA – Tampão de ensaio para radioimunoprecipitação

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RSV - Resveratrol

S6K1 - *S6 kinase1*

SDS - *Dodecil sulfato de sódio*

SIRT1 – Sirtuina 1

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Ub - Ubiquitina

UbP - Sistema ubiquitina-proteassoma

ω -3 - Ômega-3

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1.	SISTEMAS PROTEOLÍTICOS E ATROFIA MUSCULAR	18
2.1.1.	Sistema lisossomal.....	18
2.1.2.	Sistema dependente de Ca^{2+}	20
2.1.3.	Sistema ubiquitina-proteassoma	21
2.2.	PLANO ATRÓFICO	22
2.3.	DESNERVAÇÃO ATRÓFICA.....	23
2.4.	COMPOSTOS NATURAIS, METABOLISMO PROTEICO E RESVERATROL	24
3.	OBJETIVOS.....	27
3.1.	GERAL	27
3.2.	ESPECÍFICOS	27
4.	REFERÊNCIAS.....	28
5.	ARTIGO	34
6.	CONCLUSÕES.....	59
7.	ANEXO	60

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético além de ser um tecido importante para geração de força e locomoção, também é essencial à homeostase energética corporal. Representa de 45 a 50% da massa corporal e contém 90% do “*pool*” de aminoácidos livres do corpo, o que o torna o principal reservatório de proteínas do corpo (SANDSTEDT, SYMRENG, LARSSON, 1985). A regulação da massa muscular e o tamanho da fibra são reflexos da velocidade de renovação proteica que é regida por um ciclo dinâmico entre a síntese e a degradação proteica. Situações que favorecem o aumento da síntese, acompanhada, ou não, da redução da degradação de proteínas ou proteólise promovem a hipertrofia muscular, ao contrário de estímulos que favoreçam o aumento da proteólise, acompanhada, ou não, da redução na síntese proteica estabelecem um quadro de atrofia muscular. Ainda que o músculo esquelético forneça substrato energético em situações de demanda metabólica, o intenso catabolismo proteico muscular está diretamente relacionado ao aumento da morbimortalidade em situações clinicamente importantes, como a sepse, diabetes, câncer e desnervação motora (LECKER *et al.*, 1999; LECKER, GOLDBERG, MITCH, 2006).

Diversas patologias neuromusculares, como esclerose lateral amiotrófica, polineuropatias, distrofia muscular de Duchenne e injúrias na medula espinal estão associadas à diminuição da área de secção transversa, número de miofibras, conteúdo de proteínas e força muscular, além de aumento da fadigabilidade muscular, quadro caracterizado como atrofia muscular (QI *et al.*, 2014; MORESI *et al.*, 2010). Há evidências que a redução do uso muscular, assim como, durante a imobilização ortopédica, longos períodos de repouso em cama, e microgravidade enfrentada em voos espaciais favorecem a fadigabilidade muscular (SCHIAFFINO *et al.*, 1999), incluindo redução na velocidade de síntese proteica (BOOTH, SEIDER, 1979) e aumento da proteólise (TISCHLER *et al.*, 1990).

O crescente interesse científico sobre os processos que envolvem a atrofia muscular ajudaram a desvendar diferentes mecanismos moleculares envolvidos na degradação excessiva de proteínas. Entretanto, ainda não existem drogas eficazes na prevenção ou atenuação da atrofia muscular, o que torna a investigação de novas alternativas terapêuticas uma questão de saúde pública.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. SISTEMAS PROTEOLÍTICOS E ATROFIA MUSCULAR

São conhecidos diferentes sistemas proteolíticos na musculatura esquelética, entretanto os três mais extensamente estudados são: o sistema lisossomal, dependente de cálcio (Ca^{2+}) e o sistema ubiquitina-proteassoma (UbP). A atividade destes sistemas contribui para manutenção da homeostasia corporal através da liberação de aminoácidos para células apresentadoras de antígenos, degradação de proteínas com erros pós-sintéticos, reciclagem de receptores de membrana, fornecimento de substrato peptídico para produção de glicose hepática (gliconeogênese), regulação do crescimento e diferenciação celular (LECKER *et al.*, 1999; LECKER, GOLDBERG, MITCH, 2006). Entretanto, em situações patológicas há hiperativação dos sistemas proteolíticos, desta forma, contribuindo decisivamente para o aumento do catabolismo proteico, característico de condições como câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), diabetes, desnervação e sepse (LECKER, GOLDBERG, MITCH, 2006; SANDRI, 2013).

2.1.1. Sistema lisossomal

O sistema lisossomal foi o primeiro sistema proteolítico a ser descrito e é considerado o principal sistema responsável pela degradação de proteínas em células de mamífero (BECHET *et al.*, 2005). O lisossomo é uma organela especializada, delimitada por membrana, que contém em seu interior hidrolases ativas em pH ácido (pH4-5,5) (BECHET *et al.*, 2005; MIZUSHIMA, KOMATSU, 2011; SANDRI, 2013). Dentre as principais, estão as cisteína-proteases denominadas catépsinas que se apresentam em diferentes isoformas: L, B, D e H. A catépsina L é amplamente utilizada como marcadora para atrofia muscular em situações patológicas (BECHET *et al.*, 2005), uma vez que sua expressão gênica e atividade são moduladas em diferentes situações catabólicas.

Apesar de não compreendermos completamente o processo de reconhecimento do substrato alvo a ser degradado por esta organela, sabe-se que a oferta de substratos intracelulares ao lisossomo é extremamente complexa e envolve mecanismos como: microautofagia, crinofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia (BLOMMAART, LUIKEN, MEIJER, 1997).

No músculo esquelético o processo de entrega de substrato ao lisossoma ocorre principalmente através da macroautofagia (Fig. 1) (BLOMMAART, LUIKEN, MEIJER, 1997; SANDRI, 2011). Este processo se caracteriza pela formação de vesículas com

bicamada lipídica que envolvem porções específicas do citoplasma, organelas, glicogênio ou agregados proteicos (pré-autofagossomo). A formação do autofagossomo envolve a síntese de uma bicamada lipídica através da participação de pequenas proteínas de marcação semelhantes à ubiquitina denominadas LC3 (*Microtubule associated protein light chain 3*), GABARAP (*γ-aminobutyric acid receptor associated protein*), GATE 16 (*golgi associated ATPase enhancer of 16 kDa*) e gene autofágico 12 (Atg12), as quais são transferidas do sistema de conjugação às membranas em desenvolvimento, o que permite a formação da bicamada lipídica que envolverão o substrato a ser degradado e fundidos ao autofagossomo, cuja função transitória é o direcionamento do substrato ao lisossomo (LEVINE, KROEMER, 2008; MIZUSHIM *et al.*, 2008).

Diversas proteínas envolvidas nesse processo já foram descobertas e caracterizadas, constituindo uma família de proteínas codificadas por genes relacionados à autofagia (Atg), incluindo Atg3, Atg5, Atg7, Atg10, Atg12, Atg16, LC3, GABARAP e Beclina1 (homólogo mamífero de Atg6), as quais participam diretamente do processo macroautofágico (BECHET *et al.*, 2005; GUMP, THORBURN, 2011). Diante disso, estudos apontam que em situações atroficas como desnervação, jejum, câncer e diabetes *mellitus* há o aumento da expressão da catepsina L, LC3 e GAPARAAPL1 (LECKER *et al.*, 2004; SACHECK *et al.* 2006), portanto, estes genes são considerados marcadores da atividade da via lisossomal e sua hiperexpressão está associada ao aumento do fluxo autofágico.

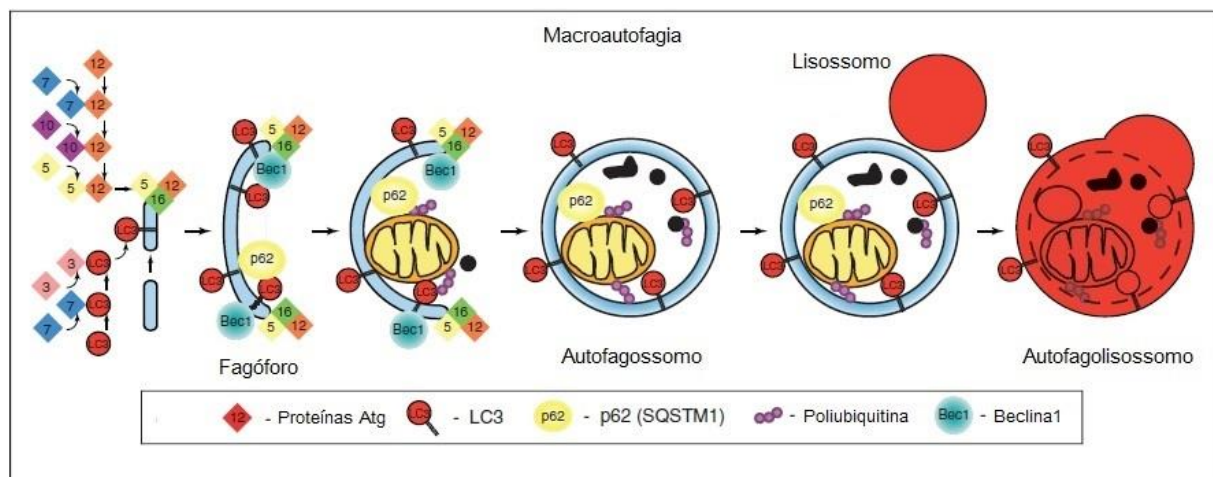


Figura 1 - Representação esquemática da macroautofagia, principal processo pelo qual macromoléculas celulares e organelas são entregues ao lisossoma para degradação (Modificado de GUMP, THORBURN, 2011).

2.1.2. Sistema dependente de Ca^{2+}

Outro sistema proteolítico importante é o sistema dependente de Ca^{2+} (Fig. 2), que está envolvido na regulação de processos biológicos complexos como apoptose, migração e proliferação celular, regulação da expressão gênica, entre outros (CARAFOLI, MOLINARI, 1998; GOLL *et al.*, 2003; COSTELLI *et al.*, 2005;). Este sistema é formado pelas calpaínas, que são cisteína-proteases ativas em pH neutro, inicialmente descritas em cérebro de roedores por Guroff (1964). Atualmente, são conhecidas pelo menos 15 isoformas diferentes pertencente à família das calpaínas (COSTELLI *et al.*, 2005). O tecido muscular expressa principalmente duas isoformas de calpaínas, μ -calpaína (calpaína 1) e m-calpaína (calpaína 2), que são respectivamente ativadas por concentrações 5-50 μM e 0,25-1mM de cálcio (Ca^{2+}) (BARTOLI, RICHARD, 2005). Mas, também expressa uma isoforma monomérica conhecida como calpaína 3 ou p94, formada por uma única subunidade de 80kDa (COSTELLI *et al.*, 2005; RAYNAUD *et al.*, 2005).

As μ e m-calpaína são formadas por heterodímeros contendo duas subunidades de cerca de 80 e 30kDa, que apresenta um domínio de ligação ao Ca^{2+} . Fisiologicamente, as concentrações citoplasmáticas de cálcio são mantidas extremamente baixas, entretanto, quando estes níveis atingem valores micro ou milimolares, as calpaínas inativas são translocadas para a membrana plasmática, onde são ativas pelo Ca^{2+} e fosfolipídios, isto é, liberando a subunidade catalítica de 80kDa (COSTELLI *et al.*, 2005). Curiosamente, este é o único sistema proteolítico que possui um inibidor endógeno, denominado calpastatina, que é uma proteína de 110 kDa estruturalmente formada por um domínio N terminal e 4 domínios inibitórios de 140 aminoácidos cada (CARAFOLI, MOLINARI, 1998). A calpastatina apresenta um sítio de fosforilação da PKA (*protein kinase A*), cuja ativação pode modular sua localização e atividade (CONG *et al.*, 1998).

Em situações caracterizadas por aumento nos níveis intracelulares de cálcio como a sepse, deservação atrofica, imobilização e distrofias musculares, causam a hiperativação deste sistema (JOFFE, SAVAGE, ISAACS, 1981; TIDBALL, SPENCER, 2000; FISHER *et al.*, 2001; WAGATSUMA, FUJIMOTO, YAMADA, 2002). Nestas situações, o sítio principal para expressão das calpaínas é a linha Z do sarcômero (FISCHER *et al.*, 2001). Além disso, foi observada sua interação com a α -actina, a principal proteína sarcomérica (YOSHIMURA *et al.*, 1986), bem como outras proteínas que constituem o sarcômero, incluindo a titina, nebulina e troponina, que são reconhecidamente substratos para estas cisteína-proteases. Considerando a localização destas proteases, aceita-se a sua participação na desorganização da citoarquitetura muscular observada durante a ativação do sistema

proteolítico dependente de Ca^{2+} (Fig. 2) (WILLIAMS *et al.*, 1999; COSTELLI *et al.*; 2005; BARTOLI, RICHARD, 2005). Portanto, as calpaínas atuam desestabilizando o sarcômero e liberando os miofilamentos para serem degradados por outras proteases.

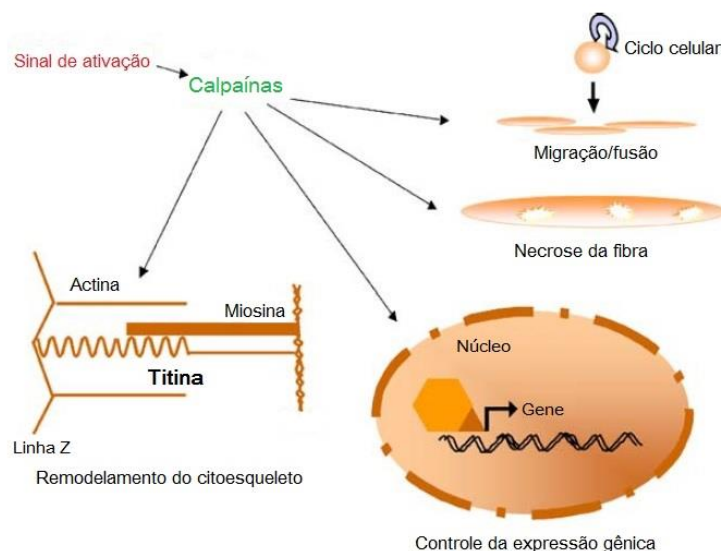


Figura 2 – Ação das calpaínas no tecido muscular esquelético (Modificado de BARTOLI, RICHARD, 2005).

2.1.3. Sistema ubiquitina-proteassoma

O sistema UbP é o principal sistema proteolítico envolvido no desenvolvimento da atrofia muscular, sendo responsável pela degradação de cerca de 80% das proteínas miofibrilares em diferentes situações patológicas como a sepse, câncer, diabetes e desnervação (JACKMAN, KANDARIAN, 2004; LECKER, GOLDBERG, MITCH, 2006;). A atividade do sistema UbP envolve duas etapas sucessivas e bem reguladas. A primeira delas consiste na marcação do substrato-alvo pela ubiquitina (Ub), processo conhecido como ubiquitinação (Fig. 3) que envolve as enzimas E1 ou ativadora de Ub, E2 ou carreadora de Ub e a E3 ou Ub-ligase. Esta última é considerada a mais importante na ubiquitinação, uma vez que confere a especificidade da reação iniciada pela E2 e reconhece o substrato ao qual serão adicionadas múltiplas ubiquitinas (LECKER, GOLDBERG, MITCH, 2006). Uma vez ubiquitinada, a proteína-alvo pode ser reconhecida e degradada pelo proteassoma 26S (Fig. 4) que é um complexo formado por um centro multicatalítico, o proteassoma 20S, e uma subunidade regulatória conhecida como 19S, que é responsável pelo reconhecimento de proteínas marcadas pela Ub (GLICKMAN, CIECHANOVER, 2002).

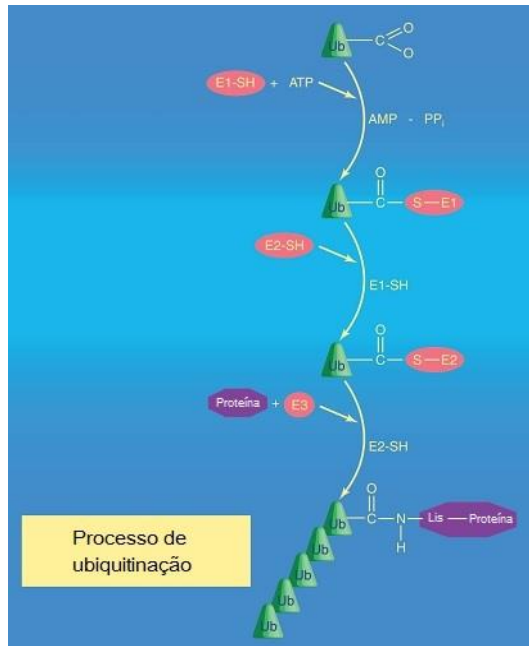


Figura 3 – As três etapas bioquímicas da ubiquitinação, este processo se repete até haver uma cauda de ubiquitina ligada ao substrato a ser degradado (Modificado de LECKER, GOLDBERG, MITCH, 2006).

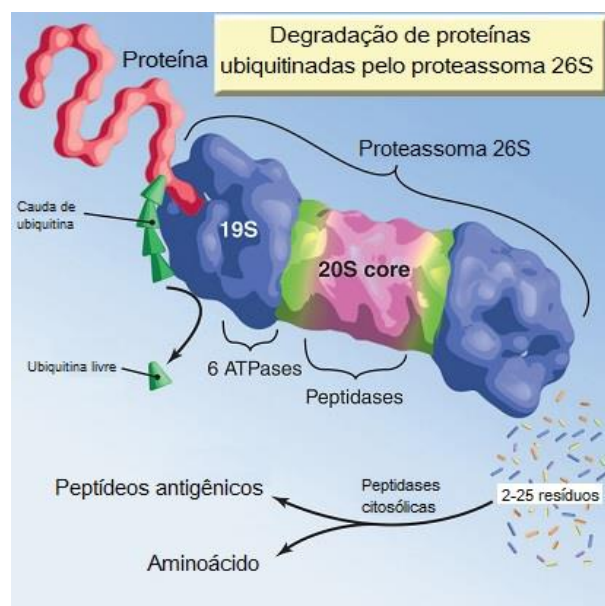


Figura 4 – A estrutura do proteassoma 26S (Modificado de LECKER, GOLDBERG, MITCH, 2006).

2.2. PLANO ATRÓFICO

O desenvolvimento da atrofia muscular envolve um plano atrofico, isto é, um conjunto de ações que abrange não apenas a maior atividade destes sistemas de degradação de

proteínas, além de aumentar ou a reduzir da expressão de genes denominados coletivamente de atrogenes (LECKER, *et al.* 2004).

Recentemente, foi demonstrado que o aumento da expressão dos genes das E3-ligases atrogin-1/MAFBx (*Muscle Atrophy Fbox*) e MuRF1 (*Muscle Ring Finger 1*) antecede o estabelecimento da atrofia em diferentes situações atroficas como o jejum, uremia, câncer, desnervação, diabetes *mellitus* e sepse (BODINE *et al.*, 2001; DEVAL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001), o que os tornou marcadores de atrofia muscular. Existem pelo menos 120 genes que podem ser modulados em diferentes estados catabólicos (SACHECH *et al.*, 2006). Portanto, fazem parte deste grupo não apenas as E3-ligases, mas genes relacionados à autofagia e a própria atividade lisossomal como LC3 e catepsina L (DEVAL *et al.*, 2001, LECKER, *et al.* 2004). Diferentes fatores comuns em situações patológicas, tais elevação dos níveis de glicocorticoides, espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias modulam a expressão desses atrogenes e, portanto, a atividade dos sistemas proteolíticos e ativação do plano atrofico (LI *et al.*, 2003; JACKMAN, KANDARIAN, 2004; FROST *et al.*, 2007).

Desta maneira, o estabelecimento da atrofia muscular requer uma série de regulações transcricionais que estão ligados a uma complexa rede de sinalização que a modula (SANDRI, 2008), contudo o entendimento da comunidade científica sobre esta rede ainda é incipiente.

2.3. DESNERVAÇÃO ATRÓFICA

A inervação motora é determinante não apenas para o desenvolvimento e as características bioquímicas (fibras glicolíticas e oxidativas), mas também para manutenção da massa, da força e da função muscular esquelética (SCHIAFFINO *et al.*, 1999). Diversas patologias neuromusculares como esclerose lateral amiotrófica (ELA), polineuropatias, distrofia muscular de Duchenne (DMD) e injúrias na medula espinal estão associadas a atrofia muscular severa, e conseqüentemente, maior risco de desenvolvimento de comorbidades, tais como diabetes, obesidade, hipertensão, entre outras, decorrentes da redução na atividade física (MORESI *et al.*, 2010). Dentre os modelos experimentais que mimetizam a atrofia muscular por desuso em roedores, a desnervação por secção do nervo isquiático é amplamente utilizada no estudo dos mecanismos atroficos locais em decorrência de prejuízos a inervação motora. Deste modo, observa-se em torno de 40% de redução na massa de músculos glicolíticos e oxidativos após 10 dias da desnervação motora (KLINE *et al.*, 2007). Inclusive, estudos *in vitro* demonstraram que a atrofia induzida pela secção do nervo isquiático é decorrente da

hiperatividade dos sistemas proteolíticos (lisossomal, dependente de Ca^{2+} e UbP) sem alterações na síntese proteica (FURUNO, GOODMAN, GOLDBERG, 1990; TISCHLER *et al.*, 1990). Um dos mecanismos envolvidos na hiperatividade dos sistemas proteolíticos na desnervação atrófica é o estresse oxidativo. Após 7 dias de secção do nervo isquiático, a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta cerca de 30 vezes (MULLER *et al.*, 2007), tornando-se determinante para a perda de massa muscular. Corroborando estes resultados, sabe-se que a carência de antioxidantes gera balanço nitrogenado positivo e aumento da ureia urinária, decorrente da perda de proteínas musculares, efeitos que são revertidos com a suplementação dietética com vitamina A, um antioxidante natural (ESTEBAN-PRETEL *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que o uso de antioxidantes podem ser uma possibilidade para o tratamento da atrofia muscular por desuso, ainda pouco investigada.

2.4. COMPOSTOS NATURAIS, METABOLISMO PROTEICO E RESVERATROL

Diante da limitação farmacológica para o combate à atrofia muscular em diferentes situações catabólicas, tem-se buscado novas estratégias terapêuticas, inclusive novas moléculas que exerçam ações anti-atróficas. Neste contexto, estudo recente avaliou a ação do ácido eicopentaenóico (EPA), um ácido graxo insaturado de cadeia longa pertencente a classe do omega-3 (ω -3), e que é encontrado em algumas espécies de algas e peixes que vivem em faixas profundas do oceano (DUTT *et al.*, 2005). Este composto suprime a produção de fatores pró-inflamatórios durante a caquexia cancerosa (MAGEE, PEARSON, ALLEN, 2008; LIU *et al.*, 2013), além de reduzir a atividade de UbP através da diminuição da expressão da subunidade 20S do proteassoma (WHITEHOUSE *et al.*, 2001). De forma semelhante, a curcumina, um produto derivado do açafrão de terra (*Curcuma longa*), reduz a proteólise induzida por fator indutor de proteólise (PIF) em cultura de miotubos C₂C₁₂ (WYKE, RUSSEL, TISDALE, 2004).

Pesquisa realizada em camundongos com distrofia muscular com mutação no cromossomo X (mdx) demonstrou que a suplementação com epicatequina galato (EPG), um dos principais componentes do chá verde, é capaz de reduzir a necrose e melhorar a função do músculo EDL (*extensor digitorum longus*) (DORCHIES *et al.*, 2006), em um outro estudo EPG suprimiu a expressão de atrogenes atrogen-1 e MuRF-1 em células C₂C₁₂ induzidas por rotação 3D ou glicocorticoide (HEMDAM, 2009).

Dentre os compostos naturais sendo avaliados pela comunidade científica, o resveratrol (3,5,4'-triidroxiestilbeno) tem chamado atenção, principalmente por sua diversidade de efeitos biológicos, uma vez que seus benefícios à saúde humana foram

descritos e associados as suas características anti-inflamatória e antioxidante (MARQUES, MARKUS, MORRIS, 2009). Esta molécula é um antioxidante natural pertencente a classe das fitoalexinas e produzido a partir do metabolismo secundário em mais de 70 espécies de plantas (CHERNIACK, 2010), com destaque para sua presença na casca da uva (50–100mg/g) e seus derivados, como o vinho tinto (2–7mg/L) (MARQUES, MARKUS, MORRIS, 2009). O resveratrol é produzido na forma dos isômeros trans- e cis-resveratrol (Fig. 5), sendo a isoforma trans a de maior ocorrência e relativamente mais estável, (BERTAGNOLLI, *et al.*, 2007).

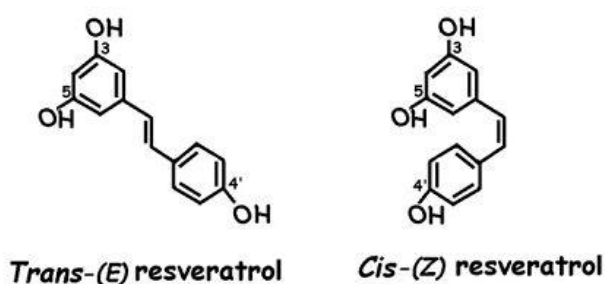


Figura 5 - Estrutura química do trans- e cis-resveratrol (BORRIELLO *et al.*, 2010).

O resveratrol ganhou notabilidade no início dos anos 90 quando foi indicado como explicação do “paradoxo francês” (RENAUD, LORGERIL, 1992), este termo designa o paradoxo existente entre a alimentação dos franceses e a sua saúde, uma vez que apesar desta população consumir uma dieta rica em gorduras saturadas, apresenta uma baixa incidência de doenças cardiovasculares quando comparadas a outras populações que consomem dieta semelhante. O consumo regular e moderado de vinho foi proposto para explicar este fenômeno, logo, os polifenóis encontrados no vinho tinto, especialmente o resveratrol foram postulados como responsáveis pelo efeito protetor (RENAUD, LORGERIL, 1992; VIDAVALUR *et al.*, 2006). Esta conclusão tem sido alvo de discussão na comunidade científica (VISIOLI, 2014), principalmente devido à baixa biodisponibilidade do resveratrol e outros polifenóis encontrados no vinho (ROTCHES-RIBALTA *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2014), entretanto, o fato é que pesquisas demonstraram efeitos benéficos dessa molécula no sistema cardiovascular, tais como, promover a redução da aterogênese (WANG *et al.*, 2005) e redução da peroxidação lipídica (FUHRMAN, LAVY, AVIRAM, 1995), redução na adipogênese e nas concentrações de citocinas inflamatórias em ratos submetidos a dieta hiperlipídica (KIM *et al.* 2011).

No que diz respeito ao músculo esquelético, pesquisas indicam que a suplementação dietética com resveratrol altera o metabolismo lipídico e glicídico no músculo esquelético *in vivo* e *in vitro* (BAUR, SINCLAIR, 2006; LAGOUGE *et al.*, 2006). Por outro lado, ainda que menos conhecidos, existem relatos de efeitos benéficos deste fenol no metabolismo proteico da musculatura esquelética. LAGOUGE *et al.* (2006) mostraram que o resveratrol reduz o ganho de massa corporal em animais alimentados com dieta rica em gorduras, sem alterações na ingestão alimentar. Este efeito foi associado ao aumento da taxa metabólica basal e da termogênese. Neste estudo foi também demonstrado o aumento da expressão do coativador transcricional PGC-1 α , aumento na biogênese e a atividade enzimática mitocondrial em músculo glicolíticos (LAGOUGE *et al.*, 2006), sugerindo que o resveratrol aumenta a capacidade oxidativa na musculatura esquelética. De forma muito interessante, foi demonstrado *in vitro* que esta fitoalexina atenua a degradação de proteínas musculares em cultura de células C₂C₁₂ o resveratrol reduziu a degradação de proteínas e a atrofia miofibrilar induzida pela angiotensina I e II (RUSSELL, WYKE, TISDALE, 2006), tornando-o uma possibilidade terapêutica no combate à atrofia muscular em diferentes situações catabólicas. Além disso, a suplementação dietética com resveratrol de animais com tumor MAC16 atenuou a atrofia muscular significativamente (WYKE, RUSSELL, TISDALE, 2004), o que não é observado em animais com tumor de Yoshida AH-130 (BUSQUEST *et al.*, 2007). Curiosamente, o resveratrol não atenua a sarcopenia, contudo, reduz o estresse oxidativo e preserva a capacidade contrátil de fibras glicolíticas em ratos idosos (JACKSON, RYAN, ALWAYS, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos *in vitro* e mecanismo de ação do resveratrol no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos submetidos a desnervação motora.

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos *in vitro* do resveratrol na proteólise total em músculo EDL de animais sham e desnervados;

Avaliar os efeitos *in vitro* do resveratrol na atividade do sistema proteolítico lisossomal, dependente de Ca^{2+} e UbP em músculo EDL de animais sham e desnervados;

- Avaliar os efeitos *in vitro* do resveratrol na síntese proteica em músculo EDL de animais sham e desnervados;

- Avaliar os efeitos *in vitro* do resveratrol na expressão gênica das E3 ligases (atrogin1 e MuRF1) e genes autofágico (LC3) em músculos (EDL) de ratos sham e desnervados.

- Avaliar os efeitos *in vitro* do resveratrol na expressão proteica de Akt, FoxO1, AMPK, S6, ERK e CREB em músculos EDL de ratos sham e desnervados.

- Avaliar se o efeito *in vitro* do resveratrol na proteólise total em músculos EDL de ratos sham e desnervados é dependente da ativação de PKA.

4. REFERÊNCIAS

- BARTOLI, M.; RICHARD, I. Calpains in muscle wasting. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 10, p. 2115-2133, 2005.
- BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006.
- BECHET, D. *et al.* Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 10, p. 2098-2114, 2005.
- BERTAGNOLLI, S. M. M. *et al.* Influência da maceração carbônica e da irradiação ultravioleta nos níveis de trans-resveratrol em vinhos de uva cabernet sauvignon. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, 2007.
- BLOMMAART, E. F. C.; LUIKEN, J. J. F. P.; MEIJER, A. J. Autophagic proteolysis: control and specificity. **The Histochemical journal**, v. 29, n. 5, p. 365-385, 1997.
- BODINE, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.
- BOOTH, F. W.; SEIDER, M. J. Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 47, n. 5, p. 974-977, 1979.
- BORRIELLO, A. *et al.* Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 8, p. 618-625, 2010.
- BUSQUETS, S. *et al.* Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model. **Cancer letters**, v. 245, n. 1, p. 144-148, 2007.
- CARAFOLI, E.; MOLINARI, M. Calpain: a protease in search of a function?. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 247, n. 2, p. 193-203, 1998.
- CHERNIACK, E. P. The potential influence of plant polyphenols on the aging process. **Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine**, v. 17, n. 4, p. 181-187, 2010.
- CONG, M. *et al.* The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 660-666, 1998.

- COSTELLI, P. *et al.* Ca^{2+} -dependent proteolysis in muscle wasting. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 10, p. 2134-2146, 2005.
- DEVAL, C. *et al.* Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 143-150, 2001.
- DORCHIES, O. M. *et al.* Green tea extract and its major polyphenol (–)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 290, n. 2, p. C616-C625, 2006.
- DUTT, V. *et al.* Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 86-100, 2015.
- ESTEBAN-PRETEL, G. *et al.* Vitamin A deficiency increases protein catabolism and induces urea cycle enzymes in rats. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 4, p. 792-798, 2010.
- FISCHER, D. R. *et al.* Dantrolene reduces serum TNF [alpha] and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression, and protein breakdown in septic rats. **Shock**, v. 15, n. 3, p. 200-207, 2001.
- FROST, R. A. *et al.* Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 2, p. E501-E512, 2007.
- FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **The American journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 3, p. 549-554, 1995.
- FURUNO, K.; GOODMAN, M. N.; GOLDBERG, A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 15, p. 8550-8557, 1990.
- 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.
- GOLL, D. E. *et al.* The calpain system. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 731-801, 2003.
- GOMES, M. D. *et al.* Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 25, p. 14440-14445, 2001.

GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection?. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 7, p. 387-392, 2011.

GUROFF, G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. **The Journal of biological chemistry**, v. 239, n. 1, p. 149-155, 1964.

HEMDAN, D. *et al.* Polyphenols prevent clinorotation-induced expression of atrogenes in mouse C2C12 skeletal myotubes. **The Journal of Medical Investigation**, v. 56, n. 1, 2, p. 26-32, 2009.

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 4, p. C834-C843, 2004.

JACKSON, J. R.; RYAN, M. J.; ALWAY, S. E. Long-term supplementation with resveratrol alleviates oxidative stress but does not attenuate sarcopenia in aged mice. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 66, n. 7, p. 751-764, 2011.

JOFFE, M.; SAVAGE, N.; ISAACS, H. Increased muscle calcium A possible cause of mitochondrial dysfunction and cellular necrosis in denervated rat skeletal muscle. **Biochemical Journal**, v. 196, n. 3, p. 663-667, 1981.

KIM, S. *et al.* Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. **Biochemical pharmacology**, v. 81, n. 11, p. 1343-1351, 2011.

KLINE, W. O. *et al.* Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. **Journal of applied physiology**, v. 102, n. 2, p. 740-747, 2007.

LAGOUGE, M. *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109-1122, 2006.

LECKER, S. H. *et al.* Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 1, p. 39-51, 2004.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 7, p. 1807-1819, 2006.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1, p. 227S-237S, 1999.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.

LI, Y. *et al.* Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 285, n. 4, p. C806-C812, 2003.

LIU, Y. *et al.* Fish oil increases muscle protein mass and modulates Akt/FOXO, TLR4, and NOD signaling in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 8, p. 1331-1339, 2013.

MAGEE, P.; PEARSON, S.; ALLEN, J. The omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), prevents the damaging effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha during murine skeletal muscle cell differentiation. **Lipids in health and disease**, v. 7, n. 1, p. 1, 2008.

MARQUES, F. Z.; MARKUS, M. A.; MORRIS, B. J. Resveratrol: cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 11, p. 2125-2128, 2009.

MIZUSHIMA, N. *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069-1075, 2008.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728-741, 2011.

MORESI, V. *et al.* Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. **Cell**, v. 143, n. 1, p. 35-45, 2010.

MULLER, F. L. *et al.* Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. **American journal of physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1159-R1168, 2007.

QI, Y. *et al.* Inhibition of AMPK expression in skeletal muscle by systemic inflammation in COPD rats. **Respiratory research**, v. 15, n. 1, p. 156, 2014.

RAYNAUD, F. *et al.* Calpain 1–titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. **Febs Journal**, v. 272, n. 10, p. 2578-2590, 2005.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, 1992.

ROTCHES-RIBALTA, M. *et al.* Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. *Pharmacological Research*, v. 66, n. 5, p. 375-382, 2012.

RUSSELL, S. T.; WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Mechanism of induction of muscle protein degradation by angiotensin II. **Cellular signalling**, v. 18, n. 7, p. 1087-1096, 2006.

SACHECK, J. M. *et al.* Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 2, p. E340-E349, 2006.

SANDRI, M. New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 14, n. 3, p. 223-229, 2011.

SANDRI, M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 10, p. 2121-2129, 2013.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology**, v. 23, n. 3, p. 160-170, 2008.

SANDSTEDT, S.; SYMRENG, T.; LARSSON, J. Changes in muscle and plasma amino acid metabolism in severe malnutrition – The influence of total parenteral nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 4, n.1, p.13-19, 1985.

SCHIAFFINO, S. *et al.* How is muscle phenotype controlled by nerve activity?. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v. 20, n. 6, p. 409-412, 1999.

TANG, P. C. *et al.* Resveratrol and cardiovascular health–promising therapeutic or hopeless illusion?. *PHARMACOLOGICAL RESEARCH*, v. 90, p. 88-115, 2014.

TIDBALL, J. G.; SPENCER, M. J. Calpains and muscular dystrophies. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2000.

TISCHLER, M. E. *et al.* Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. **Metabolism**, v. 39, n. 7, p. 756-763, 1990.

VIDAVALUR, R. *et al.* Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 11, n. 3, p. 217, 2006.

VISIOLI, F. The resveratrol fiasco. **Pharmacological research**, v. 90, p. 87-87, 2014.

WAGATSUMA, A.; FUJIMOTO, K.; YAMADA, S. Effect of treatment with nifedipine, an L-type calcium channel blocker, on muscular atrophy induced by hindlimb immobilization. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 12, n. 1, p. 26-30, 2002.

WANG, Z. *et al.* Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE**, v. 16, n. 4, p. 533-540, 2005.

WHITEHOUSE, A. S. *et al.* Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. **Cancer research**, v. 61, n. 9, p. 3604-3609, 2001.

WILLIAMS, A. B. *et al.* Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 11, p. 1435-1443, 1999.

WYKE, S. M.; RUSSELL, S. T.; TISDALE, M. J. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF- κ B activation. **British journal of cancer**, v. 91, n. 9, p. 1742-1750, 2004.

YOSHIMURA, N. *et al.* Immunogold electron-microscopic localisation of calpain I in skeletal muscle of rats. **Cell and tissue research**, v. 244, n. 2, p. 265-270, 1986.

5. ARTIGO

Artigo na forma de manuscrito a ser submetido à revista Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

Efeito do resveratrol no metabolismo proteico em músculo esquelético de ratos desnervados

Ivanildo Inácio da Silva Júnior¹, Flávia Peixoto Albuquerque¹, Amanda Moreira de Albuquerque¹, Silva de Paula Gomes², Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves², Luis Carlos Carvalho Navegantes², Ísis do Carmo Kettlhut², Eduardo Carvalho Lira¹

Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil¹

Laboratório de Controle do Metabolismo, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brasil²

Autor correspondente:

Dr. Eduardo Carvalho Lira

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária,

Recife, Pernambuco, Brasil CEP 50670-901

Telefone 55-81-21268000

E-mail: eduardoclira@gmail.com

RESUMO

Embora haja relatos que o resveratrol possa prevenir ou atenuar o aumento da proteólise em situações atroficas, seu mecanismo de ação ainda não está completamente claro. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do resveratrol sobre o metabolismo de proteínas no músculo esquelético de ratos submetidos a desnervação, assim como investigar o mecanismo de ação deste polifenol. A desnervação motora aumentou (62%) a proteólise total em músculo EDL, que foi acompanhado pelo aumento da atividade do sistema ubiquitina-proteassoma (UbP, 270%) e dependente de Ca^{2+} (41%). Resveratrol reduziu a proteólise total em músculos sham (39%) e DEN (28%), em parte por reduzir a hiperatividade dos sistemas proteolíticos UbP (36%) e dependente de Ca^{2+} (28%). Contudo, a ação antiproteolítica do resveratrol foi abolida quando PKA foi inibida. Resveratrol reduziu a expressão gênica de Atrogin1 em músculo de animais sham e desnervados, enquanto que reduziu MuRF1 apenas em músculo sham. Além disso, o resveratrol reduziu a fosforilação de ERK1/2, Akt, FoxO1, por outro lado, aumentou a fosforilação da proteína S6, AMPK e CREB. Esses dados indicam que o resveratrol exerce ações antiproteolíticas sobre a musculatura esquelética e seu mecanismo de ação depende da ativação de PKA, além de envolver a modulação de ERK, AMPK e S6K.

Palavras-chaves: resveratrol; desnervação; atrofia; proteólise.

ABSTRACT

Although there are reports that resveratrol can prevent or attenuate the increased proteolysis in atrophic situations, its mechanism of action is not yet completely clear. This study aimed evaluate the resveratrol effect on the protein metabolism in skeletal muscle of sham and denervated rats as well as investigate the mechanism of action of this polyphenol. The motor denervation increased the total proteolysis (62%) in EDL muscle, which was accompanied by increased in ubiquitin-proteasome system (UBP, 270%) and Ca^{2+} (41%) activity. Resveratrol reduced total proteolysis in muscle sham (39%) and DEN (28%), in part by reducing the hyperactivity UBP (36%) and Ca^{2+} (28%). However, the resveratrol antiproteolytic action was eliminated when PKA was inhibited. Resveratrol reduced gene expression Atrogin1 in sham animal muscle and denervated, while reduced MuRF1 only sham muscle. Furthermore, this fitolexina reduced ERK1/2, Akt and FoxO1 phosphorylation, on the other hand, increased S6, AMPK, and CREB phosphorylation. These data indicate that resveratrol exerts antiproteolytic actions on skeletal muscle and its mechanism of action depends on PKA activation and involves the modulation of ERK, AMPK and S6K.

Key-words: Resveratrol; Denervation; Atrophy; Proteolysis.

INTRODUÇÃO

A manutenção da massa muscular depende de dois mecanismos antagônicos: a síntese e a degradação de proteínas. Situações onde há o aumento da proteólise, acompanhada ou não da redução da síntese de proteínas, contribuem para o desenvolvimento da atrofia muscular, um sinal clínico importante em diferentes condições patológicas, tais como o câncer, a sepse, o diabetes e a desnervação motora^{1,2}. Embora parte dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da atrofia muscular seja conhecido, ainda não há alternativas terapêuticas eficazes para combatê-la^{3,4,5}.

A inervação motora é determinante não apenas para o desenvolvimento e as características bioquímicas, mas também para manutenção da massa, geração de força e da função muscular⁶. Portanto, a desnervação motora causa na redução da massa muscular e o aumento do estresse oxidativo em músculos glicolíticos⁷, o que decorre da hiperatividade dos sistemas proteolíticos lisossomal, dependente de cálcio (Ca^{2+}) e ubiquitina-proteassoma (UbP), sem alterações na síntese proteica⁸. Além disso, para o desenvolvimento da atrofia é necessário o aumento da expressão gênica e proteica de um conjunto de genes coletivamente denominados de atrogenes, de cujo grupo fazem parte as E3-ligases: atrogina-1 e MuRF1, e os genes autofágicos LC3 e GABARAP^{9,10,11,12,13,14}.

É bem demonstrado que polifenóis com atividade antioxidante modula vias intracelulares de controle da expressão dos atrogenes, como a via da Akt/FoxO¹⁵ das quinases mitógenas (MAPK)¹⁶. Neste contexto, o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), um antioxidante natural, demonstra efeito antiatrófico na musculatura esquelética em diferentes condições catabólicas experimentais, como o diabetes¹⁷, câncer¹⁸ e tratamento com dexametasona¹⁹, contudo o mecanismo de ação desta molécula ainda não está completamente elucidado. Há relatos de efeitos metabolicamente positivos do resveratrol, incluindo ação antioxidante²⁰, ativação de histonas deacetilases como a SIRT1^{21,22}, assim como, estimula a ação da quinase dependente de AMP (AMPK) que é um importante sensor energético celular envolvida com a modulação de vias de controle de massa na musculatura esquelética²³.

Recentemente foi observado que o resveratrol é um inibidor não seletivo da fosfodiesterase 4 (PDE4)²⁴, desta forma sendo capaz de elevar os níveis intracelulares de cAMP e ativar a proteína quinase dependente de cAMP (PKA), que representam uma via antiproteolítica não clássica^{25,26}.

Considerando os dados já conhecidos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do resveratrol *in vitro* no metabolismo de proteínas em músculo submetidos a desnervação, assim como avaliar os prováveis mecanismos intracelulares envolvidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e desnervação atrófica

Devido ao procedimento de incubação requerer músculos intactos e suficientemente finos para permitir a difusão adequada de metabólitos e oxigênio, foram utilizados ratos Wistar machos (n=6 por grupo) com 4 semanas de idade e massa corporal de aproximadamente ± 80 g. Esses animais foram oriundos Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e permaneceram em caixa submetidas a ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro: 5h30 às 17h30) e temperatura em torno de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram alimentados com ração padrão para roedores (PRESENCE, LABINA 5002) e água *ad libitum*.

Procedimentos gerais

Os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de quetamina (115mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) i.p. e submetidos à desnervação motora bilateral provocada pela secção cirúrgica do nervo isquiático, com a remoção de cerca de 1 a 2 mm de nervo. Os animais denominados sham foram submetidos ao estresse cirúrgico, que incluiu a visualização do nervo, mas não sua secção. Três dias após a desnervação motora os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o músculo EDL (*extensor digitorum longus*) foi removido cuidadosamente e fixado através dos tendões a suportes próprios para a manutenção do comprimento de repouso.

Todos os procedimentos adotados obedeceram às normas preconizadas no “Guia de cuidados e uso dos animais de laboratório” (US National Institute of Health, publicações 85-23, revisado em 1996) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo 23076.01234/2012-79).

Determinação da degradação proteica

Os músculos foram incubados em tampão Krebs Ringer Bicarbonato (NaCl 120mM; NaHCO₃ 15mM; KCl 4,828 mM; MgSO₄ 1,2mM; KH₂PO₄ 1,212mM; CaCl₂ 2,4mM e pH 7,4), glicose (5mM) e aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os tecidos foram pré-incubados por 1h, em seguida o meio de incubação foi substituído por um novo meio e novamente os músculos foram incubados, desta vez por 2h.

Para determinar o efeito do resveratrol sobre o metabolismo proteico do músculo esquelético, o músculo de um dos membros posteriores do animal foi incubado na presença de

resveratrol (100 μ M) enquanto que o músculo do membro contralateral foi incubado o veículo dimetilsulfóxido (DMSO), na mesma proporção.

A degradação de proteínas musculares *in vitro* foi estimada pela presença de tirosina no meio de incubação após ser liberada pelo músculo. Cicloheximida (0,5mM) foi adicionado ao meio de incubação, com o objetivo de impedir a síntese proteica e a reincorporação da tirosina as proteínas do músculo. A tirosina foi analisada por método fluorimétrico²⁷.

Determinação da síntese proteica

Os músculos foram incubados como descrito anteriormente em tampão contendo glicose (5mM) e todos os 20 aminoácidos, em concentrações semelhantes ao plasma²⁸. Após 1h de pré-incubação, o meio foi substituído por meio idêntico acrescido de tirosina marcada ([U-14-C] tirosina; 220,05 μ Ci/ml) e então os músculos foram novamente incubados, desta vez por um período de 2h. No fim do período de incubação, a atividade específica da tirosina solúvel no meio e incorporada ao músculo (pool de tirosina intracelular) foi estimada pela análise da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (TRICARB 2100TR, Packard BioScience Company, EUA) e a concentração de tirosina foi determinada pelo método descrito por Waalkes e Udenfriend (1957)²⁷. A taxa de síntese proteica foi calculada usando a atividade específica do pool intracelular de cada músculo, determinada pela radioatividade da tirosina incorporada as proteínas.

Atividade das vias proteolíticas

Para avaliar a ação direta do resveratrol na atividade dos sistemas proteolíticos, os músculos foram incubados na presença e na ausência do resveratrol em situações onde cada um dos sistemas proteolíticos analisados está ativo na pata direita e inibido na pata contralateral. Desta forma, a diferença entre a liberação de tirosina das patas direita e esquerda reflete a atividade do sistema proteolítico analisado em cada experimento.

O sistema lisossomal foi inibido com a incubação do músculo EDL na presença da metilamina (10mM) e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), que incluem a leucina 170 μ M, isoleucina 100 μ M e valine 200 μ M. Nesta condição, o sistema lisossomal está inibido devido à elevação do pH e bloqueio da formação dos vacúolos autofágicos^{28,29,30}. A pata contralateral foi incubada na ausência de metilamina e BCAA, ou seja, sistema lisossomal ativo.

O protocolo utilizado para avaliação da via dependente de Ca^{2+} foi a incubação do músculo livre no meio Krebs contendo cálcio, ou seja, não musculo não foi fixado ao suporte,

desta forma permitindo que haja encurtamento das fibras musculares, o que leva ao déficit na difusão do oxigênio e de nutrientes para as fibras centrais, gerando um prejuízo a integridade a membrana sarcoplasmática e aumento dos níveis intracelulares de cálcio, ativando as calpaínas³¹. O músculo da pata contralateral foi incubado fixo no suporte (comprimento de repouso). A diferença na liberação de tirosina dos músculos incubados com suporte em relação aos músculos incubados livre (encurtados) representa a atividade do sistema dependente de cálcio.

Para avaliar a atividade do sistema UbP a pata direita foi incubada na presença dos inibidores metilamina, BCAA, E64 e leupeptina para o bloqueio concomitante dos sistemas proteolíticos lisossomal e dependente de Ca^{2+} , respectivamente. Nos músculos da pata esquerda foi incluído o MG132 (20 μM), um inibidor direto do proteassoma. A diferença entre os dois músculos corresponde a atividade do sistema UbP.

Análise da expressão gênica por RT-PCR

Depois da incubação o músculo EDL foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e estocados a -80°C. RT-qPCR em tempo real foi usado pra analisar os níveis de expressão de atrogin1, MuRF1 e LC3, o protocolo usado foi recentemente descrito por Paula-gomes *et al.* (2013)³².

Os primers usados foram atrogin1 (sense 5'-GCA GAG AGT CGG CAA GTC-3', e antisense 5'-CAG GTC GGT GAT CGT GAG-3'), MuRF1 (sense 5'-TCG ACA TCT ACA AGC AGG AA-3', e antisense 5'-CTG TCC TTG GAA GAT GCT TT-3'), LC3 (sense 5'-TTT GTA AGG GCG GTT CTG AC-3', e antisense 5'-CAG GTA GCA GGA AGC AGA GG-3') e RPL 39 (sense 5'-AAG GAC TTC ATG ATC CAG GG-3', e antisense 5'-TGA CAT CCT TCA GTG GCT TG -3'). Os primers foram desenhados usando o software Primer Express (Applied Biosystems). A análise quantitativa dos níveis de mRNA foram descritos em comparação aos valores do grupo controle. Os dados foram normalizados pela expressão RPL 39.

Análise da expressão proteica por Western Blot

Depois da incubação o músculo EDL foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e estocados a -80°C. Esses músculos foram coletados e homogeneizados em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4), contendo 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato de sódio, 1% SDS, 10mM pirofosfato de sódio, 100mM fluoreto de sódio, 10mM ortovanadato de sódio, 5g/ml de aprotinina, 1mg/ml de leupeptina, 1mM fluoreto de

fenilmetilsulfonil (PMSF), 50µM MG132 a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a quantidade de proteína foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951) usando BSA (bovine serum albumin) como padrão. Um volume igual de tampão de amostra (20% glicerol, 125mM Tris-HCl, 4% SDS, 100 mM ditioneitol (DTT), 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8) foi adicionado ao sobrenadante e a mistura foi levada a ebulição. 50µg de proteínas totais foram separadas por SDS-PAGE em géis de acrilamida a 10-12%, e logo após, transferido a uma membrana de nitrocelulose e incubados com anti-Akt (1:750), anti-phospho (p)-Ser473-Akt (1:750), anti-Foxo1 (1:1000), anti-p-Ser256-Foxo1 (1:750), anti-CREB (1:1000), anti-p-Ser133-CREB (1:750), anti-AMPK (1:750), anti-p-Ser485-AMPK (1:750), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-p-Thr202-204/185/187-ERK1/2 (1:1000), anti-p-Thr412-S6K1 (1:750) e anti-β-actin (1:2000). Anticorpo primário foi detectado usando um anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:2000 for Foxo1, p-Ser256 Foxo1, Akt, p-Ser473 Akt, CREB, p-Ser133 CREB, anti-AMPK, anti-p-Ser485-AMPK, anti-p-Thr412-S6K1 e 1:5000 para outros anticorpos primários) e visualizado usando o método ECL através de um sistema de detecção ChemiDoc MP (Bio-Rad) e software ImageLab (versão 5.2.1, Bio-Rad). A intensidade das bandas foi quantificada utilizando-se ImageJ (versão 1.43u, National Institutes of Health).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias ± EPM (erro padrão da média). Para a análise e interpretação dos dados foi realizado o teste “t” de Student para amostras pareadas ou não pareadas. Comparações múltiplas foram analisadas através da análise de variância multivariada com um ou dois fatores (one-way ou two-way ANOVA), seguido de pós-teste de Bonferroni ou Tukey para comparação entre grupos. O nível de significância adotado foi de 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Efeito do Resveratrol na degradação de proteínas em ratos sham e desnervados

Como esperado, após 3 dias de desnervação houve um aumento na taxa de degradação proteica de aproximadamente 62% no músculo EDL (Fig. 1). Curiosamente, a incubação *in vitro* desses músculos isolados na presença de resveratrol (RSV) foi capaz de atenuar o aumento da degradação proteica no músculo desnervado (28%) bem como no músculo sham (39%).

Por favor, inserir Figura 1 aqui

Efeito do Resveratrol na atividade das vias proteolíticas em ratos sham e desnervados

Houve hiperativação do UbP após 3 dias da desnervação motora (~270%), além disso, a atividade da via dependente de Ca^{2+} também está aumentada (~41%) neste modelo (Fig. 2). O resveratrol por sua vez, foi capaz de atenuar o aumento dessas duas vias (36% e 28%, respectivamente), indicando que o mecanismo de ação envolvido no seu efeito antiproteolítico deve-se a modulação de proteases pertencentes a via dependente de cálcio e UbP. O efeito do resveratrol na via dependente de cálcio deve estar relacionado modulação negativa da atividade da protease m-calpaína, já que o resveratrol reduziu a fosforilação de ERK 1/2 em músculo desnervado (Fig. 3A).

Por favor, inserir Figura 2 e Figura 3 aqui

Efeito do Resveratrol na síntese proteica em ratos sham e desnervados

A desnervação motora aumentou a síntese proteica no músculo EDL (Fig. 4), provavelmente por mecanismo que envolve a ativação da p70S6K (p70 ribossomal protein S6 kinase), uma vez que foi observado um aumento na fosforilação da proteína S6 (Fig. 5A) que é um dos seus alvos downstream. Contudo, o resveratrol reduziu a síntese proteica em músculo EDL de animal desnervado (Fig. 4), este resultado está relacionado com a sua capacidade de ativar AMPK (Fig. 5B).

Por favor, inserir Figura 4 e Figura 5 aqui

Resveratrol reduz a expressão gênica de Atrogin1 e MuRF1

Com o objetivo de investigar os mecanismos envolvidos no efeito antiproteolítico do resveratrol foi analisada a expressão gênica das E3 ligase Atrogin1 e MuRF1. Como mostrado na figura 6, estes atrogenes não estão hiperexpressos no músculo após 3 dias da desnervação motora, inclusive, MuRF1 está reduzido nestes músculos. Contudo o resveratrol reduziu a expressão de Atrogin1 nos animais sham e desnervado, enquanto que reduziu MuRF1 apenas no animal sham. Curiosamente, o resveratrol também reduziu a expressão de LC3 em músculos sham, apesar de não ter modulado a via lisossomal.

Por favor, inserir Figura 6 aqui

Efeito antiproteolítico do resveratrol é independente de Akt/FoxO1

A capacidade do resveratrol de modular a expressão dos atrogenes sugere a supressão FoxO através de fosforilação. A desnervação aumentou a fosforilação de FoxO1 (Fig. 7A), resultado que indica uma ativação da Akt, tal como observado na figura (Fig. 7B). Além

disso, o resveratrol reduziu a fosforilação em FoxO1 (Fig. 7A), provavelmente por reduzir a ativação de Akt (Fig. 7B). Juntos estes resultados sugerem que a massa do músculo EDL está sendo preservada na desnervação através de mecanismos que envolvem a ativação de Akt, enquanto que o mecanismo de ação do resveratrol parece não estar relacionado com a retenção do fator transcricional FoxO no citoplasma.

Por favor, inserir Figura 7 aqui

Efeito antiproteolítico do resveratrol é dependente da ativação de PKA

Como observado na figura 3B o resveratrol aumenta a fosforilação de CREB, o que provavelmente é devido a ativação de PKA, uma vez que ao adicionarmos H-89, um inibidor não seletivo de PKA, o efeito antiproteolítico do resveratrol é abolido, tanto em ratos sham (Fig. 8A) quanto em desnervados (Fig. 8B). Curiosamente, a inibição de PKA diminui a proteólise apenas em ratos sham (Fig. 8A) e o resveratrol causa um pequeno aumento da proteólise nessa situação.

Por favor, inserir Figura 8 aqui

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o catabolismo proteico muscular característico de situação clinicamente importante como a desnervação motora é atenuado pelo resveratrol. Embora este polifenol reduza a síntese proteica, seus efeitos anticatabólicos envolvem diretamente a redução da hiperatividade dos sistemas proteolíticos dependente de Ca^{2+} e ubiquitina-proteassoma, através de mecanismos que podem envolver, pelo menos em parte, fosforilações de proteínas-alvo como AMPK, ERK1/2 e CREB. Estes resultados têm implicações clínicas importantes, sobretudo na prevenção da instalação da atrofia muscular em diferentes situações catabólicas.

Como estratégia para estudar os efeitos diretos do resveratrol na musculatura esquelética utilizamos o modelo de desnervação motora. A atrofia resultante da ausência de atividade motora ocorre em decorrência da diminuição na atividade contrátil, o que favorece a hiperativação dos sistemas proteolíticos e, conseqüentemente, aumenta a degradação proteica, sobretudo miofibrilares^{8,33}. Deste modo, a proteólise induzida pelo quadro de desnervação motora é responsável pelo desencadeamento de alterações morfofuncionais e metabólicas, tais como diminuição da massa, diâmetro da fibra e perda da força contrátil que são características de um músculo em estado atrofico⁸.

Foi constatado que três dias após desnervação motora não houve atrofia em músculo EDL, enquanto que em músculo soleus observa-se uma significativa perda de massa (*dados não mostrados*). Esta diferença de resposta à atrofia está relacionada ao perfil metabólico dos músculos analisados³⁴. É bem demonstrado que a atrofia induzida pelo desuso (desnervação ou imobilização) ocorre principalmente em fibras oxidativas, enquanto músculos glicolíticos são mais rapidamente mobilizados em situações de privação nutricional, câncer e sepse³⁵. Do ponto de vista molecular, entende-se que o PGC1- α é protetor para musculatura vermelha, assim como o fator transcricional FoxO^{36,37} e NF-Kb³⁸ tem relação direta com o controle da massa em músculos pálidos. Embora se demonstre o papel destes fatores transcricionais no controle da massa muscular em situações atroficas, o significado de cada um nos diferentes tipos de fibra muscular e suas respostas aos estímulos atroficos estão longe de ser compreendida em sua totalidade.

Um possível mecanismo responsável pela preservação da massa de músculos pálidos durante os primeiros dias após a desnervação poderia ser o aumento da síntese proteica, desta forma, impedindo um balanço nitrogenado negativo³⁹. Entretanto, Sacheck *et al.* (2007)¹³ demonstraram que não há alteração na síntese proteica em músculo de animais desnervados, resultado congruente com os publicados por Gonçalves *et al.* (2012)⁴⁰ em músculo oxidativo. Contudo, outros estudos mostraram aumento da síntese proteica em músculo de animais desnervados^{8,41}, o que foi confirmado por nossos resultados. Curiosamente, o resveratrol reduziu a síntese proteica em músculo EDL, assim como reduziu a via da Akt/S6K, o que sugere que os efeitos de preservação de massa muscular não estão associados ao anabolismo, mas às ações antiproteolíticas deste polifenol. Já é bem conhecido o efeito antiproliferativo do resveratrol através da redução da síntese proteica em células cancerígenas⁴², entretanto, é a primeira vez que este efeito é relatado em músculo esquelético. É bem compreendido que na desnervação motora, a hiperativação dos sistemas proteolíticos contribui decisivamente para o desenvolvimento da atrofia muscular⁴³, independente das alterações na síntese de proteínas. Além disso, é possível especular que os efeitos sobre a redução de síntese proteica do resveratrol estejam relacionados à síntese de componentes proteicos dos sistemas proteolíticos, o que neste momento não foi avaliado.

Tem sido descrito diferentes ações benéficas do resveratrol, como os efeitos cardioprotetores e metabólicos. Diferentes mecanismos celulares são descritos, dentre eles, ações antioxidante⁴⁴, anti-inflamatórias por inibição do NF- κ B⁴⁵ e ativação da AMPK^{46,47}. O resveratrol aumentou a fosforilação e, portanto, a ativação de AMPK em músculos de animais sham e desnervados. Esta quinase atua, classicamente, como um importante sensor energético

acionado em situações de demanda metabólica, como por exemplo, o jejum. Além disso, quando fosforilada pode reduzir a síntese de proteínas, em parte, por reduzir a fosforilação de 4E-BP1 e S6K1^{48,49}, o que corrobora nossos achados.

Nosso estudo demonstrou que o resveratrol tem efeito antiproteolítico em músculo glicolítico de animais sham e desnervados, este resultado é corroborado por achado anterior de Alamdari *et al.* (2012)¹⁹ em miotubos L6 incubados com dexametasona. A redução na proteólise total foi acompanhada pela menor atividade dos sistemas proteolíticos UbP e dependente de Ca^{2+} em músculos de animais desnervados. Do mesmo modo, Olivan *et al.* (2012)⁵⁰ mostraram redução de proteólise total em células C2C12 incubadas com resveratrol e submetidas ao estresse térmico, mas sem avaliar a participação individual dos sistemas proteolíticos envolvidos neste efeito. Embora, o resveratrol tenha reduzido o estado de fosforilação da via Akt/FoxO1, classicamente envolvida com a inibição dos atrogenes^{10,12}, detectou-se a redução de atrogina-1 em músculos de animais normais e desnervados incubados com o resveratrol. Esta aparente contradição mostra a participação de mecanismos intracelulares distintos envolvidos na ação antiproteolítica do resveratrol.

Estudos anteriores não identificaram a participação do sistema dependente de Ca^{2+} no desenvolvimento da atrofia muscular induzida pela desnervação em músculos oxidativos^{40,51}. Entretanto, nossos resultados mostram a participação das calpaínas na proteólise induzida pelo desuso, assim como o efeito inibitório do resveratrol na proteólise dependente de Ca^{2+} . As principais proteases deste sistema, as calpaínas, são inibidas pela calpastatina (inibidor endógeno) e também por mecanismos de fosforilação direta pela PKA^{52,53}. Tem sido observado o aumento na expressão e na atividade da m-calpaína dependente da via ERK (quinase regulada por sinais extracelulares)^{54,55}. Outros polifenóis, como a quercetina, inibem a atividade da ERK, o que foi acompanhado pela redução das E3 ligases⁵⁶. Nesta perspectiva, além da redução da atividade do sistema dependente de Ca^{2+} , o resveratrol reduziu a fosforilação e, portanto, a atividade da ERK, o que em conjunto permite especular que este polifenol reduz a proteólise muscular, pelo menos em parte, por inibir a atividade das calpaínas via ERK1/2.

Recentemente foi demonstrada a redução da expressão das E3 ligases, atrogina-1 e MuRF1 pelo resveratrol através da SIRT1¹⁹ em miotubos. A superexpressão desta deacetilase reduziu a atrofia muscular em músculos de animais submetidos ao jejum e à desnervação através da inativação de Foxo1 e 3⁵⁷. Este mesmo trabalho evidenciou que a superexpressão de SIRT1 promoveu hipertrofia muscular independentemente da ativação da via da PI3K/Akt. Diante disto, a ativação da SIRT1 se torna um provável alvo terapêutico para o combate à

perda excessiva de proteínas musculares em condições debilitantes. Além disso, é uma via a ser explorada como mecanismo antiproteolítico do resveratrol na sepse e na desnervação motora.

Nesta mesma perspectiva, diferentes trabalhos têm demonstrado que o aumento da atividade deacetilase de SIRT (sirtuína) está envolvida com o aumento da atividade de proteínas importantes como o PGC1- α (*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*), um regulador positivo da massa muscular^{58,59}, o que poderia explicar, pelo menos em parte, os nossos achados. Outra atraente possibilidade é o papel da AMPK, que embora tenha ações catabólicas, também estimula a atividade de SIRT1^{59,60}, o que torna possível especular o efeito antiproteolítico do resveratrol através da via AMPK/SIRT1 em decorrência da ativação da AMPK em músculos de animais sham e desnervados incubados na presença do resveratrol.

Há evidência de um papel anticatabólico do sistema nervoso simpático via cAMP/PKA em músculos de ratos em situações normais e catabólicas^{61,62}. Estratégias farmacológica utilizando inibidores de fosfodiesterase (PDE) também atenuam a perda excessiva de proteínas musculares em situações catabólicas como o diabetes e a sepse^{1,2,26,63,64}. Associado a isso, foi demonstrado que a ativação da via clássica cAMP/PKA está diretamente envolvida com a redução da atividade UbP, assim como da atividade do sistema dependente de Ca^{2+} em músculos glicolíticos^{25,65}. Nesta perspectiva, Park *et al.* (2012)²⁴ constataram que o resveratrol é um inibidor seletivo da fosfodiesterases (PDEs), principalmente PDE 4⁶⁶ que é a isoforma expressa no músculo esquelético⁶⁷. Diante do aumento da fosforilação de CREB, alvo molecular da PKA, é possível especular o aumento dos níveis intracelulares do cAMP em músculos de animais tratados com resveratrol, o que pode explicar as ações antiproteolíticas deste polifenol no sistema UbP e dependente de Ca^{2+} . Além disso, tem sido demonstrado as ações inibitórias direta da PKA na atividade proteolítica do sistema UbP⁶⁸ ou fosforilando as E3 ligases, retendo-as no citoplasma e inibindo sua atividade transcricional⁶⁵. Além disso, é conhecido que CREB pode ser ativado pela AMPK no resíduo 133 da serina⁶⁹, o que sugere que em situações catabólicas como a desnervação AMPK seja necessária para ativação não somente de SIRT1, mas também do CREB, contribuindo para atenuação da perda excessiva de proteínas musculares. Em conjunto, estes dados sugerem que o resveratrol parece atuar, pelo menos em parte, pela via cAMP/PKA para exercer seus efeitos antiproteolíticos.

CONCLUSÕES

O resveratrol reduz a hiperativação dos sistemas proteolíticos UbP e dependente de Ca^{2+} e, portanto, tem efeito antiproteolítico em músculo esquelético de animais submetidos a desnervação. Estes efeitos se devem, pelo menos em parte, pela modulação de vias intracelulares que dependem da fosforilação de CREB, AMPK e ERK1/2, contudo estes mecanismos ainda são pouco compreendidos. Por outro lado, a ação protetora do resveratrol na musculatura esquelética depende da ativação de PKA. Deste modo, estes resultados sugerem que o resveratrol pode prevenir a perda de massa muscular em modelos de atrofia experimental, sobretudo por reduzir a proteólise muscular, independente da síntese proteica.

FIGURAS

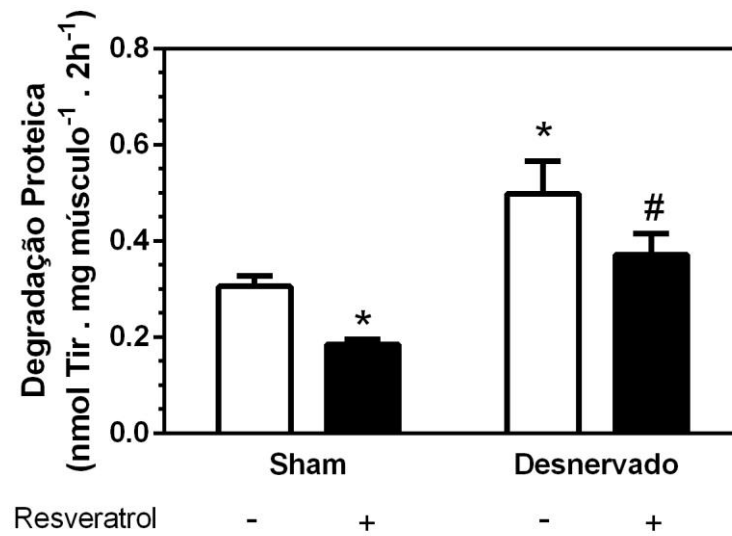


Figura 1 - Efeito do resveratrol (100 μ M) sobre a proteólise total em músculo EDL de ratos sham e desnervados após 3 dias. * $p < 0.05$ vs. Sham (- RSV), # $p < 0.05$ vs. Desnervado (- RSV).

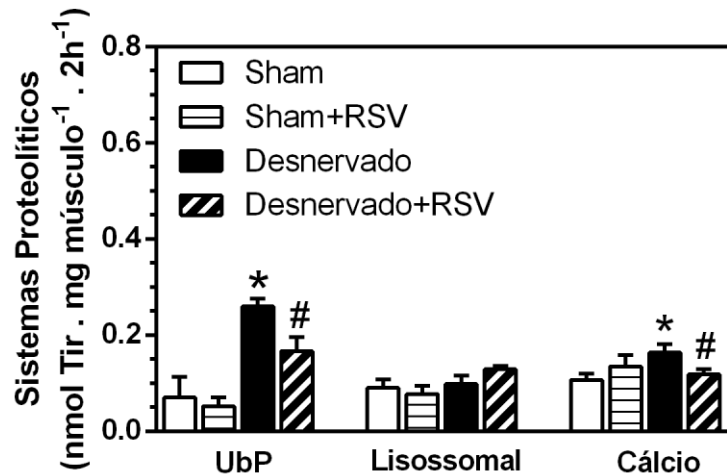


Figura 2 - Efeito do resveratrol (100 μ M) sobre a atividade das vias ubiquitina-proteassoma (UbP), lisossomal e dependente de cálcio (Ca^{2+}) em músculo EDL de ratos sham e desnervados após 3 dias. * $p < 0.05$ vs. Sham, # $p < 0.05$ vs. Desnervado.

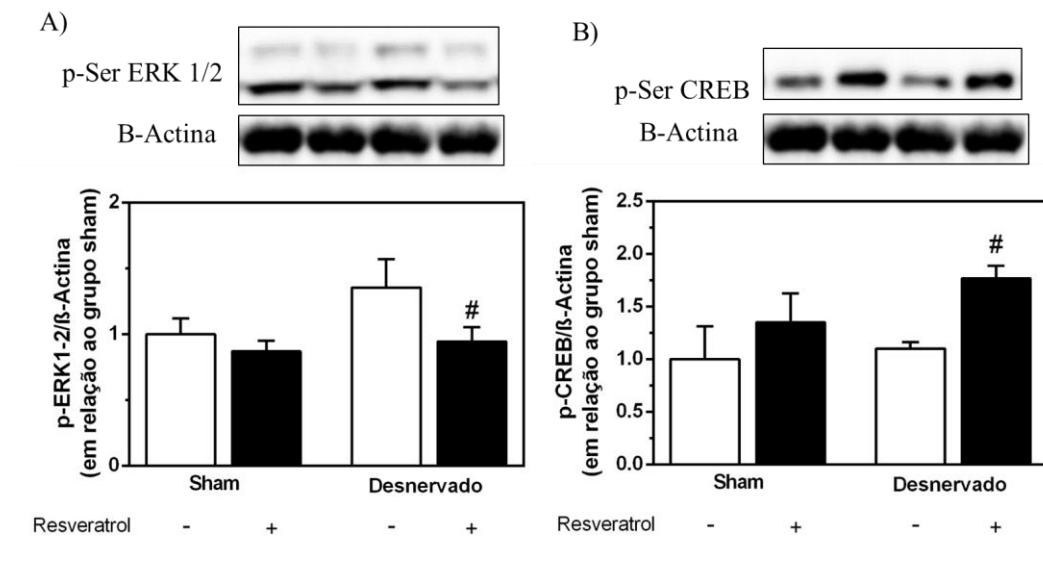


Figura 3 - Efeito do resveratrol (100 μ M) sobre os níveis de fosforilação de A) ERK 1/2 e B) CREB em músculo EDL de ratos sham e desnervados após 3 dias. [#] $p < 0.05$ vs. Desnervado (- RSV).

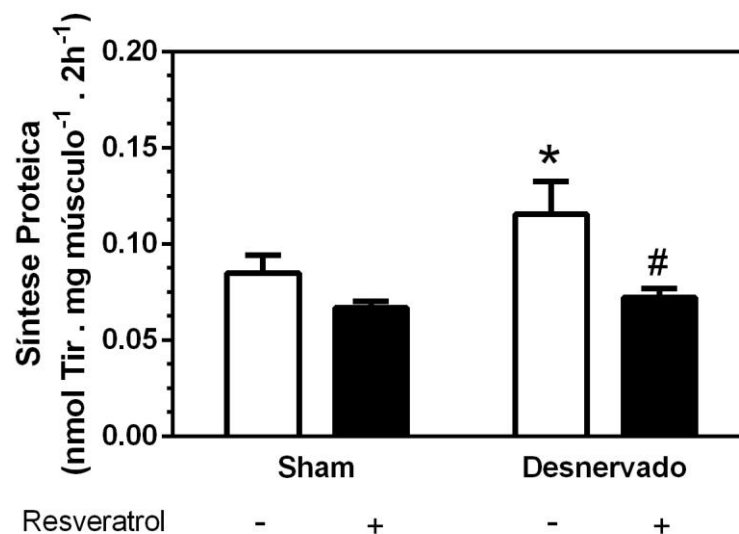


Figura 4 - Efeito do resveratrol (100 μ M) sobre a síntese proteica total em músculo EDL de ratos sham e desnervados após 3 dias. ^{*} $p < 0.05$ vs. Sham (- RSV), [#] $p < 0.05$ vs. Desnervado (- RSV).

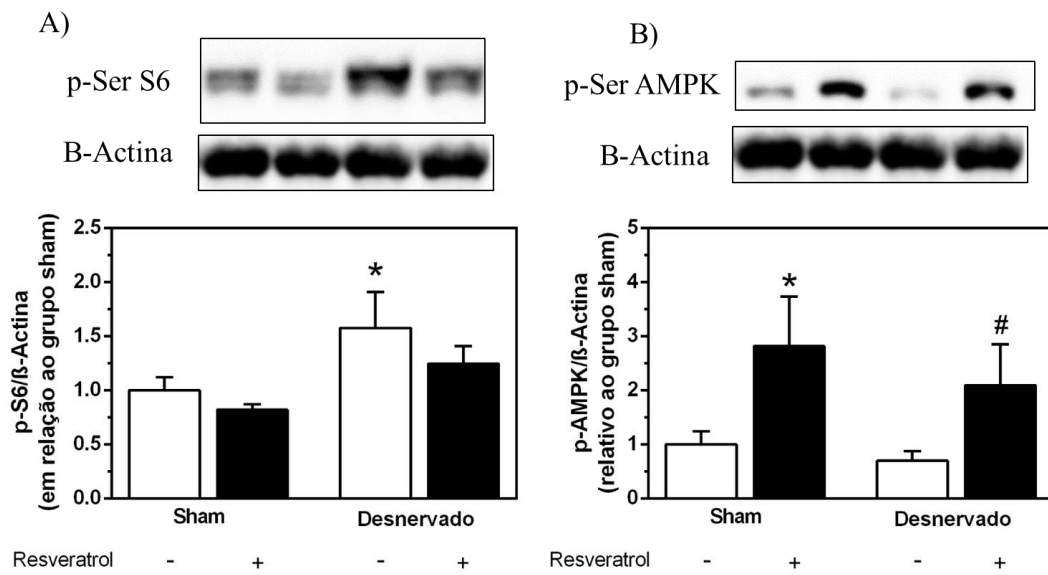


Figura 5 - Efeito do resveratrol (100 μ M) sobre os níveis de fosforilação de A) S6K1 e B) AMPK em músculo EDL de ratos sham e desnervados após 3 dias. * $p < 0.05$ vs. Sham (-RSV), # $p < 0.05$ vs. Desnervado (-RSV).

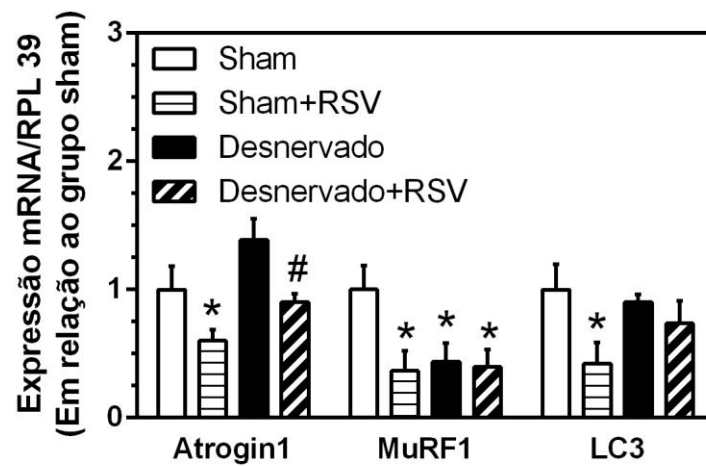


Figura 6 - Expressão gênica de Atrogin1, MuRF1 e LC3 em músculo EDL de ratos sham e desnervados após 3 dias. * $p < 0.05$ vs. Sham, # $p < 0.05$ vs. Desnervado.

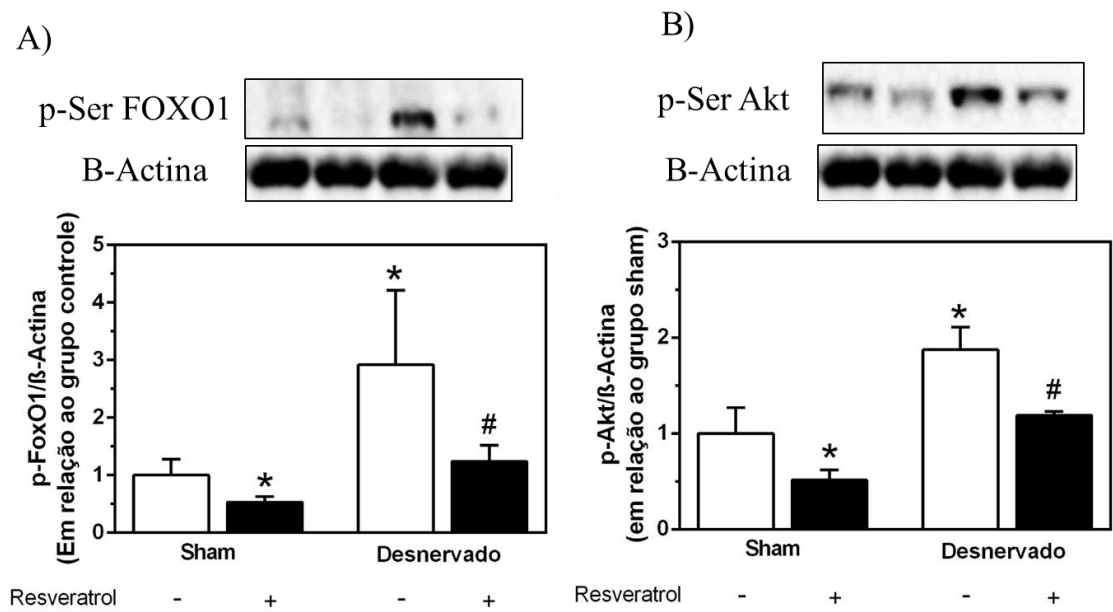


Figura 7 - Efeito do resveratrol sobre os níveis de fosforilação de A) FoxO1 e B) Akt em músculo EDL de ratos sham e desnervados após 3 dias. * $p < 0.05$ vs. Sham, # $p < 0.05$ vs. Desnervado (- RSV).

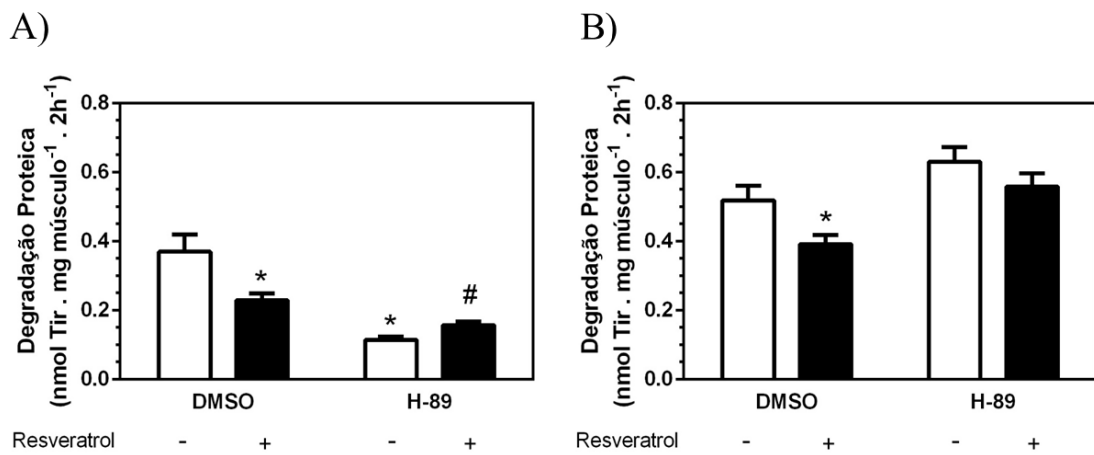


Figura 8 - Efeito do resveratrol (100μM) e H-89 sobre a proteólise total em músculo EDL de ratos A) sham e B) desnervados após 3 dias. * $p < 0.05$ vs. Sham, # $p < 0.05$ vs. Desnervado (- RSV).

REFERÊNCIAS

1. LIRA, E. C. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase inhibitors reduce skeletal muscle protein catabolism in septic rats. *Shock*. 2007;27(6):687-694.
2. BAVIERA, A. M. *et al.* Pentoxifylline inhibits Ca²⁺-dependent and ATP proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle from acutely diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;292(3):E702-E708.
3. LECKER, S. H. *et al.* Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *The Journal of nutrition*. 1999;129(1):227S-237S.
4. LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(7):1807-1819.
5. MORESI, V. *et al.* (2010). Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell*. 2010;143(1):35-45.
6. SCHIAFFINO, S. *et al.* How is muscle phenotype controlled by nerve activity?. *The Italian Journal of Neurological Sciences*. 1999;20(6):409-412.
7. KLINE, W. O. *et al.* Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *Journal of applied physiology*. 2007;102(2):740-747.
8. FURUNO, K.; GOODMAN, M. N.; GOLDBERG, A. L. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(15):8550-8557.
9. GOMES, M. D. *et al.* Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(25):14440-14445.
10. BODINE, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-1708.
11. JAGOE, R. T. *et al.* Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *The FASEB Journal*. 2002;16(13):1697-1712.
12. LECKER, S. H. *et al.* Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *The FASEB Journal*. 2004;18(1):39-51.

13. SACHECK, J. M. *et al.* Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *The FASEB Journal*. 2007;21(1):140-155.
14. MILAN, G. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nature communications*. 2015;6(6670):1-14.
15. WANG, D. T. *et al.* Resveratrol prevents TNF- α -induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. *International immunopharmacology*. 2014;19(2):206-213.
16. LI, Y. *et al.* Quercetin promotes the osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells via mitogen-activated protein kinase signaling. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;9(6):2072-2080.
17. CHEN, K. H. *et al.* Resveratrol ameliorates metabolic disorders and muscle wasting in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2011;301(5):E853-E863.
18. SHADFAR, S. *et al.* Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo. *Nutrition and cancer*. 2011;63(5):749-762.
19. ALAMDARI, N. *et al.* Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;417(1):528-533.
20. JACKSON, J. R. *et al.* Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010;299(6):R1572-R1581.
21. HOWITZ, K. T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425(6954):191-196.
22. MENZIES, K. J. *et al.* Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(10):6968-6979.
23. CENTENO-BAEZ, C.; DALLAIRE, P.; MARETTE, A. Resveratrol inhibition of inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle involves AMPK but not SIRT1.

- American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2011;301(5):E922-E930.
24. PARK, S. J. *et al.* Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012;148(3):421-433.
 25. NAVEGANTES, L. C. C. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1999;277(5):E883-E889.
 26. BAVIERA, A. M. *et al.* Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;315(1):104-112.
 27. WAALRRS, T.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *Lupus*. 1957;20(21):22.
 28. KETTELHUT, I. C.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes/metabolism reviews* 1988;4(8):751-772.
 29. RANNELS, D. E.; KAO, R.; MORGAN, H. E. Effect of insulin on protein turnover in heart muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(5):1694-1701.
 30. MORTIMORE, G. E. Mechanisms of cellular protein catabolism. *Nutr. Rev.* 1982;40(1):1-12.
 31. FARBER, J. L. The role of calcium in cell death. *Life sciences*. 1981;29(13):1289-1295.
 32. PAULA-GOMES, S. *et al.* Insulin suppresses atrophy-and autophagy-related genes in heart tissue and cardiomyocytes through AKT/FOXO signaling. *Horm Metab Res*. 2013;45:849-855.
 33. SOLOMON, V.; GOLDBERG, A. L. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(43):26690-26697.
 34. LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of β -adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiological reviews*. 2008;88(2):729-767.

35. WANG, Y.; PESSIN, J. E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2013;16(3):243.
36. MORISCOT, A. S. *et al.* MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance. *Journal of structural biology*. 2010;170(2):344-353.
37. REED, S. A. *et al.* Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *The FASEB journal*, 2012;26(3):987-1000.
38. KUMAR, A.; BHATNAGAR, S.; PAUL, P. K. TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2012;15(3):233.
39. GOLDSPINK, D. F. The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochemical Journal*. 1976;156(1):71-80.
40. GONÇALVES, D. A. *et al.* Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2012;302(1):E123-E133.
41. MEDINA, R.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochemical Journal*. 1995;307(3):631-637.
42. KUWAJERWALA, N. *et al.* Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer research*. 2002;62(9):2488-2492.
43. POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; DERUISSEAU, K. C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005;288(2):R337-R344.
44. DAS, S. *et al.* The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharmaceutical research*. 2008;25(11):2593-2600.
45. HOLMES-MCNARY, M.; BALDWIN, A. S. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Research*. 2000;60(13):3477-3483.

46. BAUR, J. A. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444(7117):337-342.
47. FEIGE, J. N. *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell metabolism*. 2008;8(5):347-358.
48. BOLSTER, D. R. *et al.* AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(27):23977-23980.
49. NADER, G. A. Muscle growth learns new tricks from an old dog. *Nature medicine*. 2007;13(9):1016-1018.
50. OLIVAN, M. *et al.* Theophylline is able to partially revert cachexia in tumour-bearing rats. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):1-8.
51. TISCHLER, M. E. *et al.* Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism*. 1990;39(7):756-763.
52. SHIRAHARA, H. *et al.* Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;22(8):2716-2727.
53. AVERNA, M. *et al.* Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2003;60(12):2669-2678.
54. LELOUP, L. *et al.* Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(12):2049-2063.
55. LELOUP, L. *et al.* Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in m-calpain activation and myogenic cell migration. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(6):1177-1189.
56. LE, N. *et al.* Quercetin protects against obesity-induced skeletal muscle inflammation and atrophy. *Mediators of inflammation*, 2014;2014.

57. LEE, D.; GOLDBERG, A. L. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *Journal of Biological Chemistry*, 2013;288(42):30515-30526.
58. GOODMAN, C. A.; MAYHEW, D. L.; HORNBERGER, T. A. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cellular signaling*. 2011;23(12):1896-1906.
59. SIN, T. K.; YUNG, B. Y.; SIU, P. M. Modulation of SIRT1-Foxo1 signaling axis by resveratrol: implications in skeletal muscle aging and insulin resistance. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;35(2):541-552.
60. FULCO, M.; SARTORELLI, V. Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues. *Cell cycle*. 2008;7(23):3669-3679.
61. NAVEGANTES, L. C. C. *et al.* Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2000;279(3):E663-E668.
62. 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*. 2004;286(4):E642-E647.
63. COMBARET, L. *et al.* Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *Biochemical Journal*. 2002;361(2):185-192.
64. LIRA, E. C. *et al.* Phosphodiesterase-4 inhibition reduces proteolysis and atrogenes expression in rat skeletal muscles. *Muscle & nerve*. 2011;44(3):371-381.
65. SILVEIRA, W. A. *et al.* Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. *Journal of Applied Physiology*. 2014;117(1):11-19.
66. ZHAO, J. *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism*. 2007;6(6):472-483.
67. HINKLE, R. T. *et al.* Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle & nerve*. 2005;32(6):775-781.

68. YIMLAMAI, T. *et al.* Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of applied physiology*. 2005;99(1):71-80.
69. THOMSON, D. M. *et al.* AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *Journal of applied physiology*. 2008;104(2):429-438.

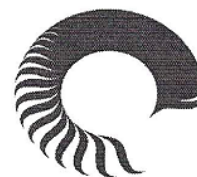
6. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos, o presente trabalho demonstrou que o resveratrol tem efeito antiproteolítico na musculatura esquelética e seu mecanismo de ação envolve a redução da atividade das vias proteolíticas ubiquitina-proteassoma e dependente Ca^{2+} , além disso, sua ação é dependente da ativação de PKA. Por outro lado, o resveratrol ativa AMPK o que reduz a síntese proteica em músculo desnervado, contudo a hiperativação das vias proteolíticas é determinante no estabelecimento da atrofia muscular, desta forma, o resveratrol pode prevenir a perda de massa muscular em modelos de atrofia experimental, sobretudo por reduzir a proteólise muscular, independente da síntese proteica.

7. ANEXO

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 06 de junho de 2013.

Ofício nº 583/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Eduardo Carvalho Lira**
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Processo nº 23076.034969/2012-48

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeito do Resveratrol no metabolismo de proteínas em músculo esquelético de ratos desnervados”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 40-45 dias; Peso: ~70g; Sexo: machos; nº total de animais: 100-120 (ao longo de 1 ano)

Atenciosamente,


Profª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924